Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

Școala Doctorală din Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

TEZĂ DE DOCTORAT

Metode inovative pentru determinarea substanțelor de interes terapeutic din surse marine

PhD Student: Sandu (cas.Dorneanu) Andreea-Elena
Coordinator: Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

2026



Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

Școala Doctorală din Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

TEZĂ DE DOCTORAT

Metode inovative pentru determinarea substanțelor de interes terapeutic din surse marine

PhD Student: Sandu (cas Dorneanu) Andreea-Elena
Coordinator: Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

Mentory Committee:

Name	Affiliation
Prof. Dr Eng. Gabriel Lucian Radu	Department of Analytical Chemistry and Environmental Engineering/National University of Science and Technology, Politehnica of Bucharest
Prof. Dr. Eugenia EftimieTotu	Department of Analytical Chemistry and Environmental Engineering/National University of Science and Technology, Politehnica of Bucharest
CSI Dr. Cătălina Neguț	Laboratory of Electrochemistry and PATLAB /National Institute for Research in Electrochemistry and Condensed Matter

Metode inovative pentru determinarea substanțelor de interes terapeutic din surse marine

Cuprins

Mulțumiri....6
Introducere....7
Capitolul 1.Nămolul sapropelic și apa din Lacul Techirghiol și Marea Moartă –surse de sănătate..9
1.1. Introducere 9
1.2. Poziția geografică.... 10
1.2.1. Lacul Techirghiol....10
1.2.2 Marea Moartă....11
1.3. Compoziția nămolului sapropelic.... 12
1.3.1. Caracterizarea nămolului sapropelic....12
1.3.2. Caracterizarea fizico-chimică globală....13
1.3.3. Caracterizarea chimică....14
1.4. Analiză globală.... 15
Capitolul 2. Instrumente și metode utilizate pentru determinarea poluanților și a substanțelor active din nămolul sapropelic și din apa lacului Techirghiol și a nămolului din Marea Moartă....20
2.1. Senzori electrochimici și voltametrie cu impuls diferențial.... 20
2.1.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor voltametrici 21
2.2. Senzori și metode stocastice.... 23
2.2.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici 23
2.2.2. Metoda stocastică 25
2.3. GC-ECD.... 25
Contributii originale ……..……..…….27
Capitolul 3. Bandă stocastică 2D pentru analiza ultrasensibilă a Pb(II) și Cd(II) în nămolul sapropelic [104]…..……..…….28
3.1. Introducere 28

3.2. Metoda stocastică 30
3.3. Selectivitatea senzorului stocastic 33
3.4. Validarea benzilor de detectare stochastice ultrasensibile atunci când sunt utilizate pentru determinarea ionilor Cd^{2+} și Pb^{2+} 34
Capitolul 4. Screening preliminar al poluanților organici persistenți din apa și nămolul lacului Techirghiol folosind GC-ECD [105]……..37
4.1. Introducere 37
4.1.1. Determinarea pesticidelor organoclorurate și a bisfenolilor policloruraţi..... 39
Capitolul 5. Determinarea acidului humic în nămolul și apa din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă……47
5.1. Analiza rapidă a acidului humic în probele de nămol și apă [106] 47
5.1.1. Introducere..... 47
5.1.2.Proiectarea electrodului stochastic 2D 48
5.1.3. Metoda stocastică 49
5.1.4. Caracteristicile de răspuns ale electrodului stochastic 2D atunci când este utilizat pentru determinarea acidului humic…… 49
5.1.5. Electroanaliza acidului humic în probe de nămol și apă…..……..... 50
5.2. Senzor electrochimic pentru determinarea acidului humic în probe[107].....54
5.2.1. Introducere.....54
5.2.2. Proiectarea senzorului electrochimic de unică folosință……..……. 55
5.2.3. Caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic …….…….....56
5.2.4. Selectivitatea senzorului electrochimic …….57
5.3. Validarea senzorului electrochimic pentru determinarea acidului humic in probele de nămol sapropelic si apa.....58
Capitolul 6. Determinarea ultrasensibilă și rapidă a acidului fulvic în nămolul sapropelic și în apa din Lacul Techirghiol[64]…….…….....60
6.1. Introducere 60
6.2.Proiectarea senzorului stocastic..... 62
6.2.1. Caracterizarea senzorului stochastic..... 69

6.2.2. Caracterizarea prin microscopie electronică (SEM) a suprafeței active a senzorului stochastic 69
6.3. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic..... 69
6.4. Selectivitatea senzorului stocastic 72
6.5. Validarea senzorului stocastic ultrasensibil atunci când este utilizat pentru determinarea acidului fulvic 72
Capitolul 7. Determinarea estradiolului în apa și în probele de nămol [108].....76
7.1. Introducere 76
7.2. Proiectarea senzorului stocastic 2D serigrafiat..... 78
7.3. Metoda stocastică 79
7.4. Caracterizarea suprafeței senzorului stochastic 2D de unică folosință, imprimat serigrafic.81
7.5. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stochastic 2D de unică folosință, realizat prin serigrafie, atunci când este utilizat pentru determinarea estradiolului..... 85
7.5.1. Determinarea estradiolului în probele de apă de suprafață și în probele de nămol asociate 87
Concluzii.....90
Concluzii generale..... 90
Contribuții originale.....93
Perspective de viitor.....94
Referințe.....96
Anexa 1. Participarea la conferințe naționale și internaționale.....107
Anexa 2. Articole publicate în reviste ISI.....108

Mulțumiri

La finalul acestui parcurs academic, aș dori să-mi exprim profunda recunoștință față de toți cei care mi-au fost alături și au contribuit, direct sau indirect, la finalizarea acestei teze de doctorat.

În primul rând, îi mulțumesc lui Dumnezeu pentru că mi-a dat puterea, înțelepciunea și speranța de a merge mai departe în momentele dificile și pentru că mi-a călăuzit pașii de-a lungul acestei călătorii.

Îi adresez cele mai sincere mulțumiri doamnei coordonator prof. dr. habil. Raluca-Ioana van Staden, pentru îndrumarea academică excepțională, răbdarea, standardele înalte, disponibilitatea și sprijinul acordat pe parcursul studiilor mele doctorale. Sfaturile, experiența și încrederea ei au avut o contribuție esențială la dezvoltarea mea profesională și la finalizarea acestei cercetări.

Îi adresez mulțumiri sincere doamnei Prof. univ. Stanciu Gabriela pentru încrederea pe care mi-a acordat-o, pentru încurajarea sa constantă și pentru inspirația pe care mi-a oferit-o de-a lungul anilor.

De asemenea, aș dori să le mulțumesc colegelor mele din cadrul Laboratorului PATLAB pentru sprijinul acordat, colaborarea excepțională, ajutorul oferit în cadrul activităților experimentale și atmosfera prietenoasă și colegială care a făcut ca această experiență să fie mai plăcută și mai satisfăcătoare.

Un gând special de recunoștință se îndreaptă către soțul și părinții mei, care mi-au fost alături cu răbdare, înțelegere și sprijin necondiționat în fiecare etapă a acestei călătorii. Fără sprijinul și încrederea lor, multe dintre realizările mele nu ar fi fost posibile.

În cele din urmă, și mai presus de toate, dedic această realizare fiicei mele, Daria. Ea a fost cea mai mare sursă de motivație și cauza pentru care nu am vrut niciodată să renunț. Sper că, prin acest exemplu, îi pot arăta că perseverența, munca asiduă, credința și curajul pot transforma orice vis în realitate.

Tuturor celor care au contribuit, într-un fel sau altul, la această realizare, le adresez mulțumirile mele sincere și recunoștința mea profundă.

INTRODUCERE

Prezentul rezumat sintetizează contribuțiile originale ale tezei de doctorat cu titlul "Metode inovative pentru determinarea substanțelor de interes terapeutic din surse marine", elaborate în cadrul Școlii Doctorale a Facultății de Inginerie Chimică și Biotehnologii din cadrul Universității Naționale de Știință și Tehnologie Politehnica București.
Cercetarea a fost desfășurată sub coordonarea Prof.Dr.Habil.Raluca-Ioana van Staden, în cadrul laboratorului PATLAB al Institutului Național de Cercetare în Electrochimie și Materie Condensată.

Nămolul sapropelic și apa din Lacul Techirghiol, respectiv nămolul sapropelic din Marea Moartă, reprezintă resurse naturale cu proprietăți terapeutice recunoscute, utilizate în balneoterapie și cosmetologie de secole.
Compoziția chimică complexă a acestora, bogată în acizi humici, fulvici și minerale stă la baza efectelor lor terapeutice asupra organismului uman.

Având în vedere creșterea presiunii antropice asupra ecosistemelor acvatice, fapt ce a dus la acumularea progresivă de poluanți, în special metale grele și poluanți organici persistenți, a căror prezență poate compromite valoarea terapeutică a acestor resurse și poate imprima efecte adverse asupra sănătății pacienților, controlul acestora, precum și identificarea și cuantificarea rapidă la concentrații foarte scăzute, folosind metode de screening, va face posibilă utilizarea unui nămol și a unei ape curative lipsite de riscuri toxicologice.

Deși apa și nămolul sunt utilizate în centrele terapeutice din România și Israel, există necesitatea extragerii componentelor active pentru medicamente naturale sau a utilizării plasturilor cu nămol în scopuri terapeutice și în afara orașelor Techirghiol sau Marea Moartă.

Metode inovative pentru determinarea substanțelor de interes terapeutic din surse marine

Obiectivul principal al tezei este identificarea unor metode inovatoare pentru determinarea substanțelor cu efect terapeutic din surse marine. Prin urmare, au fost optimizate, caracterizate și validate metode noi bazate pe senzori stocastici și electrochimici pentru determinarea substantelor de interes terapeutic, precum acidul humic, acidul fulvic și a estradiolului în apa lacului și nămol. Pentru determinarea substanțelor cu potențial toxic, precum metalele grele (Pb (II), Cd (II)) și poluanții organici persistenți (cum ar fi bisfenolii policlorurați) în nămol și apă, au fost propuse metode bazate pe senzori stocastici și cromatografia de gaze. Metodele și instrumentele propuse permit determinarea acestor substanțe de la niveluri de concentrație extrem de mici până la câteva mg/L, cu selectivitate și sensibilitate ridicate. Utilizarea metodei stocastice de analiză a asigurat o fiabilitate ridicată pentru identificarea acestora în matrici complexe, în timp ce concentrațiile lor au putut fi determinate la niveluri foarte scăzute în probele de nămol și apă.

Toate rezultatele tezei au fost publicate în reviste ISI, noutatea și calitatea înaltă a lucrării fiind recunoscute de către recenzorii revistelor.

CAPITOLUL 1

Nămolul sapropelic și apa din Lacul Techirghiol și nămolul din Marea Moartă – surse de sănătate

1.1.Introducere

Prezentul studiu își propune să analizeze beneficiile nămolului sărat din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă. Nămolul sapropelic tratează afecțiunile reumatologice de tip inflamator sau degenerativ, sechele posttraumatice (ale mușchilor, pielii și oaselor), afecțiunile sistemului nervos central și periferic (de la nevralgii la hemiplegie, hemipareză, sclerită multiplă și boala Parkinson), afecțiuni ginecologice (anexită, cervicită, endometrită, sterilitate secundară, tulburări funcționale), afecțiuni dermatologice (psoriazis, sindromul seboreic, dermatită alergică), afecțiuni vasculare periferice (ischemie, insuficiență circulatorie).

Nămolul sapropelic este o substanță cu o compoziție complexă, formată în urma unui proces biologic extrem de îndelungat (denumit peloidogeneză) în condițiile specifice lacului Techirghiol. De culoare neagră, lucioasă și onctuoasă, nămolul are un miros caracteristic (hidrogen sulfurat) și posedă proprietăți fizice care îl fac extrem de util în tratarea diverselor afecțiuni.

Deși efectele benefice ale nămolurilor sapropelice sunt cunoscute încă din antichitate, altele au fost descoperite și studiate relativ recent, iar unele se află încă în etapa de studiu preliminar.

Cercetarea științifică își propune să adune cât mai multe explicații privind acțiunea terapeutică a nămolului și să obțină un beneficiu economic maxim din extractele de nămol care pot fi încorporate în creme și loțiuni utilizate în scop terapeutic sau cosmetic. Există numeroase articole care se concentrează asupra nămolului terapeutic, dar, din păcate, toate se opresc la stadiul de cercetare.

1.2. Poziția geografică

1.2.1. Lacul Techirghiol

Stațiunea Techirghiol este situată în sudul României, în județul Constanța, pe litoralul Mării Negre, pe malul nord-vestic al lacului Techirghiol, un liman fluvio-marin, separat de mare printr-o creastă nisipoasă, la 16 km de orașul Constanța, la 3 km de Marea Neagră, la 2 km de Eforie Nord și la 4 km de Movilița.

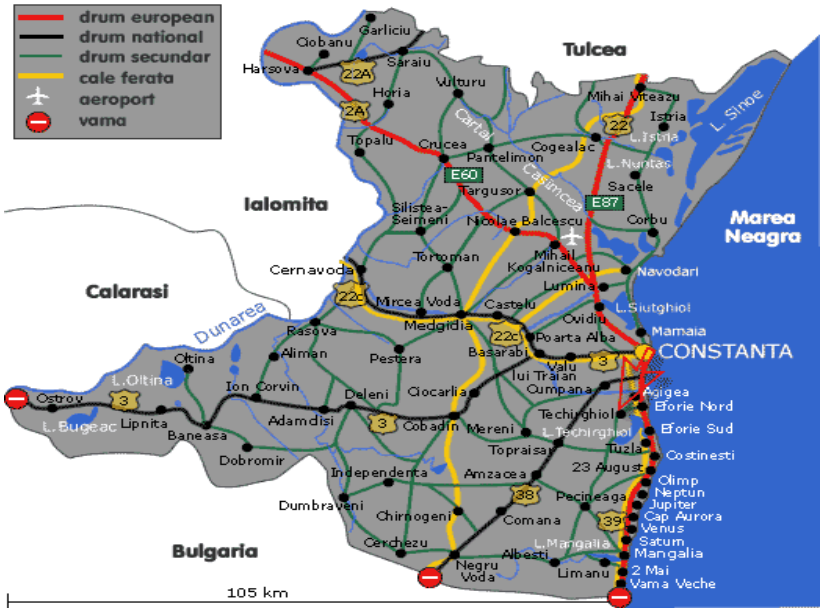


Figura 1.3. Harta Dobrogei și a litoralului românesc

Sursă: https://www.litoralsud.ro/

O analiză generală a compoziției chimice a lacului indică faptul că în porțiunea centrală, care include stațiunile Techirghiol, Eforie Nord și Eforie Sud, mineralizarea și salinitatea totală sunt omogene, atât pe orizontală, cât și pe verticală (până la o adâncime de 3 m), situându-se în jur de 85,5 g la ‰.

Din punct de vedere al originii sale, Lacul Techirghiol este o fostă lagună a Mării Negre, care este acum complet separată de mare; ruperea completă a legăturii sale cu marea este un fenomen relativ recent. Laguna se află la 1,5 m sub nivelul Mării Negre; adâncimea sa variază între 0,5 m și 5 m, ajungând până la 9–10 m.

1.2.2. Marea Moartă

Marea Moartă este o mare continentală, alimentată de apa provenită din precipitații și din râul Iordan, ale cărui ape le primește pe partea sa nordică. Iordanul, precum și Marea Moartă, formează granița naturală între Israel și Iordania.

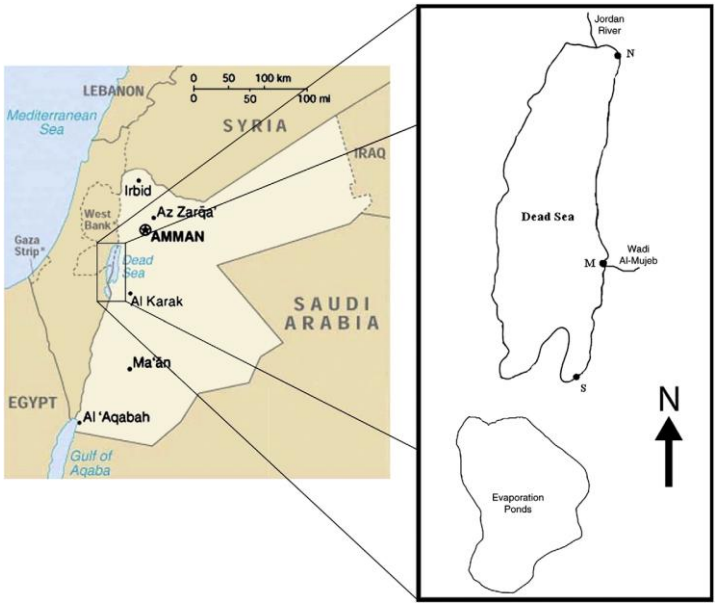


Fig. 1.4. Marea Moartă și punctele de prelevare

Marea Moartă are o suprafață de 600 de kilometri pătrați și este unul dintre cele mai joase locuri de pe Pământ.

Marea Moartă este situată în partea de sud-est a Țării Sfinte, la care se poate ajunge din Ierusalim.

Marea Moartă este o minune a naturii situată în centrul marelui deșert siriano-african al Văii Rift, între Israel și Regatul Iordaniei. Marea Moartă este, de fapt, un lac mare, cu o lungime de 76 km, o lățime de până la 18 km și o adâncime de 400 de metri. Adâncimea sa maximă este de 417 metri sub nivelul mării.

1.3. COMPOZIȚIA NĂMOLULUI SAPROPELIC

1.3.1. Caracterizarea nămolului sapropelic

Din punct de vedere fizico-chimic, nămolul este un sistem eterogen format dintr-o fază lichidă care conține apă și săruri minerale solubile în apă, o fază solidă care conține minerale și substanțe organice și o fază gazoasă care conține hidrogen sulfurat, dioxid de carbon, hidrocarburi etc. Echilibrul ionic al nămolului se reflectă, de asemenea, în pH. În general, nămolurile sunt alcaline, cu pH = 8-10.

Efectul terapeutic al nămolurilor este determinat de combinația proprietăților fizice și chimice.

Indicatorii de calitate sunt reprezentați de:

✓ Proprietățile macroscopice – în special culoarea de referință și consistența fizică; Textura particulelor, care se referă la starea de dispersie a fazei solide a acestora, precum și la dimensiunea și proporția particulelor, poate suferi modificări în timpul procesului de transformare; acestea

trebuie să conțină un procent redus de particule care pot avea dimensiuni mai mari de 0,25 mm, în funcție de opacitatea nămolului;

✓ Conținutul total de substanțe organice din materia uscată variază în funcție de natura mineralelor (anorganice sau organice) și de faptul dacă procentul acestora se situează sub sau peste pragul de 10%. Diferențele cantitative dintre principalele grupe de substanțe organice au un impact asupra calității solidelor terțiare.

✓ Mineralizarea și compoziția ionică a soluției de impregnare cu peloid, ca factor de interacțiune cu organismul uman la nivelul tegumentelor, sunt urmate de caracterizarea chimică a acizilor minerali.

✓ Conținutul de hidrogen sulfurat și de sulfuri, în special de sulfură de fier, este un alt factor definitoriu pentru calitatea acestor peloide.

1.3.2. Caracterizarea fizico-chimică ă globală

Caracteristicile fizice ale nămolului sapropelic

- ✓ hidropermeabilitatea
- ✓ Plasticitatea
- ✓ dispersia
- ✓ termopexia

Merită menționat faptul că termoextrudarea este mai importantă în cazul moleculelor organice decât în cazul celor minerale.

Principiile fizice de interes în etapa de prelucrare a nămolului sapropelic sunt următoarele:

- ✓ Culoarea și mirosul oferă primele informații despre starea nămolului.

Nămolul bine aerat și bine dispersat are un miros slab, similar cu cel al humusului;

- ✓ Umiditatea sau conținutul de apă variază semnificativ, în funcție de natura nămolului (mineral sau organic) și de tipul de tratare din care provine (tratare primară, secundară, terțiară etc.).
- ✓ Greutatea specifică a nămolului depinde în mare măsură de greutatea specifică a solidelor pe care le conține, de conținutul lor de umiditate și de sursa nămolului din stația de epurare a apelor uzate;
- ✓ Filtrabilitatea este o proprietate importantă a nămolului și se referă la capacitatea acestuia de a fi filtrat; ea este exprimată cantitativ prin rezistența specifică la filtrare (r, în cm/g) și prin coeficientul de compresibilitate (s).
- ✓ Puterea calorică a nămolului variază în funcție de conținutul său de materie organică (substanțe volatile).

1.3.3. Caracterizare chimică

- ✓ Valoarea pH-ului variază în timpul digestiei anaerobe a nămolului, dar trebuie menținută între 7 și 7,5; acesta este un proces ușor alcalin.
- ✓ Substanțe solide totale – nămolul conține, în medie, aproximativ 90 % apă, restul fiind substanțe solide care, din punct de vedere chimic, pot fi minerale și substanțe organice (volatile).
- ✓ Indicatorul mineral și cel volatil din substanța uscată constituie un criteriu de clasificare a nămolului, prin urmare:

  - nămolul organic prezintă $M/V < 1$;

  - nămolul anorganic prezintă $M/V > 1$.

Acest criteriu stă la baza selectării proceselor de tratare, întrucât nămolul organic este biodegradabil, iar stabilizarea acestuia se realizează în principal prin metode biologice (fermentare aerobă sau anaerobă), în timp ce nămolul anorganic este supus unor procese de prelucrare (solidificare, extracția componentelor utile etc.).

- ✓ Fermentabilitatea

Se estimează că materia organică din nămolul uscat reprezintă între 60 și 80% din cantitatea totală de materie uscată, ceea ce duce la anumite dificultăți în procesul de uscare a nămolului.

Din punct de vedere chimic, nămolul conține în principal hidrocarbonați, grăsimi și proteine.

Producția de gaz este exprimată în kilograme de materie organică și atinge nivelurile maxime atunci când materia organică este bogată în grăsimi organice.

Conținutul de acizi organici volatili ar trebui să fie de aproximativ 500 mg/dm³. Dacă valoarea depășește 2.000 mg/dm³, există riscul ca fermentația metanică să se intensifice, determinând ca fermentația acidă să devină dominantă și ducând la producerea de gaze urât mirositoare și de nămol extrem de dăunător pentru mediu.

- ✓ Metale grele și nutrienți – conținutul de nutrienți (N, P, K) are o importanță deosebită atunci când se ia în considerare utilizarea nămolului ca îngrășământ agricol sau ameliorator de sol.

1.4. Analiză globală

Nămolurile sapropelice terapeutice (peloidele) sunt definite de Societatea Internațională de Hidrologie a Mediului ca substanțe care se formează în condiții naturale prin procese geologice

și care, într-o stare fin divizată și amestecate cu apă, sunt utilizate în practica de tratament al mediului sub formă de băi, tratamente locale, împachetări, cataplasme sau unguente.

Flora este alcătuită din alge microfite și macrofite, printre care predomină Cladophora vagabunda și Cladophora cristalina, alge care cresc exclusiv în apă sărată. Fauna acvatică este reprezentată de Artemia salina, care măsoară 10–12 mm și are o culoare roșiatică. Prin descompunerea bacteriană împreună cu alga Cladophora cristalina, formează nămol sapropelic.

Analizele efectuate de-a lungul timpului arată că nivelurile de mineralizare fluctuează și că există o tendință de creștere a concentrației apei; cu toate acestea, aceste fluctuații sunt de natură sezonieră și sunt legate de condițiile climatice locale.

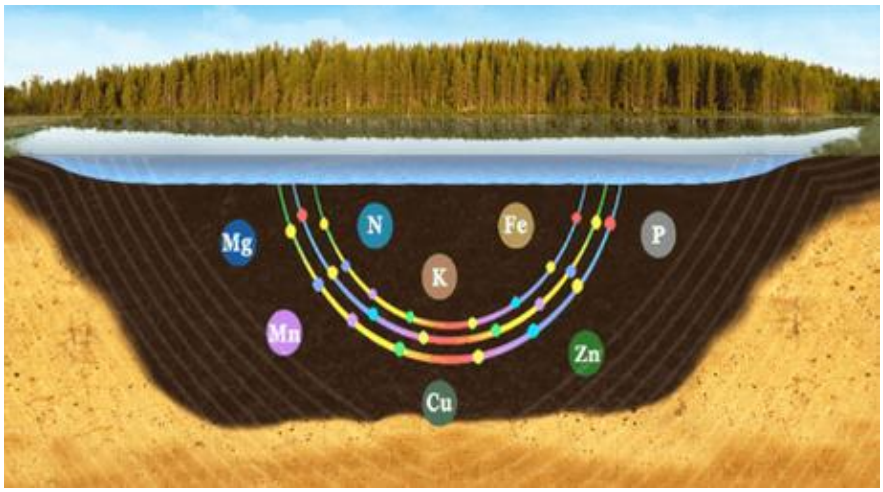


Figura 1.5. Mineralizarea apei și a nămolului

Proprietățile chimice generale ale apei din lac rămân constante, corespunzând celor ale apei care conține clor, brom, precum și sulfați de sodiu și de magneziu. Elementele dominante prezintă, de asemenea, valori constante în întreaga zonă centrală a lacului.

Clorura, sub formă de clorură de sodiu și de magneziu, este cel mai valoros indicator al mineralizării, menținându-se la valori constante; sulfații se mențin, de asemenea, în limite foarte

înguste: 7,5–7,6 g‰; sodiul și potasiul se mențin, de asemenea, în intervale reduse, în jur de 27 g‰ și, respectiv, 0,8 g‰. Magneziul, deși prezintă unele variații, se încadrează, de asemenea, în intervalul îngust de 2,8–3 g‰.

La analiza elementelor mai mobile din zonă, bicarbonații și carbonații prezintă unele variații ale valorilor datorită labilității sistemului CO_3^{2-} / HCO_3^- iar concentrațiile de calciu cresc odată cu adâncimea, probabil datorită transformării carbonatului solubil în carbonat insolubil, dar așa-numitul CO_2 de echilibru rămâne în lac.

Absența iodului în toate probele analizate pare să fie legată de comportamentul metabolic al zooplanctonului și fitoplanctonului, precum și de procesele de absorbție sau de adăugare.

Agenții care contribuie la peloidogeneză în Lacul Techirghiol sunt:

- ✓ Artemia salina
- ✓ Cladophora cristallina
- ✓ Substanța organică oxidabilă, provenită de la organismele care populează lacul, prezintă o creștere de la suprafață spre adâncime, adăugându-se de la zona trofică la zona trofolitică.

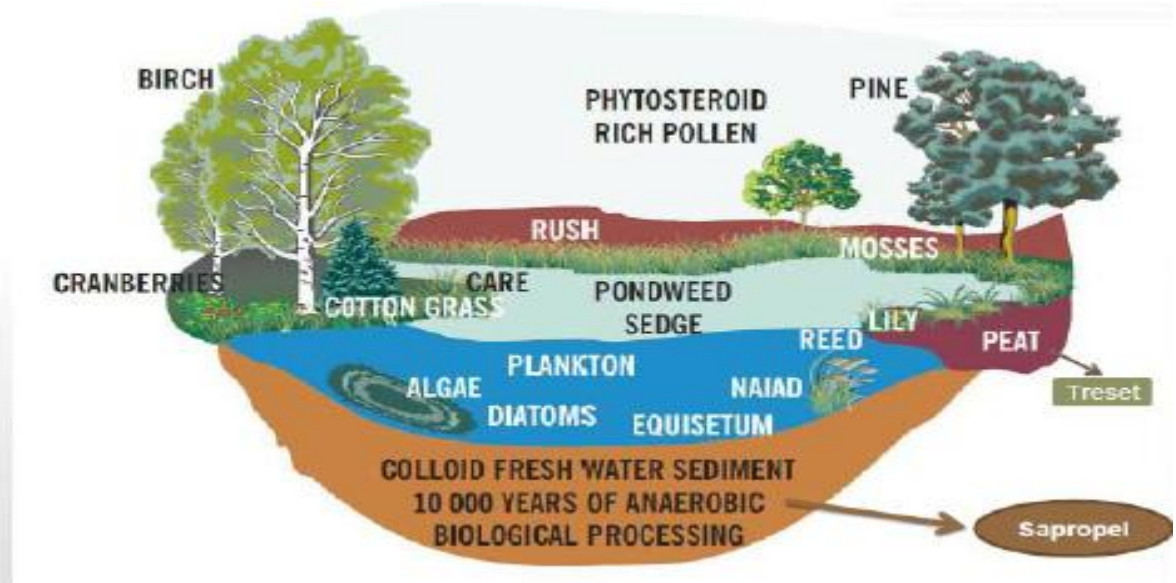


Figura 1.6. Factori implicați în procesul natural de formare a nămolului

Nămolul din Marea Moartă are o culoare neagră (cunoscut sub denumirea de „nămol negru din Marea Moartă") [2]. Nămolul negru din Marea Moartă este un amestec omogen de minerale din Marea Moartă și substanțe organice, care poate fi util în tratarea afecțiunilor reumatice și dermatologice, precum și în cosmetică, climatoterapie și balneologie.

Se consideră că nămolul din Marea Moartă provine din sedimente mai vechi sau din soluri de culoare roșu-maroniu care sunt transportate în mare în timpul iernii.

În urma investigațiilor, măsurătorile izotopice au arătat că îmbogățirea cu izotopi grei a probelor de aragonit a fost cauzată în principal de precipitarea acestora, determinată de evaporare [3,4].

Au fost studiate unele dintre proprietățile reologice ale nămolului din Marea Moartă (de exemplu, vâscozitatea aparentă, densitatea, amestecarea cu apă dulce și tensiunea de forfecare). Deși această cercetare oferă informații valoroase pentru probleme specifice, pare să existe o lipsă totală de date de bază privind atât proprietățile fizice, cât și cele chimice ale nămolului din Marea Moartă.

Probele de nămol din Marea Moartă se caracterizează prin compoziții mineralogice uniforme: argilă, dolomită, gips, caolinit, pirită, cuarț, carbonați și feldspat.

A fost studiată concentrația de metale grele din nămolul negru al Mării Moarte [2,14, 15] și s-a demonstrat că probele de nămol negru prelevate din diferite locații de pe țărmul estic al Mării Moarte prezentau valori scăzute ale metalelor grele.

Din literatura de specialitate știm că apa din Marea Moartă se caracterizează printr-o salinitate extrem de ridicată (34,1%), ceea ce o face un mediu incompatibil cu viața animalelor marine.

Densitatea extremă (1,24 kg/l) face posibilă plutirea corpului uman în apă fără a fi nevoie să înoate.

Contrar așteptărilor, anumite bacterii anaerobe pot trăi în această apă sărată, cum ar fi cele care descompun salpetrul, sulful și celuloza. Chiar și unele plante, precum halofitele, pot supraviețui în aceste condiții de mediu extreme.

Prin compoziția sa chimică și conținutul de oligoelemente, substanțe organice, aminoacizi și hormoni, activitatea biologică a nămolului sapropelic este influențată, prezentând totodată o capacitate ridicată de a capta radicalii liberi.

În prezent, cele mai frecvente utilizări se regăsesc în medicină (balneologie), industria chimică și agricultură.

Nămolul sapropelic și extractele de nămol sunt utilizate în formularea produselor cosmetice datorită capacității lor de a elimina radicalii liberi, de a preveni și reduce efectele îmbătrânirii, de a îmbunătăți și regenera pielea și de a regla nivelul de hidratare al epidermei.

De asemenea, datorită proprietăților sale antibacteriene, nămolul este utilizat ca ingredient activ în formularea săpunurilor, a loțiunilor tonifiante, a măștilor de curățare, a șampoanelor, a uleiurilor de masaj și a cremelor de corp [54].

CAPITOLUL 2

Instrumente și metode utilizate pentru determinarea poluanților și a substanțelor active din nămolul sapropelic și din apa lacului Techirghiol și a nămolului din Marea Moartă

Pentru determinarea poluanților și a substanțelor active cu efect terapeutic din nămolul și apa Lacului Techirghiol și a Mării Moarte, au fost propuse: un senzor electrochimic, diferite modele de senzori stocastici și o metodă GC cu detector ECD.

2.1. Senzori electrochimici și voltametria cu impuls diferențial

Senzorii electrochimici sunt instrumente fiabile utilizate pentru determinarea substanțelor direct din probe, fără o altă prelucrare. Proiectarea acestor senzori este simplă: o pastă pe bază de matrice de carbon, care este cea mai fiabilă, poate fi utilizată pentru imobilizarea unui modificator cu proprietăți electrocatalitice bune. Modificatorul va favoriza oxidarea sau reducerea substanței de interes sub aplicarea unui potențial.

Voltametria cu impulsuri diferențiale (DPV) este o tehnică electroanalitică cu sensibilitate ridicată, bazată pe aplicarea unor impulsuri de amplitudine fixă suprapuse unei rampe liniare de potențial. Semnalul măsurat reprezintă diferența de curent înregistrată înainte și după fiecare impuls, ceea ce permite eliminarea curentului de încărcare capacitivă și îmbunătățirea raportului semnal/zgomot, permițând detectarea precisă a speciilor redox-active. DPV este o metodă de

voltametrie cu impulsuri derivată din voltametria cu baleiaj liniar sau în trepte, în care o serie de mici impulsuri de tensiune este aplicată electrodului de lucru peste un potențial de bază care crește treptat. Curentul este măsurat de două ori pentru fiecare impuls: imediat înainte de impuls și la sfârșitul acestuia. Diferența dintre aceste două măsurători este reprezentată grafic în funcție de potențialul aplicat, ceea ce minimizează efectul curenților de încărcare de fond și îmbunătățește raportul semnal/zgomot. DPV oferă mai multe avantaje față de metodele voltametrice, cum ar fi voltametria ciclică: sensibilitate ridicată, rezoluție îmbunătățită a picurilor, curent de fond redus, în timp ce curentul de vârf este proporțional cu concentrația analitului, permițând calibrarea și cuantificarea precisă.

2.1.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor voltametrici

Primul parametru care trebuie determinat prin voltametrie ciclică este potențialul de jumătate de undă. Potențialul de jumătate de undă este un parametru calitativ al senzorului voltametric, deoarece pe baza valorii sale se poate identifica analitul de interes. Din păcate, valoarea sa este influențată de compoziția matricei.

Intervalul liniar de concentrație în cazul senzorilor voltametrici nu este mare, de obicei 5 decade de concentrație, la niveluri de concentrație foarte scăzute, in domneiul nanomolar sau picomolar. Acestea sunt calculate folosind recomandarea IUPAC pentru senzorii stocastici [16].

Limitele de detectare sunt legate de semnalul înregistrat pentru soluția de fond [16, 17], de exemplu, soluția care conține tamponul și electrolitul (electroliții). Există diferite modalități de a o determina; de exemplu, limita de detectare este concentrația pentru care intensitatea curentului măsurat este dublă față de cea înregistrată pentru soluția de fond.

Selectivitatea senzorilor voltametrici se poate determina folosind metoda soluțiilor separate sau metoda soluțiilor mixte [17]. Pentru metoda soluțiilor mixte, ecuația pentru determinarea coeficientului de selectivitate amperometrică este ecuația 2.1.

Practic, curentul înregistrat pentru o soluție care conține doar specia principală ce trebuie analizată este comparat cu valoarea curentului total obținut pentru o soluție care conține atât specia principală, cât și specia interferentă. Coeficientul de selectivitate amperometrică poate fi calculat din ecuația 2.1:

(2.1)

$$K_{i,j}^{amp} = \left(\frac{\Delta I_t}{\Delta I_i} - 1 \right) \times \frac{c_i}{c_j} \qquad (2.1)$$

unde $\Delta I_t = I_t - I_b$ și $\Delta I_i = I_i - I_b$, I_t și I_i sunt valorile curentului înregistrat pentru soluția mixtă și pentru soluția care conține doar specia principală, iar c_i și c_j sunt concentrațiile speciei principale și, respectiv, ale speciei interferente. I_b este curentul înregistrat pentru soluția martor.

În cazul metodei soluțiilor separate, se înregistrează intensitatea curentului pentru soluția care conține numai specia principală și, separat, pentru soluția care conține numai specia interferentă, iar valorile obținute sunt comparate între ele. Se propune utilizarea următoarei ecuații pentru determinarea coeficientului de selectivitate amperometrică (ecuația 2.2):

$$K_{i,j}^{amp} = \frac{\frac{\Delta I_j}{c_j}}{\frac{\Delta I_i}{c_i}} \qquad (2.2)$$

unde $\Delta I_j = I_j - I_b$ și $\Delta I_i = I_i - I_b$, I_j și I_i sunt valorile curentului înregistrat pentru ionul/substanța interferentă și, respectiv, pentru ionul/substanța principală, iar I_b este curentul înregistrat pentru soluția martor.

Ecuația de calibrare este: $I = a + b \times Conc._{analit}$ (2.3)

unde *a* este ordonata la origine, iar *b* este panta senzorului. Ambii termeni nu sunt fiabili, deoarece se modifică în timp; prin urmare, calibrarea acestor senzori trebuie efectuată înainte de fiecare măsurare a concentrației analitului dintr-o probă.

Sensibilitatea senzorilor voltametrici este dată de valoarea pantei înregistrate pentru ecuația de calibrare. Pragul minim acceptat pentru sensibilitatea senzorilor voltametrici este de 100 nA/decadă de concentrație.

2.2. Senzori și metode stocastice

Cea mai fiabilă configurație pentru senzorii stocastici se bazează pe imobilizarea unui modificator pe o matrice sub formă de pastă pe bază de carbon. Modificatorul trebuie să prezinte pori/canale capabile să găzduiască analitul de interes. Matricea trebuie să poată mențină acești pori și canale într-o stare bună, pentru a obține o stabilitate adecvată a senzorului proiectat. Până în prezent, cea mai bună stabilitate a fost obținută folosind matrice pe bază de grafen [30]. Pentru a demonstra că suprafața activă a senzorului este capabilă să producă un semnal stocastic, este esențial să se analizeze această suprafață folosind SEM, TEM sau AFM în diferite etape ale construcției senzorului.

2.2.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici

Analiza calitativă și cantitativă este posibilă cu ajutorul senzorilor stocastici. În timp ce valoarea t_{off} este utilizată pentru determinări calitative, în scopul identificării analitilor, valorile t_{on} sunt utilizate pentru toate determinările cantitative.

Analiza calitativă se bazează pe timpul t_{off} , ale cărui valori sunt specifice fiecărui analit și permit identificarea acestuia. Acest parametru se exprimă în secunde.

Valoarea t_{on}este legată de concentrație prin ecuația $1/t_{on}$= a + b x Conc. Analit,

unde *a* este ordonata la origine, iar *b* este panta senzorului.

Primul parametru care trebuie determinat este intervalul de concentrație liniar ,care este, de asemenea, intervalul de concentrație de lucru. În acest interval, este posibilă o fiabilitate ridicată a determinării concentrației analitului. Pentru acest tip de senzori se înregistrează intervale de concentrație liniare largi, fiind specifice senzorilor stocastici.

Limita de determinare este o caracteristică de răspuns foarte importantă a senzorului stochastic. Recomandarea ulterioară a IUPAC privind calculul limitei de determinare a propus ca ultima valoare a concentrației găsită în intervalul liniar de concentrație să fie considerată limita de determinare [28].

Sensibilitatea este dată de termenul *b* din ecuația de calibrare. Valoarea acesteia este de obicei ridicată atunci când se utilizează senzori stocastici.

Stabilitatea senzorilor stocastici este foarte ridicată, mai ales atunci când nu se utilizează substanțe biologice la proiectarea lor. Astfel de senzori pot fi utilizați în mod continuu pentru sute de măsurători, ceea ce reprezintă un avantaj excelent.

Selectivitatea senzorilor este determinată exclusiv de valorile înregistrate pentru analit și pentru posibile interferențe și nu depinde de raportul dintre concentrația posibilei substanțe interferente și concentrația analitului care urmează să fie determinat. Diferențele dintre valori de 0,2 s sau mai mari indică faptul că senzorii sunt selectivi. Selectivitatea nu este influențată de concentrațiile

analitului și ale posibilelor analiți de interferență din amestec. Selectivitatea ridicată a acestor senzori a fost demonstrată în mai multe rânduri [19-21].

2.2.2. Metoda stocastică

Metoda stocastică este utilizată pentru screeningul probelor în vederea identificării diferitelor tipuri de analiți, biomarkeri și substanțe periculoase. Senzorul stocastic, împreună cu electrodul de referință (care, în multe cazuri, este un electrod de referință Ag/AgCl) și cu electrodul auxiliar (care poate fi realizat din Pt sau C), formează celula electrochimică care este introdusă în proba ce urmează să fie măsurată. Se alege ca tehnică cronoamperometria la potențial constant. Potențialul aplicat este optimizat pentru a obține citiri fiabile ale valorilor t_{off} ale analiților. După aplicarea potențialului, se obține diagrama. Analiții de interes sunt identificați în funcție de semnăturile lor, iar valorile t_{on} corespunzătoare sunt citite și introduse în ecuațiile de calibrare pentru a putea determina concentrația analitului.

2.3. GC-ECD

Cromatografia în fază gazoasă este o tehnică analitică utilizată pentru separarea, identificarea și cuantificarea compușilor volatili dintr-un amestec, folosind o fază mobilă gazoasă și o fază staționară. Cromatografia în fază gazoasă separă compușii pe baza distribuției lor între faza staționară și faza mobilă. Faza staționară poate fi un adsorbant solid (cromatografie gaz-solid, GSC) sau un lichid aplicat pe un suport inert (cromatografie gaz-lichid, GLC). Faza mobilă este un gaz purtător inert, precum heliu, azot sau hidrogen, care transportă proba vaporizată prin coloană. Separarea are loc deoarece compușii diferiți interacționează în mod diferit cu faza staționară, ceea ce duce la timpi de retenție distincți pentru fiecare component.

Detectorul cu captură de electroni (ECD) a fost utilizat în analizele din prezenta teză datorită sensibilității sale ridicate față de moleculele de analit electronegative, cu afinitate electronica ridicată, care sunt capabile să capteze electroni. Această sensibilitate face ca ECD să fie ideal pentru detectarea cantităților infime de compuși chimici, cum ar fi compușii halogenați, dintr-o probă. Selectivitatea ECD îl face deosebit de util în domenii care necesită monitorizarea și analiza riguroasă a urmelor de compuși toxici , cum ar fi testarea mediului și analiza reziduurilor de pesticide.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3

Bandă stocastică 2D pentru determinarea Pb(II) și Cd(II) în nămolul sapropelic [104]

3.1. Introducere

Este bine cunoscut faptul că majoritatea metalelor grele sunt cancerigene și nu sunt biodegradabile [32, 40]. S-a observat o legătură între expunerea la cadmiu (Cd) și mai multe tipuri de cancer, precum cel de sân, de plămâni, de prostată, de pancreas și de rinichi, iar influența Cd asupra sănătății cardiace, care se manifestă prin modificări biochimice și fiziologice semnificative, a fost, de asemenea, semnalată [35]. Expunerea la plumb (Pb) reprezintă o preocupare pentru sănătatea publică datorită persistenței sale îndelungate, fiind admisă la niveluri mai mici de 10 μmol L^{-1} [28]. Plumbul are efecte toxice asupra multor organe, cum ar fi ovarele (scăderea masei ovariene), creierul (tulburări de comportament, tulburări de memorie, lipsă de atenție, depresie, anxietate), rinichii (inflamație, leziuni glomerulare, alterarea celulelor epiteliale tubulare renale) și plămânii (inflamație, tromboză, tumori pulmonare) [28]. Cd și Pb tind să se bioacumuleze în mediile acvatice, precum și în sedimentele acvatice și în nămolul sapropelic [22].

Până în prezent, pentru determinarea Cd și Pb din diverse matrice au fost propuse spectroscopia de absorbție atomică cu flacără [42], chemosenzorii de fluorescență, biosenzorii [53], precum și diverse metode electrochimice bazate pe senzori electrochimici [43, 26, 36, 29, 33, 42, 25, 39].

Deși metodele spectroscopice de analiză sunt extrem de fiabile, ele nu pot fi utilizate pentru analiza la fața locului, iar probele necesită o prelucrare intensă înainte de determinarea Pb și Cd, ceea ce, în unele cazuri, diminuează precizia analizei. Metodele electrochimice de analiză reprezintă o alternativă bună la metodele spectroscopice, în special datorită prelucrării minime a probelor și portabilității instrumentelor, însă complexitatea matricei poate influența rezultatele unei analize amperometrice sau voltametrice, afectând acuratețea rezultatelor [38, 31, 41].

Senzorii stocastici reprezintă o nouă clasă de senzori capabili să efectueze analize calitative și cantitative fiabile [38]. Precizia se îmbunătățește prin utilizarea acestora, deoarece răspunsul lor nu este influențat de complexitatea matricei; concentrații extrem de scăzute de analit pot fi determinate cu precizie în matrici complexe.

Datorită importanței determinării la fața locului a calității nămolului sapropelic, există o nevoie reală de a dezvolta un dispozitiv portabil capabil să monitorizeze ionii Cd(II) și Pb(II) din nămol, înainte de utilizarea acestuia în tratamente cosmetice și medicale.

În această lucrare s-a propus o bandă stocastică 2D pentru determinarea simultană la fața locului, în timp real, a ionilor Cd(II) și Pb(II). Noutatea acestei benzi stocastice față de alți senzori bazați pe grafen [23, 24, 30, 34, 36, 37] constă în principiul de recunoaștere a celor două metale (modul stocastic, care permite recunoașterea și cuantificarea moleculară fiabilă), precum și în designul său , electrodul de lucru a fost proiectat prin imobilizarea grafenului pe mătase (folosind tehnica plasmei reci) și modificat cu α-ciclodextrină, fiind însoțit de un electrod de referință (Ag/AgCl) și de un electrod auxiliar (fir de carbon). Noutatea este dată și de determinarea simultană in situ a Cd(II) și Pb(II) în probele nămolul sapropelic.

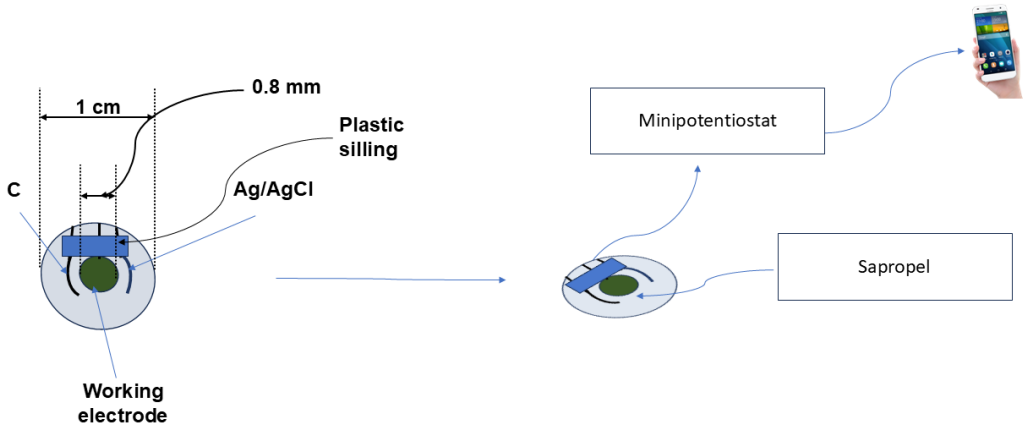


Figura 3.1. Reprezentare schematică a benzilor de detectare stocastice și a configurației experimentale pentru analiza nămolului.

Imaginile obținute prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) după modificarea mătăsii cu grafen (Figura 3.2.a) și după modificarea cu α-CD (Figura 3.2.b) au demonstrat că procesele de acoperire și modificare au fost realizate cu succes.

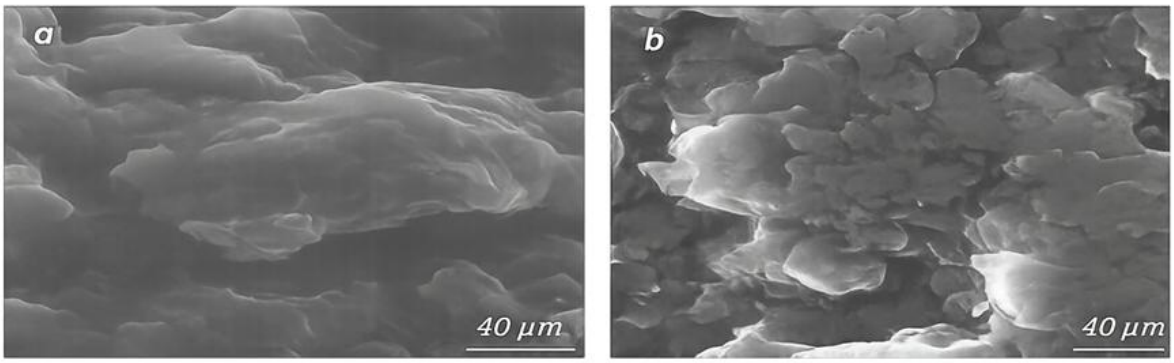
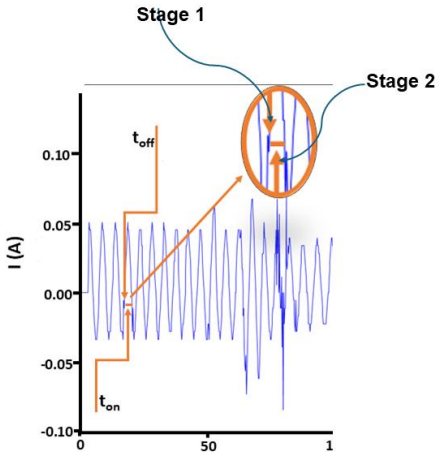


Figura 3.2. Morfologia SEM a) a materialului de grafen depus pe mătase; și b) a grafenului modificat cu α-CD.

3.2. Metoda stocastică

Ca tehnică a fost aleasa cronamperometria. Valoarea optimă a potențialului de lucru a fost determinată astfel încât să se obțină o valoare pentru t_{off} care să poată fi citită în mod fiabil atât manual, cât și automat. Valoarea optimă a fost de 0,125 V; la valori mai mici ale potențialului (inclusiv valori negative), nu s-a observat nicio extracție a analitului în canal (nu s-a obținut niciun semnal); în timp ce, prin aplicarea unor valori mai mari de 0,125 V, valorile t_{off} se situau în intervalul ns, imposibil de citit în mod fiabil. La un potențial de 0,125 V, ionii Cd(II) și Pb(II) au fost extrași din soluție în interfața membrană-soluție, apoi în canal, blocându-l, în timp ce intensitatea curentului a devenit 0 (intervalul de timp corespunzător interacțiunii analitului cu canalul, notat t_{off}, poate fi citit din diagramă și reprezintă parametrul utilizat pentru identificarea calitativă) (Etapa 1) (Schema 3.1.).



Schema 3.1. Mecanismul de generare a curentului în modul stochastic.

În etapa 2 (Schema 3.1), în interiorul canalului au loc procese redox pe parcursul unei anumite perioade de timp numită t_{on}, măsurată în diagramă între două valori consecutive t_{off}; Metoda regresiei liniare a fost utilizată pentru determinarea parametrilor *a* și *b* ai ecuației de calibrare, iar această ecuație a fost utilizată pentru determinarea concentrației ionilor Cd (II) și Pb (II) din nămolul sapropelic.

Caracteristicile de răspuns ale benzii de detectare stocastice propuse sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Caracteristicile de răspuns ale benzii de detectare stocastice pentru determinarea Cd^{2+} și Pb^{2+}, atunci când s-au utilizat soluții standard și nămol sapropelic.

Tipul soluției	**Intervalul de concentrație de lucru (mol L^{-1})**	**Ecuația de calibrare și r***	**Semnătură t_{off} (s)**	**Sensibilitate (s^{-1}/mol L^{-1})**	**Limita de determinare (mol L^{-1})**
Cd^{2+}					
Soluții standard	$1{,}0\times 10^{-17} - 1{,}0\times 10^{-6}$	$1/t_{on} = 0{,}12 + 2{,}96\times 10^{6}$ C; r = 0,9997	1,1	$2{,}96\times 10^{6}$	$1{,}0\times 10^{-17}$
Sapropel	$1{,}0\times 10^{-17}$ -$1{,}0\times 10^{-6}$	$1/t_{on} = 0{,}13 + 3{,}00\times 10^{6}$ C; r=0,9996	1,1	$3{,}00\times 10^{6}$	$1{,}0\times 10^{-17}$
Pb^{2+}					
Soluții standard	$1{,}0\times 10^{-17}$ -$1{,}0\times 10^{-6}$	$1/t_{on} = 0{,}10 + 6{,}80\times 10^{8}$ C; r=0,9541	0,6	$6{,}80\times 10^{8}$	$1{,}0\times 10^{-17}$
Sapropel	$1{,}0\times 10^{-17}$ -$1{,}0\times 10^{-6}$	$1/t_{on} = 0{,}11 + 6{,}74\times 10^{8}$ C; r=0,9544	0,6	$6{,}74\times 10^{8}$	$1{,}0\times 10^{-17}$

* $<t_{on}>$ = s; $<C_{ion}>$ = mol L^{-1} .

S-au obținut valori diferite pentru cei doi ioni, indiferent dacă calibrarea s-a efectuat folosind soluții standard sau nămol. Intervalul de concentrație de lucru, precum și limitele de determinare sunt aceleași pentru ambii ioni, făcând posibilă analiza acestora în nămol de la niveluri de concentrație extrem de mici până la niveluri de μmol L^{-1}. S-au înregistrat sensibilități ridicate pentru ambii ioni. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între calibrările efectuate folosind soluții standard și nămol în ceea ce privește ecuațiile de calibrare și sensibilitatea.

În timp ce ceilalți senzori raportați până în prezent au limite de determinare de nmol L^{-1} [9-16], în lucrarea de față, Cd (II) și Pb (II) pot fi analizați în mod fiabil până la concentrații de 0,01 fmol L^{-1}. Limita de determinare foarte scăzută este specifică senzorilor stocastici și reprezintă un avantaj al acestei clase de senzori [38].

Au fost proiectate și utilizate zece benzi de detectare stocastice pentru calibrarea senzorului propus pe soluții standard și pe nămol sapropelic, Au fost calculate sensibilitățile obținute pentru fiecare dintre cele zece benzi stocastice, iar variațiile dintre aceste sensibilități și valoarea medie a sensibilităților au fost de 0,04% și 0,05% pentru determinarea Cd (II) și Pb (II), dovedind că proiectarea benzilor de detectare stocastice este fiabilă. Calibrările au fost continuate timp de încă 30 de zile, iar sensibilitățile obținute au fost comparate; s-au obținut variații de 0,07% și 0,05% pentru determinarea Cd (II) și Pb (II), ceea ce demonstrează stabilitatea în timp a benzilor propuse. Două loturi de câte zece benzi de detectare au fost depozitate la temperatura camerei, în cutii de plastic. Timp de 10 săptămâni s-a prelevat din fiecare cutie o bandă de detectare, iar sensibilitatea acesteia a fost determinată. Sensibilitățile

obținute au fost comparate după 8 săptămâni, când s-au înregistrat variații de 0,03% și 0,04% pentru determinarea Cd (II) și Pb (II), demonstrând că benzile de detectare sunt stabile în timp.

3.3. Selectivitatea senzorului stocastic

Selectivitatea senzorilor stocastici este dată de diferențele dintre valorile t_{off} înregistrate pentru diferiți analiți dintr-un amestec; o diferență de cel puțin 0,2 s indică selectivitatea. Ioni precum Cr^{3+}, Fe^{3+}, Hg_2^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} au fost verificați ca potențiale surse de interferență.

Tabelul 3.2. Selectivitatea benzilor de detectare stocastice (N=10).

Semnătură, s						
Pb^{2+}	Cd^{2+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Hg_2^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
0,6±0,1	1,1±0,1	1,8±0,1	1,5±0,1	2,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1

Rezultatele prezentate în Tabelul 3.2 au demonstrat că nu există interferențe din partea Cr^{3+}, Fe^{3+}, Hg_2^{2+}, Cu^{2+} și Zn^{2+} asupra determinării ionilor Cd^{2+} și Pb^{2+}.

3.4. Validarea benzilor de detectare stocastice ultrasensibile utilizate pentru determinarea ionilor Cd^{2+} și Pb^{2+} în nămolul sapropelic

Toate probele au fost analizate la fața locului folosind senzorul proiectat, minipotențiostatul portabil și smartphone-ul. Ionii de Cd și Pb au fost identificați în diagrama obținută după scanarea probei de nămol, pe baza valorilor t_{off} (Figura 3.3, Tabelul 3.1), iar ulterior, valorile t_{on} necesare pentru determinarea cantitativă au fost citite și substituite în ecuațiile de calibrare pentru a obține concentrația ionilor de Cd și Pb (Figura 3.3.).

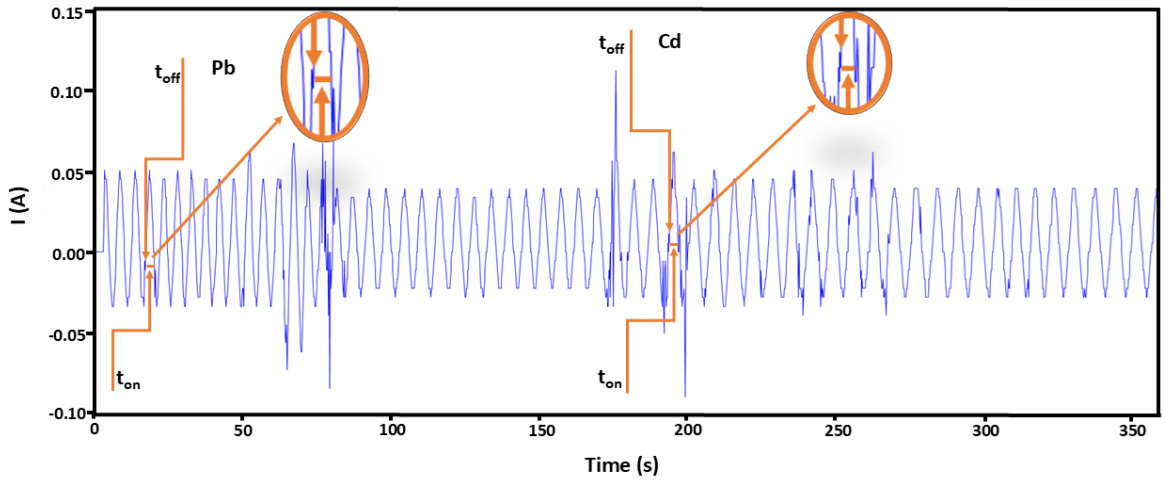


Figura 3.3. Diagrama obținută pentru screeningul nămolului sapropelic folosind banda stocastică 2D. Identificarea Pb (II) și Cd (II) pe baza valorilor t_{off}, precum și citirea valorilor t_{on} utilizate pentru determinarea concentrațiilor.

Rezultatele obținute pentru determinarea ionilor de Cd și Pb în probele de nămol sapropelic prelevate din Lacul Techirghiol, utilizând benzile de detectare stocastice, au fost comparate cu cele obținute prin metoda standard de referință ICP-MS (Tabelul 3). ICP-MS este o metodă multielementară cu un interval analitic larg și limite de detectare foarte scăzute.

Tabelul 3.3. Determinarea ionilor Cd (II) și Pb (II) din nămolul sapropelic (N=10).

Conținut	ng Cd/g de probă		Testul t al lui Student
	Benzi de detectare stocastice	ICP-MS	
Sapropel	127,05 ± 0,08	127,00 ± 0,15	1,76
	ng Pb/g de probă		
Sapropel	147,46 ± 0,05	145,90 ± 0,12	2,20

Compararea rezultatelor a fost realizată prin testul t pereche (Student), aplicat valorilor determinării de Cd și Pb obținute prin metoda propusă și metoda standard de referință ICP-MS, la un nivel de încredere de 99,00%, pentru care valoarea teoretică a lui t din tabele este de 4,032. Valorile calculate (Tabelul 3.3) sunt mai mici decât valoarea teoretică din tabel, ceea ce demonstrează că nu există o diferență statistic semnificativă între rezultatele obținute prin cele două metode.

Au fost efectuate, de asemenea, teste de recuperare a ionilor de Cd și Pb din nămol sapropelic, pentru a confirma validarea metodei. S-au adăugat cantități cunoscute de Cd și Pb în probele de nămol sapropelic, iar concentrațiile determinate pentru cei doi ioni au fost comparate cu concentrațiile teoretice. Rezultatele testelor de recuperare sunt prezentate în Tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Recuperarea ionilor Cd (II) și Pb (II) din nămolul sapropelic (N=10).

Probă	%, Recuperarea ionilor	
	Cd(II)	Pb(II)
Sapropel	99,15 ± 0,07	99,93 ± 0,06

S-au obținut valori ridicate pentru recuperarea ionilor Cd (II) și Pb (II) din nămol sapropelic, ceea ce demonstrează acuratețea testului de screening pentru determinarea celor doi ioni din nămolul sapropelic.

CAPITOLUL 4

Screeningul preliminar al poluanților organici persistenți din apa și nămolul Lacului Techirghiol folosind GC-ECD [105]

4.1. Introducere

Lacul Techirghiol, situat pe litoralul Mării Negre, este cel mai mare lac sărat din România, cu o lungime totală de 7.500 m, o adâncime maximă de 9 m și o salinitate de peste 80 mg/L^{-1}.[64] Contaminarea acestuia poate avea loc prin deversarea ilegală a apelor care conțin pesticide provenite din zonele agricole din jurul lacului.

Poluanții organici persistenți (POP), categoria din care fac parte pesticidele organoclorurate (OCP) și bisfenolii policloruraţi (PCB), se caracterizează prin rezistență la degradarea biotică și abiotică, lipofilicitate ridicată, volatilitate și capacitate de transport la distanță prin curenți de aer și apă. Acumularea lor în ecosisteme acvatice și sedimente poate conduce la concentrații ce depășesc pragurile de risc pentru sănătate, provocând efecte hepatotoxice, neurotoxice, perturbatoare endocrine, cardiovasculare și carcinogene.

Principala problemă este că aceste substanțe se acumulează până la niveluri care pot crea probleme atât pentru mediul marin și lacustru, cât și pentru sănătatea persoanelor care utilizează apa sau nămolul provenit din aceste surse.

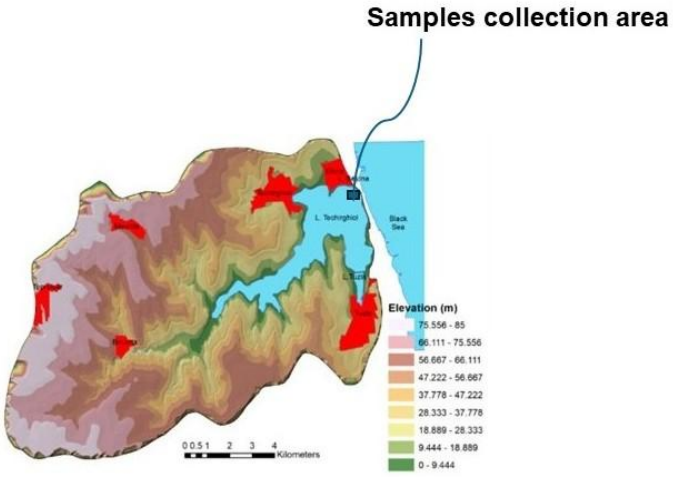
Pesticidele organoclorurate se numără printre primele mijloace eficiente de combatere a dăunătorilor și agenților patogeni ai plantelor, dar pot suferi bioacumulare și bioconcentrare. [44]

Cel mai cunoscut și cel mai utilizat pesticid din lume este diclorodifeniltricloretanul, care a fost deseori identificat în unele ape și în probe de nămol sapropelic la diferite adâncimi. [44]

Nămolul este utilizat în mod regulat în diferite proceduri terapeutice [45-49]; prin urmare, este important ca acesta să fie lipsit de pesticide, care pot provoca efecte nedorite în timpul și după tratament.

Prezenta lucrare își propune să prezinte rezultatele unei analize preliminare a conținutului de compuși bisfenolici policlorurați și de pesticide organoclorurate din apa și nămolul din Lacul Techirghiol, utilizând cromatografia de gaze cu un detector de captură de electroni (ECD). Detectorul cu captură de electroni a fost utilizat în analiză datorită sensibilității sale ridicate la analitul electronegativ , care este capabil să capteze electroni. Această sensibilitate face ca ECD să fie ideal pentru detectarea urmelor de compuși chimici, cum ar fi compușii halogenați, într-o probă.

Pentru atingerea obiectivelor lucrării, au fost colectate probe de nămol împreună cu apa din zona adiacenta de exploatare a lacului Techirghiol și prelucrate pentru separarea și determinarea compușilor organici persistenți utilizând un sistem GC- ECD.



Schema 4.1. Harta Lacului Techirghiol cu indicarea locului de unde au fost prelevate probele.

4.1.1. Determinarea pesticidelor organoclorurate și a bisfenolilor policloruraţi

Pentru determinarea acestor compuși, s-a utilizat un cromatograf de gaze Perkin Elmer Clarus 500 (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, SUA), cuplat cu un sistem de detectare prin captură de electroni.

Tabelul 4.1. Limitele de detectare determinate pentru poluanții analizați în apa Lacului Techirghiol.

Nr.	Compus	LOD (µg L^{-1})
1	HCB	0,0002
2	Lindan	0,0003
3	Heptaclor	0,0001
4	Aldrin	0,0002
5	p,p'DDE	0,0001
6	Dieldrin	0,0001

7	Endrin	0,0002
8	p,p'DDD	0,0002
9	p,p'DDT	0,0001
10	PCB28	0,0004
11	PCB52	0,0003
12	PCB101	0,0005
13	PCB118	0,0003
14	PCB153	0,0005
15	PCB138	0,0007
16	PCB180	0,0002

Limita de detectare (LOD) pentru poluanții analizați în nămolul din Lacul Techirghiol s-a situat în intervalul 0,0001 - 0,0003 µg/kg de nămol liofilizat pentru OCP-uri, iar pentru PCB-uri, valorile s-au situat în intervalul 0,0002 - 0,0007 µg de nămol liofilizat (Tabelul 4.2.).

Tabelul 4.2. Limitele de detectare stabilite pentru poluanții analizați în nămolul din Lacul Techirghiol.

Nr.	Compus	LOD µg/kg de nămol liofilizat
1	HCB	0,0002
2	Lindan	0,0003
3	Heptaclor	0,0001
4	Aldrin	0,0002
5	p,p'DDE	0,0001
6	Dieldrin	0,0001
7	Endrin	0,0002
8	p,p'DDD	0,0002
9	p,p'DDT	0,0001

10	PCB28	0,0004
11	PCB52	0,0003
12	PCB101	0,0005
13	PCB118	0,0003
14	PCB153	0,0005
15	PCB138	0,0007
16	PCB180	0,0002

Validarea metodei a inclus evaluarea timpului de retenție (RT), a liniarității (R^2) și a limitelor de detectare (LOD) pentru fiecare compus. Au fost întocmite curbe de calibrare pentru toți analiții, care au prezentat o liniaritate excelentă ($R^2 > 0,9587$ pentru OCP-uri, $R^2 > 0,9734$ pentru PCB-uri). Pentru a asigura acuratețea și precizia, au fost incluse martori de procedură, probe îmbogățite și standarde interne. Recuperările au variat între 85 și 110%, indicând o performanță acceptabilă a metodei.

Tabelul 4.3. Determinarea pesticidelor organoclorurate în probe de apă prelevate din apropierea nămolului din Lacul Techirghiol (N=3).

Nr. probă	Compus	Concentrație, PCB µg/kg de nămol liofilizat
1	PCB28	0,050±0,006
2	PCB52	0,040±0,008
3	PCB101	0,0003 ± 0,0002
4	PCB118	0,0010 ± 0,0006
5	PCB153	0,0010 ± 0,0008
6	PCB138	0,0010 ± 0,0005
7	PCB180	0,0003 ± 0,0001

Tabelele 4.3 și 4.4 prezintă rezultatele obținute prin metoda cromatografiei de gaze pentru determinarea pesticidelor organoclorurate și a bisfenolilor policlorurați în probele de apă prelevate din Lacul Techirghiol.

Tabelul 4.4. Determinarea conținutului de bisfenoli policlorurați în probele de apă prelevate din zona adiacentă nămolului din Lacul Techirghiol (N=3).

Nr. probă	Compus	Concentrația OPC, μg L^{-1}
1	Hexaclorbenzen	0,42 ± 0,14
2	Lindan	9,06 ± 0,32
3	Heptaclor	11,71±0,21
4	Aldrin	13,85±0,11
5	p,p'-diclorodifenildicloretilenă	4,65 ± 0,22
6	Dieldrin	10,73 ± 0,17
7	Endrin	6,98±0,10
8	p,p'-diclorodifenildicloretan	34,95±0,18
9	p,p'-diclorodifeniltricloretan	14,02 ± 0,22

Concentrațiile de pesticide organoclorurate, care reprezintă valoarea medie a trei măsurători, s-au situat în intervalul 0.42 - 34.95 μg /L^{-1}, ceea ce poate constitui un semnal de alarmă, având în vedere că limita admisă în apele marine conform reglementărilor naționale este de 0,1 μg/ L^{-1}pentru fiecare compus. Abaterile standard față de medie sunt prezentate în tabel.

Concentrațiile medii ale bisfenolilor policlorurați sunt cu mult sub 1 μg/L^{-1} variind între 0,003 și 0,02 μg/L^{-1}. Abaterile standard față de medie sunt prezentate în tabel. Cromatogramele obținute pentru separarea și determinarea bisfenolilor policlorurați din apa din Lacul Techirghiol și, respectiv, din proba de control, sunt prezentate în figurile 4.1 și 4.2.

Vârfurile obținute pentru compușii analizați în proba de apă (Figura 4.1) și în probele martor (Figura 4.2) au fost comparate la același timp de retenție pentru a determina concentrația

poluanților din apa și nămolul lacului Techirghiol. S-a observat o separare foarte bună a acestor compuși folosind metoda cromatografică de analiză propusă, întrucât toate vârfurile sunt bine definite și s-a obținut o rezoluție bună.

Tabelul 4.5 prezintă rezultatele obținute pentru determinarea compușilor de bisfenoli policlorurați în proba de nămol prelevată din Lacul Techirghiol (N=3).

Tabelul 4.5. Determinarea conținutului de bisfenoli policlorurați în probele de nămol prelevate din Lacul Techirghiol (N=3).

Nr.	Compus	Concentratia, PCB µg/kg de nămol liofilizat
1	PCB28	0.050±0.006
2	PCB52	0.040±0.008
3	PCB101	0.0003±0.0002
4	PCB118	0.0010±0.0006
5	PCB153	0.0010±0.0008
6	PCB138	0.0010±0.0005
7	PCB180	0.0003±0.0001

Au fost înregistrate valori foarte scăzute pentru concentrațiile de PCB: în probele de nămol s-au constatat valori medii ale celor trei determinări cuprinse între 0,0003 și 0,05 PCB µg/kg de nămol liofilizat. Abaterile standard au fost foarte mici. Deși apa din lac conține cantități ușor mai mari de PCB, se pare că PCB-urile nu au avut timp să se acumuleze în nămol.

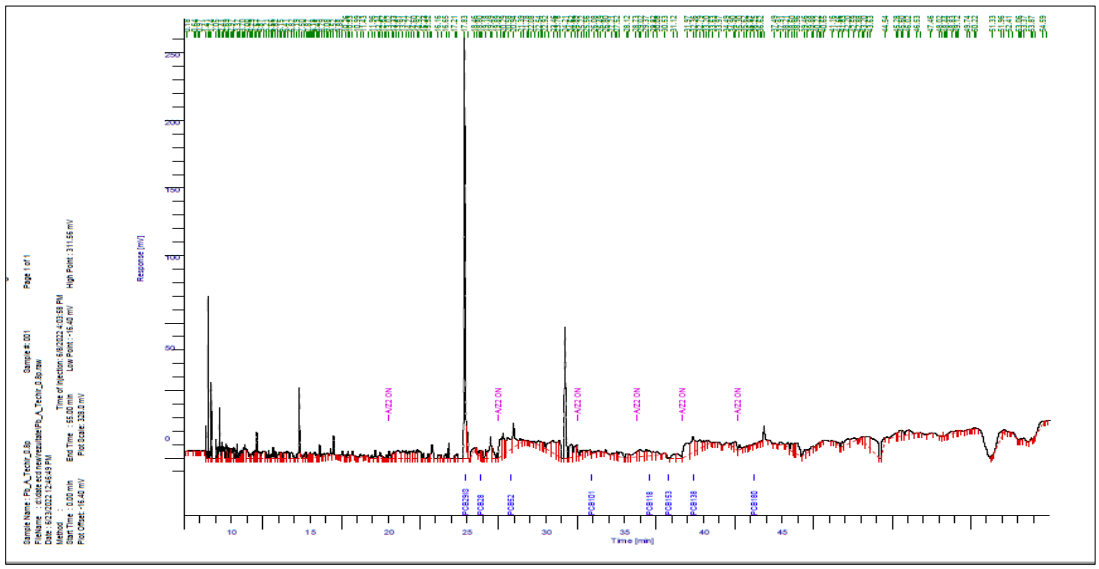


Figura 4.1. Cromatogramă care ilustrează separarea și determinarea bisfenolilor policlorurați din apa din vecinătatea nămolului din Lacul Techirghiol.

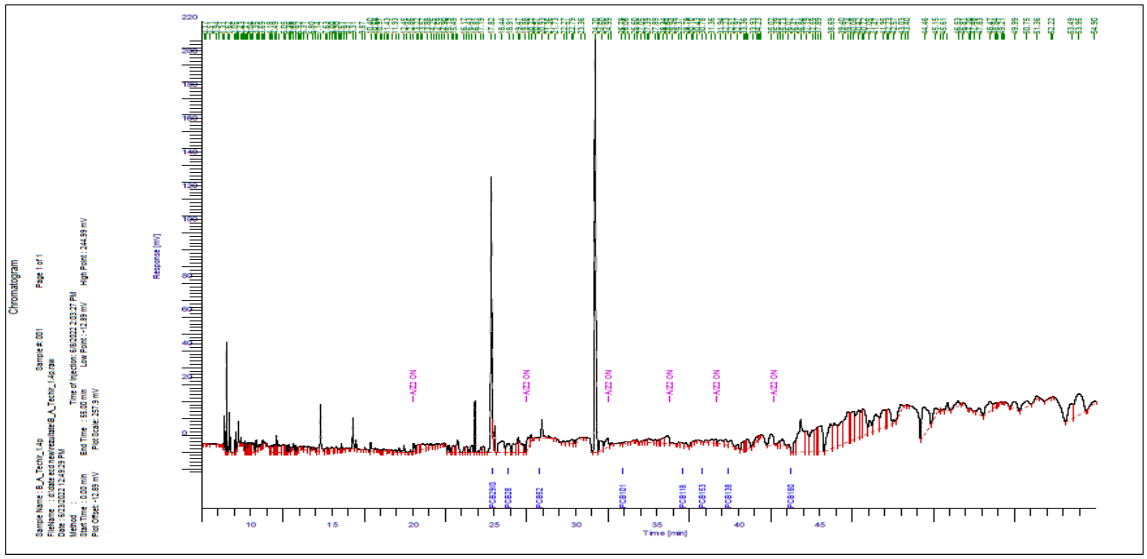


Figura 4.2. Cromatogramă care ilustrează separarea și determinarea bisfenolilor policlorurați pentru probele de control.

Tabelul 4.6 prezintă concentrația de pesticide organoclorurate din probele de nămol, determinată prin cromatografie de gaze cuplată cu un detector de captură de electroni.

S-a constatat că probele de nămol conțin pesticide organoclorurate în concentrații cuprinse între 0,0002 și 6,35 µg/kg de nămol liofilizat, limitele în apa de mare și în substratul sedimentar marin fiind de 1 µg L^{-1}și, respectiv, 1 µg/kg de nămol liofilizat, pentru fiecare compus. Concentrațiile de compuși policlorurați de bifenil (OCP) din nămol sunt mai mici decât cele din apa lacului Techirghiol, ceea ce dovedește că nici acești compuși nu se acumulează în nămol.

Se observă o ușoară contaminare cu compuși de bisfenoli policlorurați atât în apa lacului, cât și în nămol, care pot dăuna sănătății umane, deși se încadrează sub limita stabilită de autoritățile naționale. În ceea ce privește pesticidele organoclorurate, s-au constatat concentrații semnificative în apa din Lacul Techirghiol, în timp ce concentrația acestora în nămol s-a încadrat în limitele stabilite de autoritățile naționale (sunt permise concentrații mai mici de 0,1 µg/kg [50]), cu excepția lindanului și a aldrinului, care depășesc aceste limite.

Tabelul 4.6. Determinarea conținutului de pesticide organoclorurate în probele de nămol prelevate din Lacul Techirghiol (N=3).

Nr. probă	Compus	Concentrația de OCP, µg/kg de nămol liofilizat
1	Hexaclorbenzen	0,0003 ± 0,0001
2	Lindan	6,35 ± 0,21
3	Heptaclor	0,0002±0,0001
4	Aldrin	1,12 ± 0,11
5	p,p'-diclorodifenildicloretilenă	0,0002±0,0001
6	Dieldrin	0,0002±0,0001
7	Endrin	0,0003 ± 0,0001
8	p,p'-diclorodifenildicloretan	0,030 ± 0,009
9	p,p'-diclorodifeniltricloroetan	0,0002±0,0001

Pesticidele identificate în cadrul acestui studiu au fost raportate anterior și de Oros et al. [50], precum și de Lazar et al. [51] în Marea Neagră și zona înconjurătoare, demonstrând că zona de

coastă se confruntă cu o poluare difuză provenită din zonele agricole în care au fost utilizate pesticidele, o sursă importantă fiind și inundațiile din ultimii ani din bazinele hidrografice ale pârâurilor Valea Biruința și Valea Urlichioi. Practic, calitatea apei și a nămolului din Lacul Techirghiol este puternic influențată de activitățile umane, precum agricultura și lucrările hidrotehnice desfășurate în bazinul său hidrografic [52, 53].

CAPITOLUL 5

Determinarea acidului humic în nămolul și apa din Lacul Techirghiol și n[molul din Marea Moartă

5.1. Analiza rapidă a acidului humic în probele de nămol și apă [106]

5.1.1. Introducere

Acidul humic este una dintre cele mai importante componente ale nămolului, având un spectru larg de activitate farmacologică . Până în prezent, pentru determinarea acidului humic în probele de nămol a fost propusă o metodă de analiză spectrofotometrică , în timp ce pentru determinarea acidului humic în îngrășăminte a fost dezvoltată o metodă de cromatografie lichidă . Atât metoda de analiză spectrofotometrică, cât și cea cromatografică lichidă necesită o etapă de pregătire îndelungată și laborioasă a probelor înainte de determinarea acidului humic, cu derivatizări în cazul cromatografiei lichide, consumabile de înaltă puritate analitică, în timp ce durata analizei este mare și intervalul de concentrații de lucru este limitat, probele necesitând, în majoritatea cazurilor, etape de preconcentrare.

Există o nevoie de dezvoltare a unor metode de analiză rapide și fiabile pentru determinarea acidului humic în probele de nămol, având în vedere acțiunile sale terapeutice. Electroanaliza este o metodă extrem de fiabilă, bazată pe utilizarea diferitelor tipuri de senzori, care sunt ușor de utilizat pentru analiza directă a diferiților analiți din matrici simple până la complexe. Senzorii stocastici reprezintă o abordare modernă în electroanaliza substanțelor organice și anorganice.

Datorită sensibilității și fiabilității ridicate, aceștia pot determina mai întâi calitativ, iar ulterior cantitativ, substanțe din matrici simple până la complexe, la niveluri de concentrație foarte scăzute. Prin urmare, a fost propus un senzor stocastic pentru determinarea acidului humic în probele de nămol. Noutatea lucrării constă în proiectarea senzorului stochastic 2D utilizat pentru determinarea acidului humic în nămol, precum și în electroanaliza acidului humic din probele de nămol prelevate din lacul Techirghiol și din Marea Moartă, dar si din apa prelevată din Lacul Techirghiol. S-a utilizat o soluție de heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină ($1x10^{-3}$mol L^{-1}) pentru a modifica suprafața unui electrod serigrafiat, a cărui suprafață activă a fost acoperită cu nanotuburi de carbon cu perete unic (SWCNT). Utilizarea ciclodextrinei a facilitat formarea unor canale foarte stabile, necesare pentru măsurătorile stocastice.

5.1.2. Proiectarea senzorului stocastic 2D

Pe suprafața electrozilor serigrafiați , a căror suprafață este acoperită cu SWCNT , s-a adaugat o picătură dintr-o soluție de concentratie 10^{-3} mol L^{-1} heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină. Proiectarea electrodului serigrafiat este prezentată în Figura 5.1. Electrodul a fost lăsat să se usuce sub o sticlă timp de 2 ore. Când nu era utilizat, electrodul a fost păstrat la temperatura camerei.

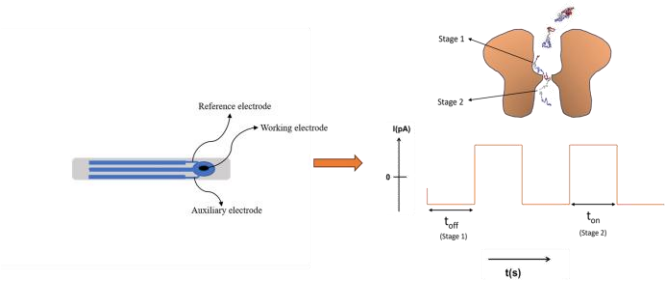


Figura 5.1. Reprezentare schematică a senzorului stocastic 2D.

5.1.3. Metoda stocastică

Pentru detectarea stocastică a fost aleasă o tehnică cronoamperometrică, măsurătorile valorilor t_{on} și t_{off} fiind efectuate la un potențial constant de 100 mV față de Ag/AgCl. O picătură din soluția conținând acid humic a fost adăugată pe suprafața celulei cu electrod stocastic 2D. Diagramele au fost înregistrate pentru diferite soluții care conțineau acid humic, iar valorile t_{off} ale acidului humic și a lui t_{on} au fost determinate (Figura 5.1). Ecuațiile de calibrare au fost determinate pe baza rezultatelor metodei de regresie liniară. Au fost adăugate probe de nămol și apă pe suprafața celulei cu electrod stochastic 2D. Valorea t_{off} a acidului humic a fost utilizată pentru identificarea acestuia în diagramă. Concentrațiile necunoscute de acid humic au fost determinate prin introducerea valorilor lui $1/t_{on}$ obținute în urma măsurătorilor probelor în ecuația de calibrare. Semnalul este preluat cu ajutorul unui smartphone prin Bluetooth de la instrumentul de măsurare, facilitând analiza rapidă a acestuia și determinarea rapidă a concentrației de acid humic.

5.1.4. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic 2D utilizat pentru determinarea acidului humic

Atunci când s-a aplicat un potențial de 100 mV, acidul humic a pătruns în canal și l-a blocat până când a ajuns în interior (curentul scade la 0 A), timpul necesar pentru această etapă se numește t_{off} și i se atribuie valoarea sa caracteristică. În interiorul canalului au loc procese redox, iar timpul necesar pentru această etapă este atribuit valorii t_{on} utilizate pentru determinarea cantitativă a acidului humic (Figura 5.1).

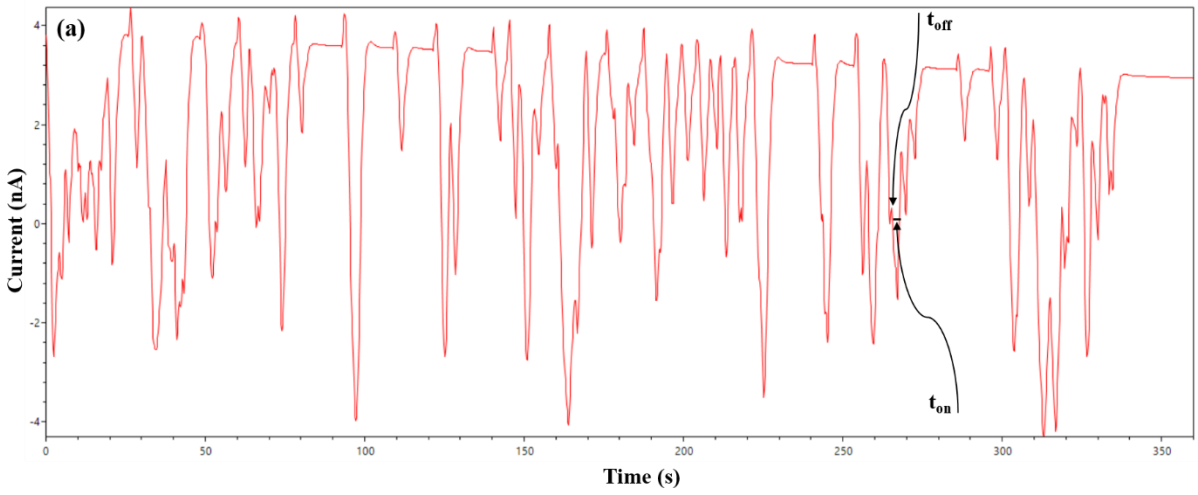
Senzorul stochastic propus a fost utilizat într-un interval de concentrație liniar cuprins între 1×10^{-18}g/mL și 1×10^{-2}g/mL, cu o sensibilitate de $1{,}61\times10^{9 s^{-1} g^{-1}}$ mL și o limită de cuantificare de

$1x10^{-18}$g mL^{-1}. Intervalul larg de concentrații liniare facilitează determinarea acidului humic atât în probele cu concentrații foarte scăzute de acid humic, cât și în probele cu conținut ridicat de acid humic; preconcentrarea nu va fi necesară dacă se utilizează senzorul propus. Ecuația de calibrare a fost:

$1/t_{on} = 0.05(\pm0.02) + 1.61(\pm0.03)x10^{9} C_{humic\ acid}$, cu o valoare r de 0,9999, în urma efectuării a 10 măsurători. Valoarea t_{on} a fost citită în s, iar concentrația, C, g mL^{-1}. Semnătura acidului humic a fost de 0,9 s.

5.1.5. Electroanaliza acidului humic în probele de nămol și apă

Probele de nămol și apă au fost utilizate așa cum au fost prelevate din lacul Techirghiol și din Marea Moartă. Măsurătorile au fost efectuate și la fața locului, în lacul Techirghiol și în Marea Moartă. Au fost înregistrate diagrame (**Figura 5.2.**), iar citirile valorilor t_{off} au fost efectuate pentru a identifica acidul humic în diagramă.



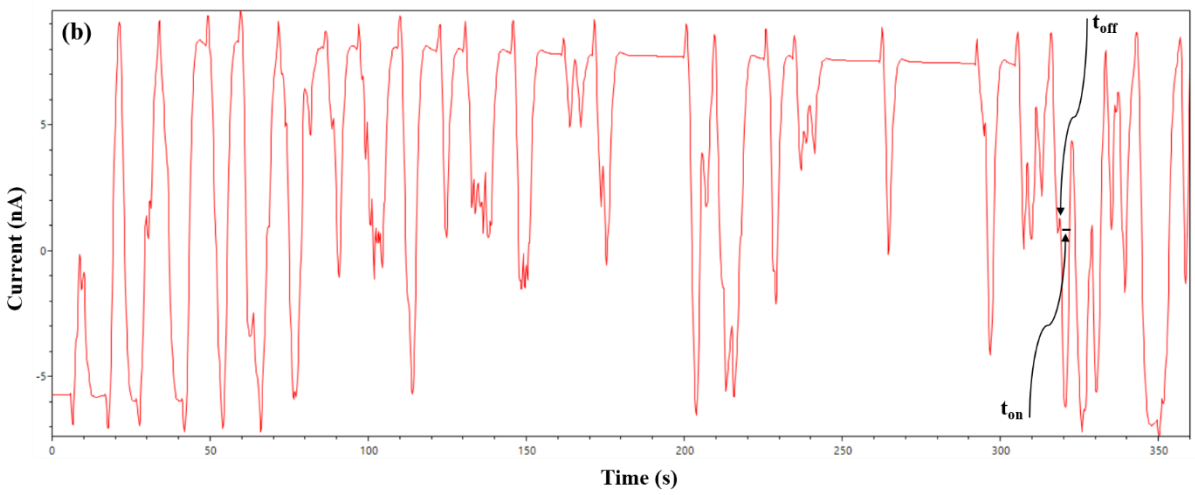


Figura 5.2. Exemple de diagrame obținute la utilizarea senzorului stochastic 2D pentru analiza probelor de a) nămol și b) apă.

Folosind valorile t_{on} introduse în ecuația de calibrare, s-au determinat concentrațiile de acid humic din probele de nămol și apă. Tabelul 1 prezintă rezultatele obținute folosind metoda stocastică propusă, precum și o metodă de analiză HPLC [3].

Tabelul 5.1. Determinarea acidului humic în probele de nămol și apă (N=10).

Probă	**Acid humic**	
	Metoda stocastică 2D SWCNT/TRIMEB	HPLC [4]
Apă din lacul Techirghiol*	32,54±0,02	31,97 ± 1,32
Noroi din lacul Techirghiol**	483,43±0,05	484,02 ± 1,76
Nămol din Marea Moartă**	741,91±0,04	743,20 ± 1,95

*pg/mL; **pg acid humic/g nămol

S-a observat o corelație foarte bună între rezultatele obținute folosind ambele metode de analiză a acidului humic. Aceste corelații au fost demonstrate și prin testul t pereche (Student) la un nivel de încredere de 99%, pentru fiecare tip de probă analizată. La acest nivel de încredere, valoarea

din tabel era de 4,13. Valoarea obținută pentru probele de nămol a fost de 3,20, iar pentru proba de apă de 1,93. Toate valorile înregistrate au fost mai mici decât valoarea din tabel, ceea ce demonstrează că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute prin cele două metode: metoda stocastică și HPLC, atunci când sunt utilizate pentru determinarea acidului humic în probele de nămol și apă.

Recuperarea acidului humic din probele de nămol și apă a fost efectuată ca o a doua etapă de validare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.2.

Tabelul 5.2. Recuperarea acidului humic din probele de nămol și apă (N=10).

Probă	**%, Recuperare Acid humic**
Apă din lacul Techirghiol	99,98±0,01
Sapropel din lacul Techirghiol	98,93 ± 0,03
Sapropel din Marea Moartă	98,20±0,03

S-au obținut valori ridicate ale recuperării și valori foarte scăzute ale RSD (%), ceea ce demonstrează acuratețea și fiabilitatea metodei de analiză electroanalitică propuse, bazată pe utilizarea unui electrod stocastic 2D pentru determinarea acidului humic în probele de nămol și apă.

Metoda propusă, utilizată pentru determinarea acidului humic în probele de nămol și apă, a fost evaluată, de asemenea, din punct de vedere al caracterului ecologic, al practicabilității și al

aplicabilității. Indicatorii de caracter ecologic au fost determinați utilizând abordarea și software-ul AGREE, urmând cele 12 criterii prevăzute în cadrul acestei abordări.

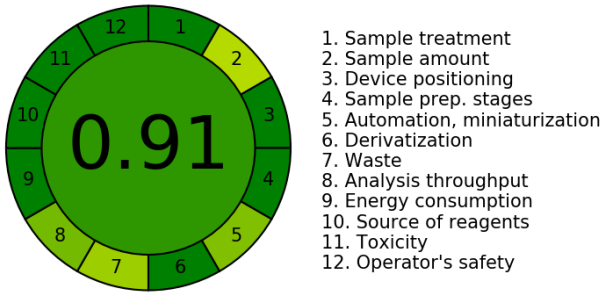


Figura 5.3. Rezultatele analizei AGREE pentru electroanaliza acidului humic din probele de nămol și apă, luând în considerare o contribuție egală a tuturor criteriilor.

Pentru evaluarea metodei din punct de vedere al caracterului practic și al aplicabilității s-au utilizat indicele de aplicabilitate Blue (BAGI) și un software. Cele zece criterii luate în considerare în această metodă sunt: tipul de analiză, numărul de analiți determinați simultan, tehnica analitică și instrumentele analitice necesare, numărul de probe care pot fi prelucrate simultan, pregătirea probei, numărul de probe care pot fi analizate pe oră, tipul de reactivi și materialele d utilizate în metoda analitică, necesitatea preconcentrării, gradul de automatizare, cantitatea de probă. Rezultatele indicelui BAGI sunt prezentate în Figura 5.4.

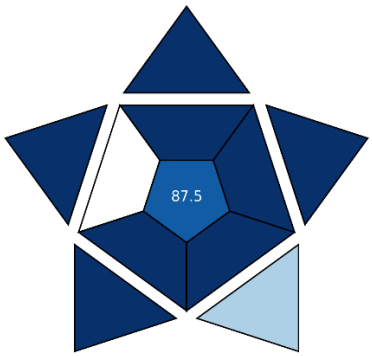


Figura 5.4. Pictograma indicelui BAGI obținută atunci când s-a utilizat electroanaliza pentru determinarea acidului humic în probe de nămol și apă.

Conform BAGI, 10 puncte – care reprezintă numărul maxim de puncte – corespund culorii albastru închis, albastru deschis corespunde pentru 5 puncte, iar albul corespunde pentru 2,5 puncte. Pictograma (Figura 5.4.) arată că 8 din cele zece criterii au fost evaluate cu 10 puncte : analiza este calitativă și de confirmare, pentru analiză s-au utilizat un smartphone și un instrument portabil, probele pot fi măsurate simultan, nu este necesară pregătirea probelor, se pot analiza peste 10 probe pe oră, toți reactivi sunt disponibili, nu este necesară preconcentrarea, cantitatea de probă necesară pentru analiză este mai mică de 100 µL.

5.2. Senzor electrochimic pentru determinarea acidului humic în probe de nămol sapropelic și apă [107]

5.2.1. Introducere

Nămolul sapropelic din Lacul Techirghiol, precum și nămolul din Marea Moartă, sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor cosmetice și terapeutice, majoritatea acestor proprietăți fiind

asociate cu prezența acidului humic în compoziția lor. Determinarea acidului humic în nămolul sapropelic și în apele care conțin acid humic este necesară înainte de utilizarea acestora ca agenți terapeutici, deoarece poluanții pot afecta concentrația acestuia; s-a înregistrat o scădere a concentrației de acid humic în probele de nămol sapropelic și apă poluate [58-60].

Până în prezent, au fost propuse metode de analiză spectrometrică [57, 61, 62], metode de analiză electrochimică calitativă [62], o metodă de analiză stocastică [63], precum și metode de analiză cromatografică [64] pentru determinarea acidului humic din probe de nămol și apă. Cu excepția metodei stocastice de analiză, toate celelalte metode propuse până în prezent au necesitat o prelucrare laborioasă a probei înainte de analiză. Îmbunătățirea limitelor de determinare și de detectare, precum și a sensibilității și selectivității, este necesară pentru determinarea fiabilă a acidului humic în probele de nămol sapropelic și de apă. Utilizarea senzorilor electrochimici cu o suprafață activă bazată pe nanomateriale poate facilita scăderea limitelor de determinare și cuantificare, precum și creșterea sensibilității [63, 65-67].

Noutatea acestei lucrări constă în determinarea acidului humic prin utilizarea unui senzor electrochimic bazat pe modificarea nanotuburilor de carbon cu perete unic cu heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină, ceea ce a crescut sensibilitatea măsurătorilor.

5.2.2. Proiectarea senzorului electrochimic

Senzorii serigrafiati DRP-110 SWCNT au fost modificați cu o soluție de heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină ($1x10^{-3}$mol L^{-1}). S-au adaugat 20 μL din această soluție pe suprafața senzorului DRP-110 SWCNT și s-a lăsat să acționeze timp de 3 ore la temperatura

camerei până la utilizarea pentru măsurători. Senzorii modificați au putut fi păstrați la temperatura camerei timp de mai mult de o lună.

5.2.3. Caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic

Pentru toate măsurătorile efectuate cu ajutorul senzorului electrochimic de unică folosință propus s-a utilizat metoda DPV. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor sunt prezentate în Tabelul 5.3.

Tabelul 5.3. Caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic

Intervalul de concentrație de lucru (g mL^{-1})	1.00×10^{-14} - 1.00×10^{-8}
Ecuația de calibrare (<I>=μA, $<C_{HA}>$=g $^{mL^{-1}}$)	$I = 110.08 + 5.31\times10^{-11} \times C_{HA}$
Coeficientul de corelație	0,9976
Sensibilitate (μA g^$^{-1}$ mL)	$5,31\times10^{-11}$
Limita de cuantificare (g mL^{-1})	$1,00\times10^{-14}$
Limita de determinare (g ml^{-1})	3.00×10^{-15}
Număr de puncte de date	7

S-a înregistrat un interval larg de concentrații de lucru (Fig. 5.1) pentru determinarea acidului humic, ceea ce a făcut posibilă determinarea acestuia fără o etapă de preconcentrare. Limita de cuantificare a fost determinată în conformitate cu recomandările IUPAC [56], ca fiind cea mai mică concentrație din intervalul de concentrații de lucru ; limita de cuantificare este de 10fg mL^{-1} mai mică decât cele raportate anterior. Limita de determinare stabilită a fost de 3fg mL^{-1} mult mai mică decât limitele de detectare raportate [57-62] până în prezent.

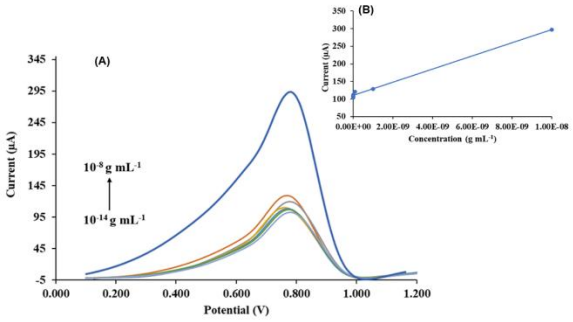


Fig. 5.5. (**A**) Voltamograme cu impulsuri diferențiale obținute pentru calibrarea senzorului (viteză de scanare de 0,05 V s^{-1}); (**B**) graficul de calibrare al senzorului de unică folosință utilizat pentru determinarea acidului humic

Reproductibilitatea proiectării senzorilor a fost determinată după cum urmează: au fost fabricați zece senzori conform procedurii descrise mai sus; pentru fiecare dintre senzori s-a determinat sensibilitatea și s-a raportat abaterea standard relativă față de valoarea medie. S-a înregistrat o abatere standard relativă de 1,74%, ceea ce demonstrează reproducibilitatea bună a proiectării senzorului. Pentru a evalua stabilitatea în timp, sensibilitatea a fost măsurată pe o perioadă de 30 de zile, când s-a înregistrat o abatere standard relativă de 2,15%, ceea ce demonstrează stabilitatea bună în timp a senzorului propus.

5.2.4. Selectivitatea senzorului electrochimic

Selectivitatea senzorului electrochimic propus a fost determinată utilizând metoda soluției mixte: măsurătorile soluțiilor care conțin atât acid humic, cât și posibilul interferent vor fi comparate cu cele obținute pentru o soluție care conține doar acid humic; în ambele soluții, acidul humic va avea aceeași concentrație, în timp ce concentrația interferentului va fi de zece ori mai mare decât cea a acidului humic. Estradiolul, NH_4^+ și Fe^{2+} au fost studiați ca posibili interferenți.

Au fost determinate constantele de selectivitate amperometrice; valorile acestora sunt prezentate în Tabelul 5.4.

Tabelul 5.4. Coeficienți de selectivitate amperometrică

K_{sel}^{amp}		
Estradiol	NH_4^+	Fe^{2+}
$1{,}20\times 10^{-4}$	$1{,}00\times 10^{-4}$	1.03×10^{-4}

Toate valorile înregistrate pentru coeficientul de selectivitate amperometrică au fost de ordinul de marime 10^{-4}, dovedind că senzorul de unică folosință propus este selectiv față de substanțele testate.

5.3. Validarea senzorului electrochimic de unică folosință pentru determinarea acidului humic în probe de nămol și apă

Pentru validarea metodei au fost utilizate probe de nămol și apă prelevate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă. Probele nu au fost supuse niciunei pregătiri înainte de efectuarea măsurătorilor. Rezultatele obținute privind conținutul de acid humic din probe au fost comparate cu cele obținute prin metoda HPLC propusă anterior de Brondi et al. [93] (Tabelul 5.5).

Tabelul 5.5. Determinarea acidului humic în probele de nămol și apă (N=10)

Probă	**Acid humic**	
	Senzor de unică folosință	HPLC [11]
Apă din lacul Techirghiol*	31,12±0,13	31,97 ± 1,32
Nămol din Lacul Techirghiol**	484,97±0,21	484,02±1,76
Nămol din Marea Moartă**	742,98 ± 0,35	743,20 ± 1,95

*pg/mL; **pg acid humic/g nămol

Voltamogramele DPV obținute pentru determinarea acidului humic în probele de nămol și apă sunt prezentate în figura 5.6.

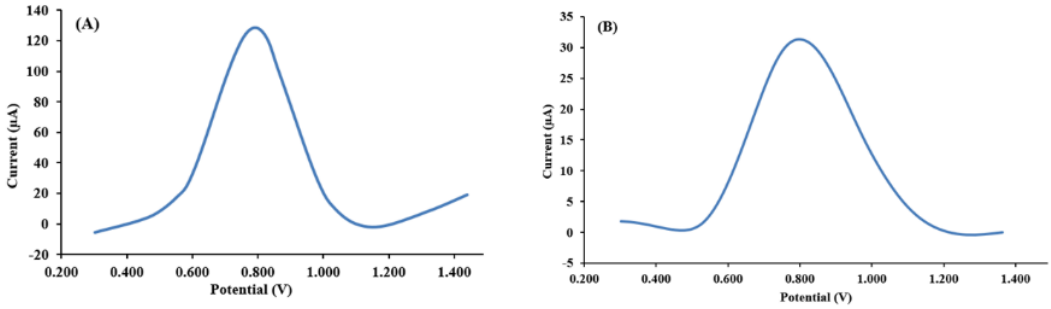


Figura 5.6. Voltamogramele cu impuls diferențial obținute pentru **(A)** probele de apă și **(B)** nămol

Există o bună corelație între rezultatele obținute folosind metoda propusă, bazată pe utilizarea unui senzor electrochimic de unică folosință, și metoda HPLC [64].

Au fost utilizați senzori stocastici și electrochimici pentru determinarea acidului humic în probele de nămol prelevate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă, precum și din apa Lacului Techirghiol. Senzorii s-au dovedit a fi extrem de fiabili pentru determinarea acidului humic în probele menționate. Datorită portabilității instrumentelor, acestea pot fi utilizate pentru determinarea concentrației de acid humic din nămolul și apa mărilor și lacurilor, în scopul stabilirii calității acestora și a stabilirii dacă îndeplinesc condițiile pentru tratamentele prescrise de catre medici.

CAPITOLUL 6

Determinarea ultrasensibilă și rapidă a acidului fulvic în nămolul sapropelic și în apa Lacului Techirghiol [64]

6.1. Introducere

Acidul fulvic este un compus organic humic cu proprietăți antioxidante și antiinflamatorii, utilizat în tratamentul bolilor neurodegenerative [65]. Acidul fulvic are, de asemenea, un potențial terapeutic important în bolile inflamatorii cronice, precum bolile cardiovasculare și colita, precum și în diabet [66]. Nămolul sapropelic [69] și apa din Lacul Techirghiol reprezintă surse importante de acid fulvic natural; efectele lor terapeutice au fost studiate încă din vremuri străvechi. Deși în jurul lacurilor și al locurilor în care s-a format nămolul sapropelic au fost construite clinici, este esențial să se controleze calitatea apei și a nămolului în ceea ce privește componentele care contribuie la sănătatea pacienților [70].

Până în prezent, au fost propuse următoarele metode pentru cuantificarea acidului fulvic în diferite matrice: metode cromatografice [71, 72], extracție/preconcentrare la punctul de întunecare utilizând surfactanți neionici și cationici cu detectare UV prin injecție în flux [73], metode spectrofotometrice [74, 75] și o metodă potențiometrică bazată pe un electrod selectiv de ioni [75]. Aceste metode sunt costisitoare și nu pot fi utilizate pentru determinarea la fața locului a acidului fulvic. În plus, limitele lor de cuantificare sunt mai mari decât concentrația de acid fulvic din diferite probe marine, precum nămolul sapropelic, apa de mare etc.

Pentru determinarea acidului fulvic a fost propusă o metodă de analiză electrochimică bazată pe utilizarea unui electrod serigrafiat pe bază de oxid de grafen [76]. Senzorii electrochimici

pot fi utilizați în testele de screening ale probelor marine cu o fiabilitate mult mai bună, precum și cu sensibilități mai bune, limite de cuantificare mai mici și o selectivitate mai ridicată. Singura metodă electrochimică propusă până în prezent [78] a avut, din păcate, o limită de determinare ridicată (0,27 $\mu g\ L^{-1}$).

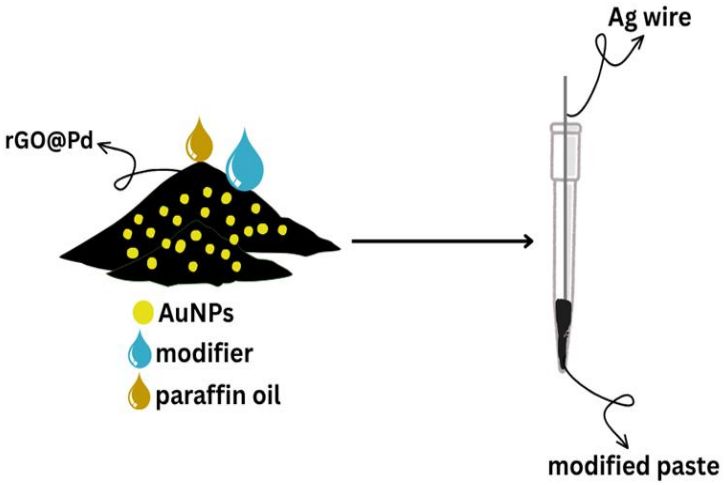
Electroanaliza, din punct de vedere al costului, al pregătirii probelor, al rapidității și al posibilității de utilizare pentru analiza la fața locului, rămâne metoda principală pentru analiza rapidă și ieftină la fața locului a substanțelor din mediul marin [77, 78]. Senzorii stocastici reprezintă o nouă clasă de senzori capabili să efectueze analize calitative și cantitative [79, 80]; matricea nu influențează răspunsul senzorilor stocastici și nu este necesară pregătirea probei, lucru ce facilitează o analiza la fața locului, în timp real, a acidului fulvic.

În această lucrare se propune un senzor stocastic pentru determinarea acidului fulvic în nămolul și în apa Lacului Techirghiol; vor fi investigate sensibilitatea, limita de cuantificare și selectivitatea senzorului, precum și reproductibilitatea acestuia atunci când este utilizat pentru determinarea acidului fulvic în nămol și în apa lacului Techirghiol. Noutatea lucrării constă în utilizarea unui senzor stocastic bazat pe pastă de oxid de grafen redus, decorată cu nanoparticule de aur și paladiu și modificată cu chinină, pentru determinarea ultrasensibilă, rapidă și la fața locului a acidului fulvic din probele de analizat. Utilizarea acestuia va facilita controlul calității în timp real al celor doua resurse naturale, iar având în vedere că rezultatele pot fi transmise in timp real către o bază de date specializată folosind smartphone-ul implicat în achiziția și prelucrarea datelor, se poate obține o hartă privind concentrația acestuia, făcând posibilă luarea imediată a deciziilor cu privire la posibilitatea utilizării apei și a nămolului în scopuri terapeutice sau colectarea acestora pentru extragerea acidului fulvic în laboratoare specializate.

În timp ce oxidul de grafen redus este o matrice foarte bună, capabilă să mențină canalele implicate în determinările stocastice într-o formă constantă, nanoparticulele de aur și paladiu contribuie la conductivitatea grafenului, iar chinina asigură canalele necesare pentru dezvoltarea curentă a senzorilor stochastici. Oxidul de grafen joacă un rol important în nanotehnologie datorită proprietăților sale fizico-chimice reglabile și aplicațiilor interdisciplinare în analiza biomedicală, fiind utilizat și pentru dezvoltarea de senzori portabili pentru monitorizarea continuă a biomarkerilor. Atât nanoparticulele de paladiu, cât și cele de aur s-au dovedit a îmbunătăți conductivitatea matricilor de grafen. Chinina (QN) este un nou modificator propus pentru proiectarea senzorilor electrochimici [85, 86]. Forma în V a chininei favorizează, de asemenea, formarea canalelor necesare pentru generarea semnalului stocastic.

6.2. Proiectarea senzorului stochastic

50 mg de pulbere de oxid de grafen redus@Pd și 10 µL de nanoparticule de Au au fost amestecate cu 20 µL de ulei de parafină pentru a forma o pastă, la care s-au adăugat 50 µL de soluție de chinină (1×10^{-3} mol L^{-1}) pentru a obține pasta modificată. Contactul dintre pasta modificată și circuitul extern s-a realizat cu ajutorul unui fir de Ag. Pasta a fost plasată în tubul imprimat 3D din plastic (Schema 1); materialul plastic al tubului este neconductiv și neporos. Diametrul interior al electrodului de lucru a fost de 5 µm.



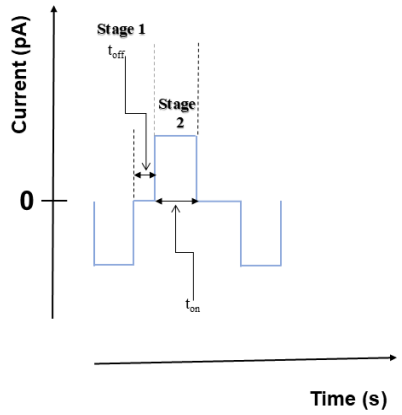
Schema 6.1. Proiectarea senzorului stocastic.

Pentru toate determinările, un minipotentiostat sensit/BT (PalmSens, Houten, Olanda) a fost conectat la un smartphone capabil să transmită graficele și rezultatele prelucrate ale măsurătorilor prin conexiune wireless către o bază de date specializată.

Ca tehnică a fost aleasă cronoamperometria. Valoarea optimă a potențialului de lucru a fost determinată astfel încât să se obțină o valoare pentru t_{off} care să poată fi citită în mod fiabil atât manual, cât și automat. Valoarea optimă a fost de 125 mV; la valori mai mici ale potențialului (inclusiv valori negative), nu s-a observat nicio extracție a analitului în canal (nu s-a obținut niciun semnal); în timp ce, prin aplicarea unor valori mai mari de 125 mV, valorile t_{off} se situau în intervalul ns, imposibil de citit cu precizie. La un potențial de 125 mV, acidul fulvic a fost extras din soluție în canal, blocându-l, în timp ce intensitatea curentului a devenit 0 (timpul necesar pentru a intra în canal se numește semnătura acidului fulvic și se citește în diagramă ca t_{off}) (etapa 1, Schema 2). În a doua etapă, în interiorul canalului au loc procese redox pe parcursul unei anumite

perioade de timp numită t_{on}, măsurată în diagramă între două valori consecutive ale lui t_{off} (Schema 2); această valoare este legată de concentrația acidului fulvic prin următoarea ecuație:

$$1/t_{on} = 0.27 + 1.97 \times 10^{8}\, C_{Fulvic\ acid}\ (r=0.9991),\ <t_{on}> = s,\ <C_{Fulvic\ acid}> = g\ mL^{-1}.$$



Schema 6.2. Mecanismul de generare a curentului în senzorii stocastici.

Metoda regresiei liniare a fost utilizată pentru determinarea parametrilor ecuației de calibrare de mai sus, iar această ecuație a fost utilizată pentru determinarea concentrației de acid fulvic în nămol și în apa din Lacul Techirghiol.

Caracterizarea comportamentului electrochimic a fost realizată utilizând două abordări: voltametria ciclică (CV) și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS), atât pe electrozi neacoperiți (rGO@Pd-AuNPs), cât și pe electrozi modificați (QN/rGO@Pd-AuNPs). Metoda CV a fost utilizată pentru a evalua răspunsul electrochimic al QN/rGO@Pd-AuNPs. Voltamogramele ciclice prezentate în Figura 1a au fost obținute într-o soluție de 5.0×10^{-3} mol $L^{-1}K_3[Fe(CN)_6]$ (0.1 mol L^{-1} KCl) într-un interval de potențial cuprins între -0,6 și 1,0 V, la o viteză de scanare de 0,1 V s^{-1}, utilizând rGO@Pd-AuNPs și QN/rGO@Pd-AuNPs ca electrozi de lucru. Senzorul modificat prezintă o conductivitate mai mare în comparație cu senzorul nemodificat. Rezultatele indică faptul

că modificările cu QN îmbunătățesc răspunsul electrochimic. În consecință, se poate presupune că modificarea a fost implementată cu succes, conducând la un rezultat electrochimic îmbunătățit.

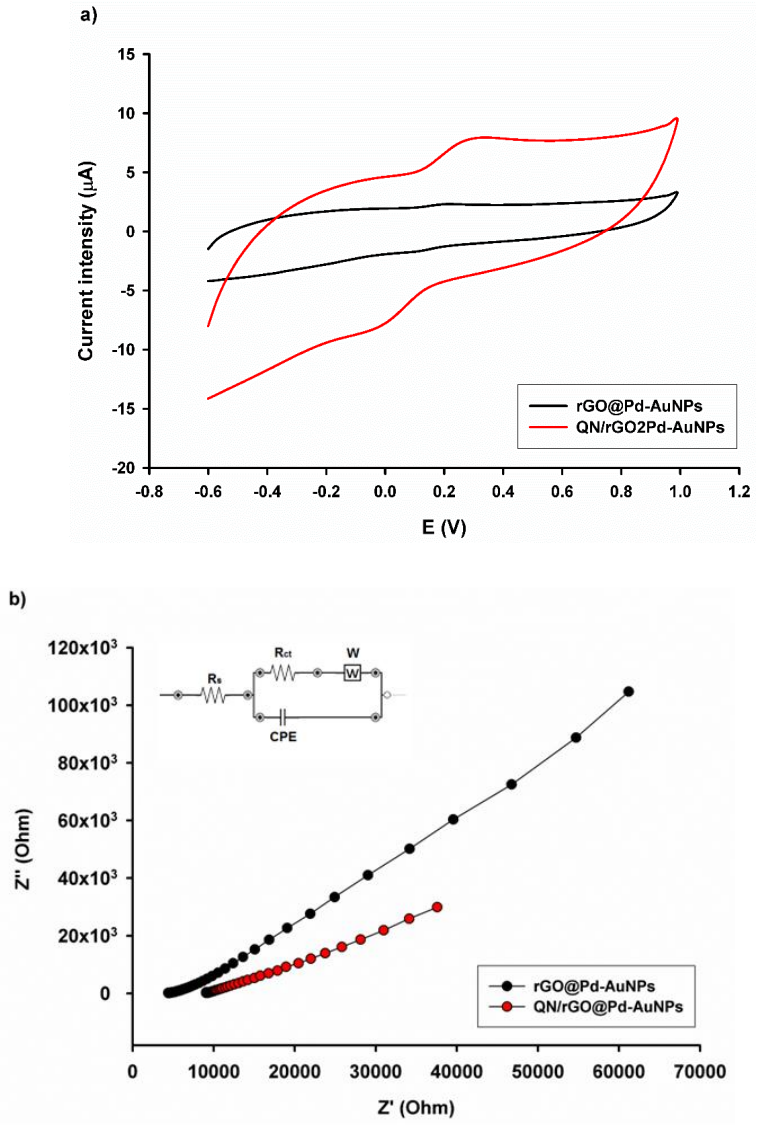


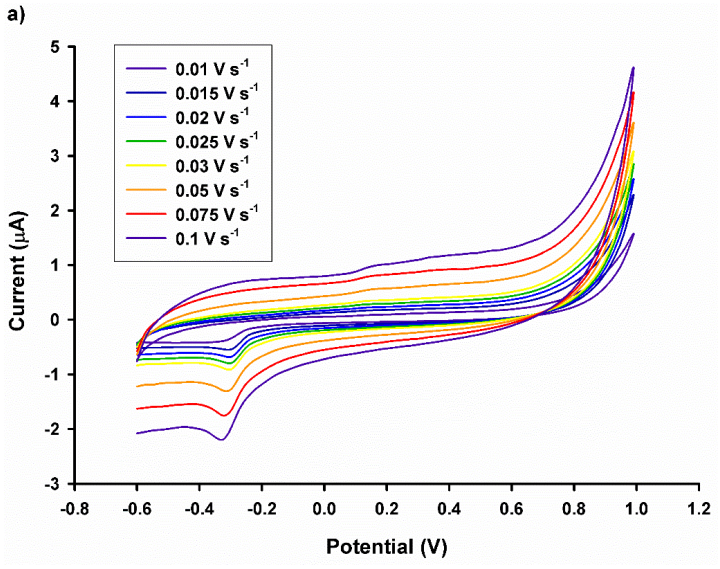
Figura 6.1. a) Curbe CV înregistrate folosind rGO@Pd-AuNPs (linia neagră) și QN/rGO@Pd-AuNPs (linia roșie) într-o soluție de 5.0×10^{-3} mol L^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$ (0.1 mol L^{-1} KCl) (condiții de lucru: potențial de pas 0,025 V; viteză de scanare 0,1 V s^{-1});

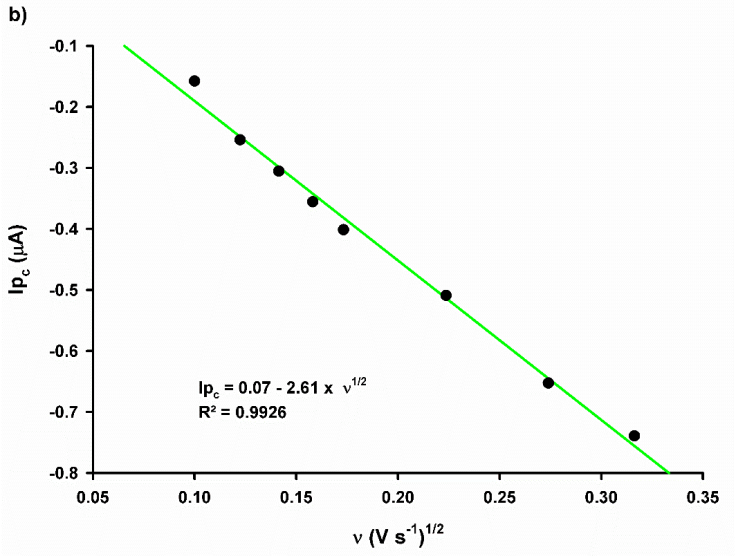
b) EIS înregistrat pentru rGO@Pd-AuNPs (linia neagră) și QN/rGO@Pd-AuNPs (linia roșie) într-o soluție de 5.0×10^{-3} mol L^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$ (0.1 mol L^{-1} KCl) condiții de lucru: interval de frecvență: 10^5 - 10^{-1} Hz). Inserție: circuitul echivalent al lui Randles.

Evaluarea interfețelor electrozilor neacoperiți și modificați folosind metoda EIS a fost realizată într-un interval de frecvență cuprins între 10^5 - 10^{-1} Hz. Studiile au fost efectuate într-o soluție de 5.0×10^{-3} mol L^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$ și 0,1 mol L^{-1}de KCl. Figura 6.1b ilustrează diagramele Nyquist pentru rGO@Pd-AuNPs (reprezentate cu negru) și QN/rGO@Pd-AuNPs (reprezentate cu roșu). Circuitul echivalent Randles, prezentat în inserția din Fig. 6.2b, a fost selectat pentru a se potrivi cu datele EIS și pentru a determina valorile rezistenței de transfer de sarcină electronică (R_{ct}). W reprezintă impedanța Warburg, CPE semnifică elementul de fază constantă, iar R_s reprezintă rezistența electrolitului. Diagrama Nyquist relevă diferențe semnificative, în special în procesele de difuzie și transport de electroni. Analiza datelor EIS a arătat că valoarea măsurată a lui R_{ct} pentru electrodul nemodificat rGO@Pd-AuNPs a fost egală cu 2202 Ω. În urma modificării rGO@Pd-AuNPs cu QN, valoarea R_{ct}a scăzut la 567,4 Ω, fapt atribuit conductivității mai ridicate a materialului, ceea ce a dus la o rată îmbunătățită de transfer de electroni la interfețele QN/rGO@Pd-AuNPs. Rezultatele EIS se corelează corespunzător cu valorile CV.

Comportamentul electrochimic al acidului fulvic a fost studiat într-o soluție de acid ulvic de concentrație 5×10^{-3} g mL^{-1} conținând PBS cu pH 7,4, utilizând spectroscopia ciclică voltammetrică (CV) cu QN/rGO@Pd-AuNPs la viteze de scanare diferite, cuprinse între 0,01 V s^{-1} și 0,1 V s^{-1}, așa cum se arată în Figura 6.2a. La electrodul modificat cu QN/rGO@Pd-AuNPs

se observă o reacție de reducere ireversibilă a acidului fulvic. CV-ul prezintă un vârf de reducere cu o intensitate a curentului înregistrată de 0,5 µA, la aproximativ -0,29 V.





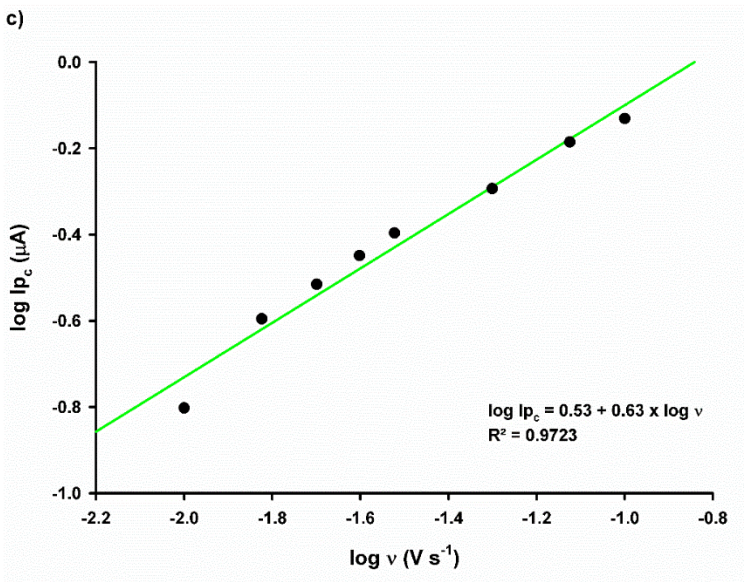


Figura 6.2. a) CV-uri obținute la diverse viteze de scanare începând de la 0,01 V/s pentru o soluție de 5.0×10^{-3} g mL^{-1} acid fulvic în tampon fosfat salin cu pH 7,4, utilizând electrodul QN/rGO@Pd-AuNPs; **b)** dependența liniară a curentului de vârf catodic în funcție de rădăcina pătrată a lui *v* (Ip_c vs $v^{1/2}$); **c)** dependența liniară a logaritmului curentului de vârf catodic în funcție de logaritmul lui ν ($\log Ip_c$ vs $\log v$).

Am examinat cu atenție corelațiile dintre curentul de vârf catodic (Ipc) și rădăcina pătrată a vitezei de scanare (ν1/2), precum și dintre logaritmul curentului de vârf catodic (log Ipc) și logaritmul vitezei de scanare (log ν). Ecuația de regresie demonstrează că curenții de vârf catodici prezintă o corelație liniară cu rădăcina pătrată a vitezei de scanare: $Ip_c = 0,07 - 2,61 \times v^{1/2}$, $R^2 = 0.9926$ (Figura 6.2.b). Ecuația de regresie derivată din graficul $\log Ip_c$ în funcție de log ν este următoarea: $\log Ip_c = 0,53 + 0,63 \times \log v$, $R^2 = 0,9723$. Valoarea pantei este 0,63, ceea ce este peste valoarea teoretică de 0,5, indicând un proces mixt de difuzie-adsorbție care are loc la suprafața electrodului.(Figura 6.2.c).

6.2.1. Caracterizarea prin SEM a suprafeței active a senzorului stocastic

S-a utilizat microscopia electronică de baleiaj (SEM) pentru a evalua morfologia senzorilor stocastici (Figura 6.3). Figura 6.3a prezintă o textură de suprafață eterogenă și aspră, caracteristică distribuției neregulate a particulelor de grafit în matricea pastei. Imaginea SEM a pastei de grafen modificată cu chinină, prezentată în Figura 6.3b, prezintă o modificare semnificativă a morfologiei suprafeței în comparație cu cea nemodificată. Figura 6.3b prezintă o suprafață cu o dispunere densă și împletită a chininei, formând o structură conductivă poroasă și interconectată, pe care se pot observa canale bine definite.

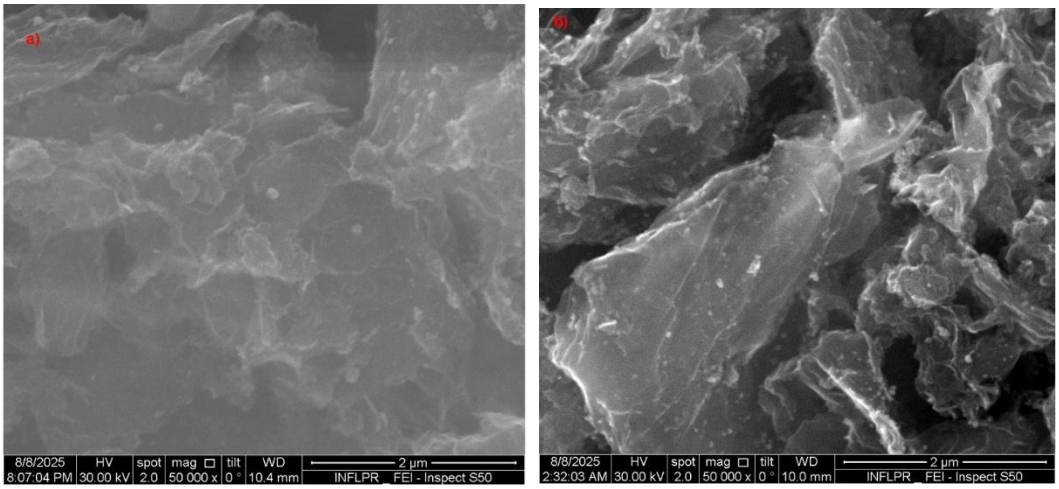


Figura 6.3. Imagini SEM ale (a) rGO@Pd-AuNPs, (b) QN/rGO@Pd-AuNPs.

6.3.Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic

Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic propus sunt prezentate în Tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stochastic utilizat pentru determinarea acidului fulvic, atât în cazul utilizării soluțiilor standard cât și în cazul utilizării nămolului și a apei din Lacul Techirghiol.

Tipul soluției	**Intervalul de concentrație de lucru (g mL^{-1})**	**Ecuația de calibrare și r***	**Semnătură t_{off} (s)**	**Sensibilitate (s^{-1}/ g ml^{-1})**	**Limita de determinare (g ml^{-1})**
Soluții etalon	5.0×10^{-15}-5.0×10^{-6}	$1/t_{on} = 0.27 + 1.97 \times 10^8$ C; r=0.9991	0.4	1.97×10^8	5.0×10^{-15}
Sapropel	5.0×10^{-15}-5.0×10^{-6}	$1/t_{on} = 0.30 + 1.95 \times 10^8$ C; r=0.9991	0.4	1.95×10^8	5.0×10^{-15}
Apa din lacul Techirghiol	5.0×10^{-15}-5.0×10^{-6}	$1/t_{on} = 0.26 + 1.97 \times 10^8$ C; r=0.9991	0.4	1.97×10^8	5.0×10^{-15}

* $<t_{on}>$ = s; $<C_{acid\ fulvic}>$ = g mL^{-1}.

Valoarea caracteristică determinată pentru acidul fulvic este de 0,4 s. Prin schimbarea tipului de soluție utilizată pentru calibrare, s-au înregistrat mici modificări nesemnificative pentru termenul liber al ecuației de calibrare și, de asemenea, pentru sensibilitate atunci când calibrarea a fost efectuată folosind probe de nămol. S-a înregistrat o sensibilitate ridicată pentru un interval liniar larg de concentrație: 5.0×10^{-15}-5.0×10^{-6} g mL^{-1}. S-a determinat o limită de determinare de 5fg mL^{-1}, iar valoarea acesteia nu a fost influențată de tipul de soluție utilizat pentru calibrarea senzorului stocastic propus.

Tabelul 6.2. Alte metode utilizate pentru determinarea acidului fulvic.

Metodă/Instrument	**Limita de determinare (g/mL)**	**Referință**
Electroanaliză/Electrod serigrafiat pe bază de oxid de grafen	0.27 μg L^{-1}	[9]
Extracție alcalină	15.3 mg mL^{-1}	[16]
Extracție la punctul de întunecare/preconcentrare prin injecție în flux – metodă de detectare UV	5 ng mL^{-1}	[5]
Metoda de analiză spectrofotometrică	135 μg mL^{-1}	[7]
Metoda stocastică	5.0×10^{-15} g mL^{-1}	Această lucrare

Limitele inferioare de determinare au fost obținute prin utilizarea senzorilor stocastici propuși, comparativ cu limitele de determinare raportate anterior (Tabelul 6.2).

Au fost proiectați și utilizați zece senzori stocastici pentru calibrarea senzorului propus pe soluții standard, nămol și apă din Lacul Techirghiol. Au fost calculate variațiile sensibilităților obținute, iar o valoare de 0,02% a demonstrat că proiectul este precis. Calibrările au fost

efectuate pe parcursul celorlalte 29 de zile, iar sensibilitățile au fost comparate; s-a calculat o variație de 0,09% – iar această valoare a demonstrat că senzorul stocastic propus este stabil în timp.

6.4. Selectivitatea senzorului stochastic

Selectivitatea senzorilor stocastici este dată de diferențele dintre valorile semnăturilor înregistrate pentru diferiți analiți dintr-un amestec; o diferență de cel puțin 0,2 s indică selectivitatea. Acidul humic, estradiolul și heparina au fost alese ca substanțe principale care pot interfera. Valorile semnăturilor acestora sunt: acid humic (1,0 s), estradiol (2,5 s) și heparină (1,8 s). Au fost înregistrate diferențe mai mari de 0,2 s între semnăturile acidului fulvic și cele ale acidului humic, estradiolului și heparinei, ceea ce demonstrează că senzorul propus este selectiv față de acești compuși.

6.5. Validarea senzorului stocastic ultrasensibil atunci când este utilizat pentru determinarea acidului fulvic în nămol și în apa din Lacul Techirghiol

Toate probele au fost analizate la fața locului folosind senzorul proiectat, minipotențiostatul portabil și smartphone-ul. Acidul fulvic a fost identificat în diagrame pe baza valorii t_{off} (Figura 6.4, Tabelul 1), iar ulterior, valoarea t_{on} a fost citită și substituită în ecuația de calibrare pentru a obține concentrația de acid fulvic (Figura 6.3).

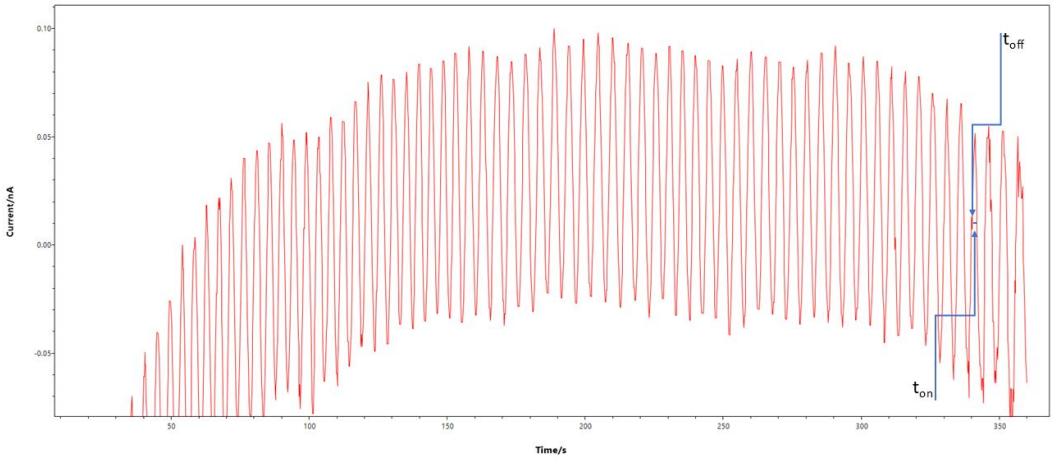


Figura 6.4. Diagrama obținută pentru screeningul sapropelului.

Rezultatele obținute pentru cele trei probe analizate (nămolul din Marea Moartă și din Lacul Techirghiol, precum și apă din Lacul Techirghiol) au fost comparate cu cele obținute folosind metoda cromatografică propusă de Aoyama [70] (Tabelul 6.3).

Tabelul 6.3. Determinarea acidului fulvic în sapropelul din Marea Moartă, din Lacul Techirghiol și în apa din Lacul Techirghiol, utilizând senzorul stochastic și metoda HPLC în fază inversă (N=10).

Probă	**Metoda stochastică/HPLC**	**Acid fulvic ng mL^{-1}**
Sapropel din Marea Moartă	Senzor stochastic	2,07 ± 0,03
	HPLC	1,76 ± 0,32
Sapropel din Lacul Techirghiol	Senzor stochastic	3,28 ± 0,04
	HPLC	3,00±0,43
Apă din Lacul Techirghiol	Senzor stochastic	2,96 ± 0,02
	HPLC	2,20±0,55
Testul t pentru eșantioane		3,021

Au fost utilizate teste t pereche (Student) pentru a compara rezultatele obținute folosind metoda propusă pentru determinarea acidului fulvic și metoda HPLC propusă anterior de Aoyama [70] la un nivel de încredere de 99,00%, pentru care valoarea teoretică t din tabel este 4,032. Valoarea calculată a fost de 3,021 (mai mică decât valoarea teoretică din tabel), ceea ce demonstrează că nu există o diferență statistic semnificativă între rezultatele obținute prin cele două metode.

De asemenea, au fost efectuate teste de recuperare pentru a confirma validarea metodei. S-au adăugat cantități cunoscute de acid fulvic la cele trei probe, iar concentrația determinată de acid fulvic a fost comparată cu concentrația teoretică a acidului fulvic. Rezultatele testelor de recuperare sunt prezentate în Tabelul 6.4.

Tabelul 6.4. Teste de recuperare pentru determinarea acidului fulvic în sapropelul din Marea Moartă, din Lacul Techirghiol și din apa din Lacul Techirghiol (N=10).

Probă	**%, Recuperare acid fulvic**
Sapropel din Marea Moartă	99,96±0,03
Sapropel din Lacul Techirghiol	99,95±0,03
Apă din Lacul Techirghiol	99,98 ± 0,02

S-au obținut valori ridicate pentru recuperarea acidului fulvic în cele trei probe, ceea ce demonstrează încă o dată că acidul fulvic poate fi determinat cu acuratețe în cele trei tipuri de probe.

Senzorul stocastic propus poate fi utilizat în mod precis pentru determinarea acidului fulvic din nămolul sapropelic din Marea Moartă, din Lacul Techirghiol și în apa din Lacul Techirghiol. Caracteristicile de răspuns nu se modifică semnificativ atunci când calibrarea se

efectuează în diferite soluții (soluții standard, nămol, apă din Lacul Techirghiol), ceea ce demonstrează că matricea nu influențează determinările.

CAPITOLUL 7

Determinarea estradiolului în apa lacului și în probele de nămol [108]

7.1. Introducere

Estradiolul (E2) este cunoscut ca un regulator bioactiv cheie în procesele fiziologice feminine, inclusiv ovulația, creșterea, ciclul reproductiv, sănătatea mentală și metabolismul [88]. Există dovezi că receptorii pozitivi la E2 în cazul cancerului de sân proliferează ca răspuns la estrogen [89]; de asemenea, s-a recomandat o reducere a terapiei cu E2 pentru femeile care urmează o ovariectomie bilaterală din indicații benigne. Sinapsele glutamatergice mediază transmisia sinaptică rapidă în sistemul nervos central, procesele fiind influențate de prezența E2. De asemenea, a fost identificat un receptor de E2 și a fost analizată expresia genică [89]. E2 contribuie la îmbunătățirea stării de sănătate a femeilor, în special atunci când se instalează menopauza precoce, prin prevenirea bolilor cardiovasculare care pot apărea [90]. De asemenea, inducerea pubertății se realizează cu ajutorul E2 la persoanele cu sindromul Turner [91].

Nămolul și apele asociate din lacuri și mare pot constitui o sursă bună de E2 (E2 se află de obicei în ordinul de mărime de ng/g pentru probele de apă și în ordinul de mărime de ng/g pentru probele de nămol), prin urmare prezența și concentrațiile de E2 trebuie determinate cu precizie. Pentru determinarea E2, metodele recente de analiză includ metode electrochimice de analiză [88, 94, 95], metode optice de analiză [88, 95, 96] și o metodă de analiză bazată pe rezonanța plasmonică

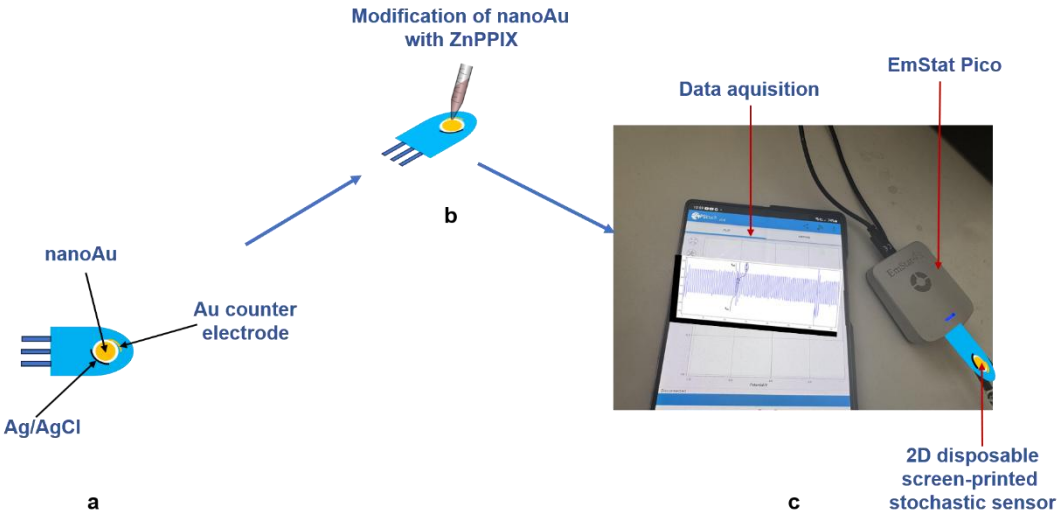
de suprafață (SPR) [97]. Senzorul voltammetric bazat pe nanoparticule de Au a prezentat o limită de determinare de 500 nmol L^{-1}, în timp ce, prin utilizarea SPR, s-a atins o limită de determinare de 40 nmol L^{-1}. Senzorii bazați pe fibră optică [96], precum și cei pe chemiluminiscență [95], au redus limitele de determinare la nivelul pmol L^{-1}.

Utilizarea senzorilor electrochimici a facilitat atingerea unor limite de determinare scăzute și a unei analize rapide, la un cost redus pe analiză [98-102]. În plus, introducerea senzorilor stocastici ca noi instrumente pentru analiza probelor precum apa și nămolul a făcut posibilă atingerea unor limite de determinare mai scăzute și a unor intervale de concentrație de lucru mai largi, facilitând determinarea concentrațiilor foarte mici în matrici complexe [103]; de asemenea, aceștia sunt rentabili, facilitând determinarea unuia sau a mai multor compuși în matrici complexe, fără nicio pregătire prealabilă a probei.

Prezenta lucrare propune un senzor stocastic pentru determinarea E2 în nămol și în probele asociate de lac/mare. Noutatea acestei lucrări constă în utilizarea unui senzor stocastic pentru determinarea E2, precum și în realizarea senzorului stochastic bidimensional de unică folosință, care se bazează pe depunerea de nanoparticule de aur pe un material ceramic, urmată de modificarea acestuia cu o soluție conținând Zn(II)protoporfirină IX (ZnPPIX). Rolul ZnPPIX a fost acela de a asigura nano-canalele necesare pentru obținerea semnalului stochastic, deoarece moleculele de ZnPPIX formează agregate moleculare care prezintă nano-canale.

7.2. Proiectarea senzorului stochastic 2D serigrafiat

Electrodul 2D serigrafiat a fost imprimat în laborator și cuprinde suprafața activă – un cerc cu diametrul de 4 mm acoperit cu nanoparticule de Au (depozitate folosind tehnologia cu plasmă rece) , un semicerc format din Au – ca contraelectrod, și un semicerc format din cerneală Ag/AgCl ca electrod de referință. Pe partea superioară a suprafeței active a electrodului serigrafiat s-au adăugat 20 µL dintr-o soluție de ZnPPIX 10^{-3} mol L^{-1} (obținută prin dizolvarea ZnPPIX în dimetilformamidă) (Schema 7.1).



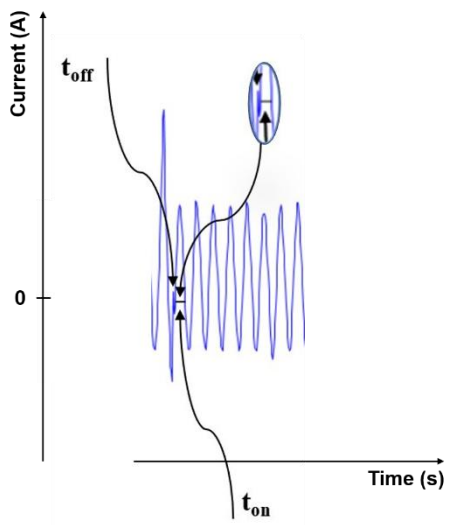
Schema 7.1. a. Electrod serigrafiat 2D; b. Modificarea electrodului serigrafiat 2D; c. Configurarea măsurătorilor folosind senzorul stochastic serigrafiat 2D.

Pentru adsorbția ZnPPIX pe suprafața senzorului, după adăugarea soluției de ZnPPIX, senzorul a fost lăsat timp de 3 ore la temperatura camerei, acoperit cu hârtie de aluminiu (acoperirea cu hârtie de aluminiu a fost realizată datorită sensibilității la lumină a ZnPPIX). S-a

stabilit că grosimea stratului de ZnPPIX este de 3 nm. Ulterior, senzorul a fost conectat la EmStat Pico, iar achiziția datelor s-a realizat cu ajutorul unui smartphone Samsung pliabil (Schema 7.1).

7.3. Metoda stocastică

S-a aplicat un potențial de 125 mV față de Ag/AgCl (electrod de referință) în cadrul unei tehnici cronoamperometrice. Această valoare a potențialului a fost optimizată: valorile mai mici de 125 mV pentru potențialul aplicat nu vor genera niciun semnal stochastic (moleculele nu pot fi extrase în canale), în timp ce pentru valori mai mari de 125 mV, semnăturile erau mai mici de 0,01 s, ceea ce făcea ca citirea să nu fie precisă. S-a analizat forma curentului și s-au determinat valorile t_{on} și t_{off}. Dezvoltarea actuală a senzorilor stocastici se bazează pe conductivitatea nanocanalelor: prin aplicarea potențialului de 125 mV față de Ag/AgCl, moleculele din soluție sunt extrase una câte una din soluția din interiorul nanocanalului – în prima etapă, moleculele pot bloca parțial sau total nanocanalul, determinând scăderea valorii curentului la zero până când molecula pătrunde în interiorul nanocanalului; în interiorul canalului au loc procese redox, molecula își poate schimba sarcina și starea de oxidare . (Schema 7.2).



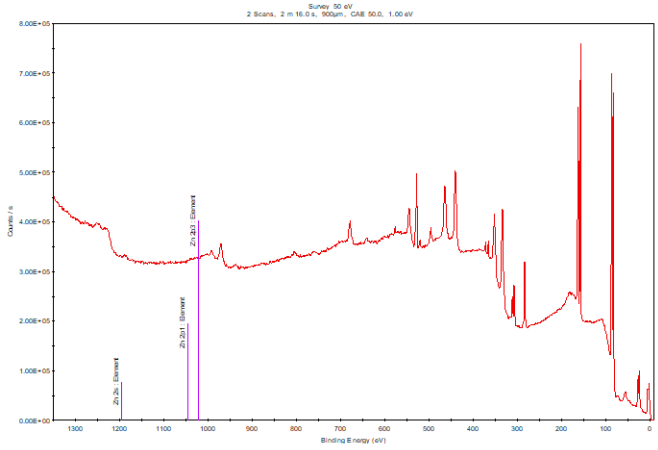
Schema 7.2. Citirea valorilor t_{off} și t_{on} pe diagrama înregistrată, obținută cu ajutorul senzorului stochastic 2D de unică folosință, serigrafiat.

S-a utilizat metoda regresiei liniare pentru a determina parametrii ecuației de calibrare: $1/t_{on} = f(C_{E2})$. Probele de nămol și apă au fost adăugate pe suprafața senzorului stocastic 2D, imprimat serigrafic. Valoarea t_{off} a E2 a fost utilizată pentru identificarea acestuia în diagramă (Schema 7.2), iar valoarea imediată a lui t_{on} a fost citită și substituită în ecuația de calibrare pentru a obține concentrația de E2. Toată achiziția de date s-a realizat folosind un smartphone Samsung pliabil, capabil să măsoare automat valorile semnăturii și să le compare cu valoarea t_{off} E2, precum și să măsoare automat valoarea t_{on} și să o convertească în concentrația de E2. Toate măsurătorile au fost efectuate la 25° C; nu s-a observat nicio modificare a parametrilor senzorilor (sensibilitate, interceptare) într-un interval de temperatură cuprins între 18° C și 32° C.

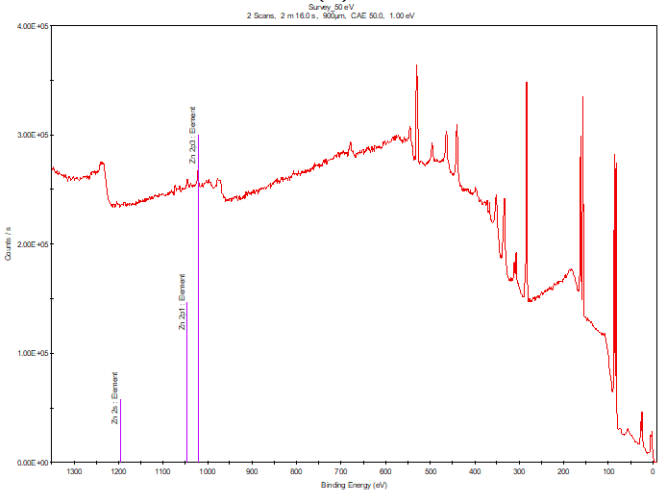
7.4. Caracterizarea suprafeței senzorului stocastic 2D serigrafiat

Caracterizarea suprafeței a fost realizată folosind următoarele instrumente de analiză a suprafeței: spectroscopia fotoelectronică cu raze X (XPS), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și cartografierea SEM-EDS.

Figura 7.1. **a**) și **b**) prezintă spectrele de scanare largă ale senzorilor neacoperiți și, respectiv, modificați. Apariția unui vârf la 1022 eV în spectrul senzorului modificat sugerează prezența unui compus de Zn, indicând astfel modificarea senzorului cu ZnPPIX.



(a)

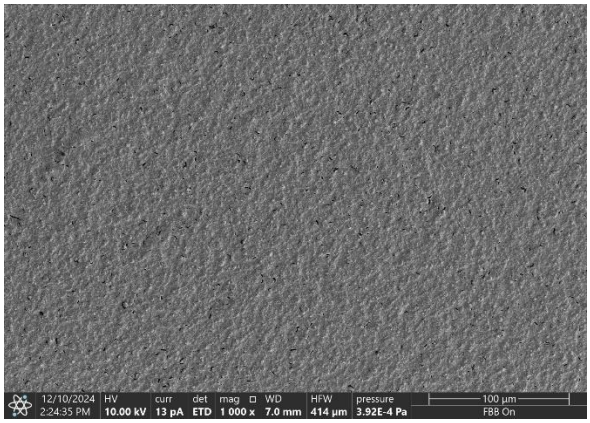


(b)

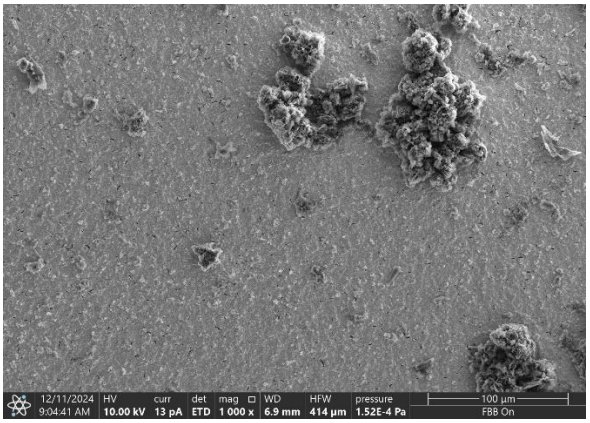
Figura 7.1. Spectrele cu scanare largă ale electrodului 2D serigrafiat neprelucrat (**a**) și modificat (**b**).

Prin compararea spectrelor XPS de înaltă rezoluție ale senzorilor neacoperiți și modificați, se observă prezența picurilor de Zn și N în senzorul modificat, împreună cu o creștere semnificativă a numărului de impulsuri C1s în comparație cu senzorul neacoperit. Deoarece acești atomi sunt constituenți ai ZnPPIX (C_{34} H_{32} N_4 O_4 Zn), aceste rezultate experimentale confirmă prezența protoporfirinei de zinc pe senzorul modificat. În ceea ce privește senzorul modificat, numărul mai mic de impulsuri de aur (provenind de la contactul electric subiacent) se datorează atenuării semnalului XPS care trece prin stratul de ZnPPIX.

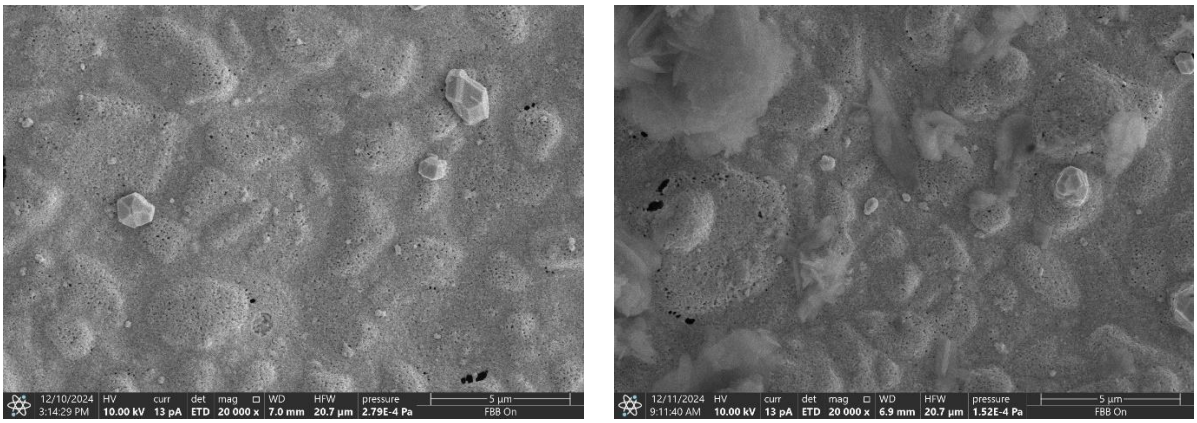
Figura 7.2. prezintă imaginile SEM ale electrozilor neacoperiți (**a**), (**b**) și modificați (**c**), (**d**). La compararea celor doi, electrodul nemodificat prezintă o suprafață de aur în mare parte plană, care conține și câteva particule de aur mai mari, în timp ce electrodul modificat prezintă, în plus, numeroase agregate moleculare de molecule de ZnPPIX; nano-canalele sunt, de asemenea, vizibile în Figura 2 (**c**).



(a)



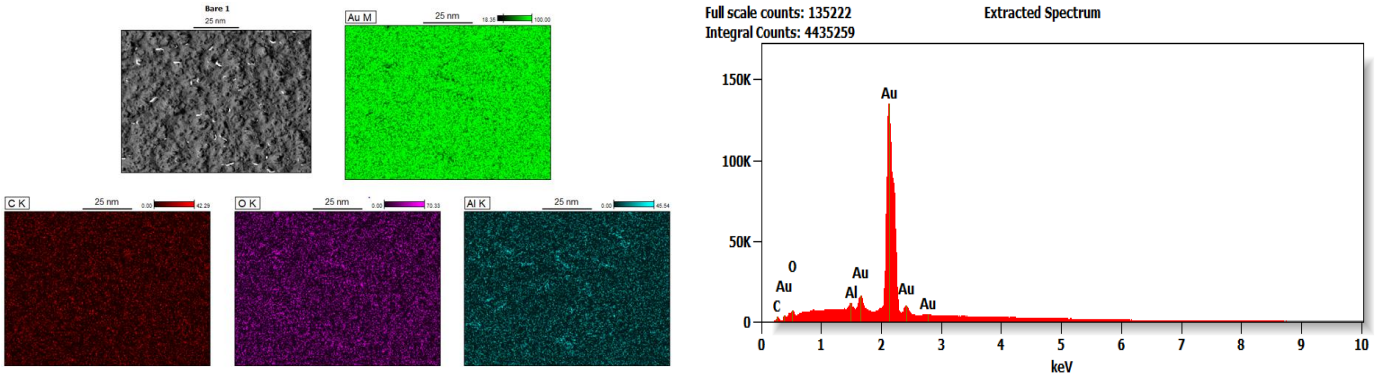
(c)



(b) **(d)**

Figura 7.2. Imagini SEM pentru electrodul neacoperit la măriri de 1000× (**a**) și 20000× (**b**), și pentru electrodul modificat la măriri de 1000× (**c**) și 20000× (**d**).

Compoziția chimică a suprafeței active a senzorului a fost determinată prin analiză SEM-EDS pe același sistem utilizat pentru microscopia SEM. Figura 7.3 prezintă o hartă EDS tipică (a) și un spectru (b) pentru suprafața inițială, nemodificată, de nano Au, în timp ce compoziția chimică măsurată este prezentată în Tabelul 7.1. Din ambele se poate observa că, așa cum era de așteptat, suprafața era alcătuită dintr-o singură masă omogenă de aur, fiind detectate doar cantități mici de alți contaminanți.



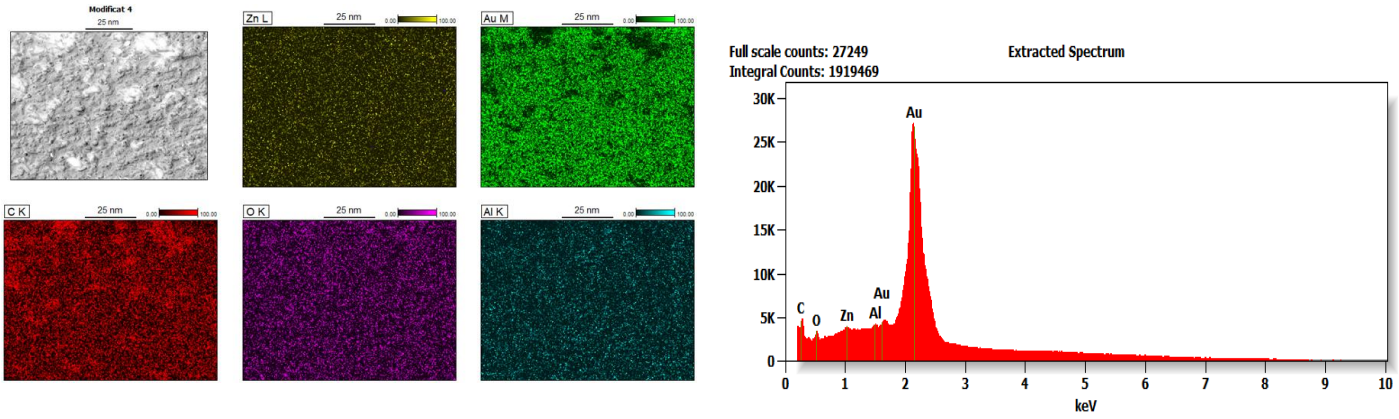
(a) **(b)**

Figura 7.3. Harta EDS (**a**) și spectrele (**b**) ale suprafeței nanoAu nemodificate.

Tabelul 7.1. Compoziția chimică a suprafeței nanoAu nemodificate.

Element	Tipul de linie	Greutate (%)	Atom (%)	Greutate normată (%)
C	K	0,30	4,07	0,30
O	K	1,06	10,96	1,06
Al	K	0,42	2,56	0,42
Au	M	98,23	82,41	98,23

Între timp, Figura 7.4 conține o hartă EDS tipică (**a**) și un spectru (**b**) pentru suprafața modificată de nano Au, după depunerea ZnPPIX. Compoziția chimică măsurată este prezentată și în Tabelul 7.2. La fel ca înainte, suprafața era alcătuită dintr-o singură masă omogenă de aur, împreună cu cantități mici de contaminanți; cu toate acestea, prezența zincului, precum și creșterea detectată a atomilor de carbon, confirmă depunerea cu succes a soluției de ZnPPIX.



(a) **(b)**

Figura 7.4. Harta EDS (**a**) și spectrele (**b**) ale suprafeței de nanoAu modificate cu ZnPPIX.

Tabelul 7.2. Compoziția chimică a suprafeței de nanoAu după modificarea acesteia cu ZnPPIX.

Element	Tipul liniei	Greutate (%)	Atom (%)	Greutate normată (%)
C	K	4,91	41,66	4,91
O	K	0,99	6,29	0,99
Al	K	0,63	2,38	0,63
Zn	L	1,20	1,88	1,20
Au	M	92,27	47,79	92,27

7.5. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stochastic 2D, serigrafiat, atunci când este utilizat pentru determinarea estradiolului

Semnătura E2 a fost de 0,5 s. Senzorul poate fi utilizat într-un interval larg de concentrații de lucru, de la 5×10^{-18} până la 5×10^{-2} g mL^{-1}, cu o sensibilitate de 3.01×10^{8} $s^{-1}g^{-1}mL$, și o limită de determinare (care, conform liniilor directoare IUPAC, reprezintă cea mai mică concentrație din intervalul de concentrații de lucru) de 5×10^{-18} g mL^{-1}. Ecuația de calibrare a fost:

$1/t_{on}$ = 0.50(±0.03) + 3.01(±0.02)x$10^8 C_{E2}$, cu o valoare r de 0,9998, în urma efectuării a 10 măsurători. Valoarea t_{on} a fost citită în s, iar concentrația, C_{E2} in g mL^{-1}.

Selectivitatea senzorului propus a fost determinată în comparație cu alți ioni/compuși posibili prezenți în probele de nămol și în probele de apă asociate, precum: Fe^{3+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, acid humic, acid fulvic. Deoarece criteriul de selectivitate pentru senzorii stocastici este o diferență de 0,2 s între semnătura E3 și semnătura înregistrată pentru posibilele interferențe, au fost analizate semnăturile Fe^{3+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, acidului humic, acidului fulvic, estriolului și etinilestradiolului (Tabelul 7.3).

Tabelul 7.3. Semnături obținute pentru estradiol și posibile interferențe.

Analit	Semnătură (s)
Estradiol	0,5
Fe^{3+}	0,9
Ca^{2+}	1,3
Mg^{2+}	1,1
Acid humic	2,3
Acid fulvic	1,7
Estriol	2,7
Etinilestradiol	3,2

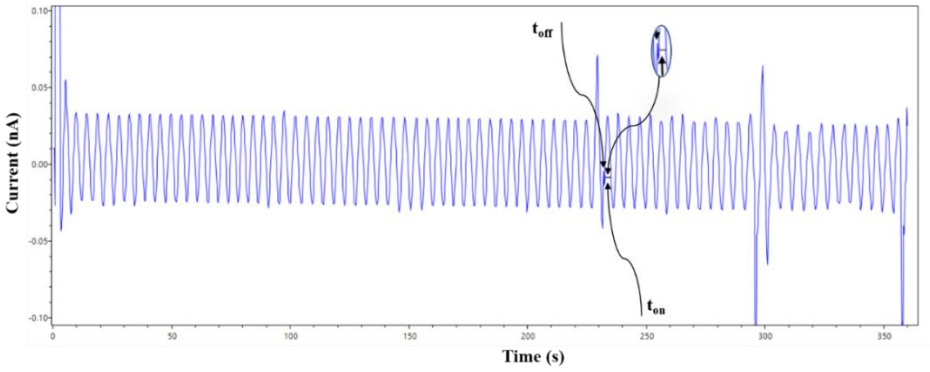
Rezultatele obținute pentru semnăturile Fe^{3+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, acid humic, acid fulvic, estriol și etinilestradiol au demonstrat că senzorul stocastic 2D, serigrafiat, propus este selectiv.

Prin compararea acestor rezultate cu cele obținute folosind alți senzori electrochimici și optici propuși anterior pentru determinarea E2 [88,94-96], s-a înregistrat o limită inferioară de determinare mai mică atunci când s-a utilizat senzorul stocastic 2D, imprimat serigrafic; de asemenea, intervalul de concentrație de lucru a fost mai larg, iar sensibilitatea măsurătorilor mai

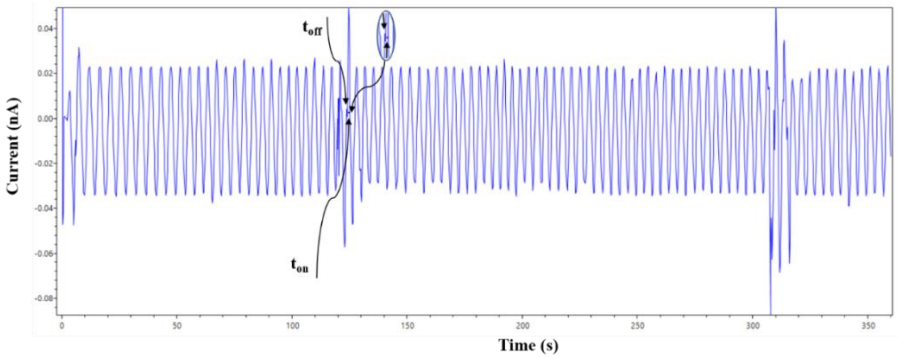
mare. S-a înregistrat o selectivitate mai mare prin utilizarea senzorului stocastic 2D imprimat serigrafic.

7.5.1. Determinarea estradiolului în probe de apă de suprafață și în probele de nămol asociate

Au fost utilizate probele de nămol și apă prelevate direct din lacul Techirghiol și din Marea Moartă. Măsurătorile au fost efectuate la fața locului, în lacul Techirghiol și în Marea Moartă. Au fost înregistrate diagramele (**Figura 7.4**) și s-au efectuat citirile valorilor t_{off} pentru a identifica E2.



(a)



(b)

Figura 7.4. Diagrame obținute la utilizarea senzorului stochastic 2D, serigrafiat, pentru analiza **a**) probelor de apă **b**) a probelor de nămol.

Rezultatele obținute cu ajutorul senzorului stocastic 2D de unică folosință, imprimat serigrafic, pentru determinarea E2 în apa și nămolul din Techirghiol și în nămolul din Marea Moartă au fost comparate cu cele obținute folosind un kit ELISA (Tabelul 7.4).

Tabelul 7.4. Determinarea estradiolului în probele de nămol și apă (N=10).

Probă	**Estradiol**	
	Senzor stochastic 2D de unică folosință, imprimat serigrafic	Kit ELISA
Apă din lacul Techirghiol*	2,51±0,01	2,00 ± 0,50
Nămol din lacul Techirghiol**	3,11±0,02	3,00±0,20
Nămol din Marea Moartă**	2,25±0,03	2,10±0,25

*ng/mL; **ng E2/g nămol

Recuperarea E2 din probele de nămol și din probele de apă asociate a fost realizată ca o a doua etapă de validare. S-au adăugat cantități cunoscute diferite de E2 la 10 probe de nămol și la 10 probe de apă, iar determinările concentrațiilor înainte și după adăugarea acidului humic au fost efectuate.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.5.

Tabelul 7.5. Recuperarea estradiolului din probele de nămol și apă (N=10).

Probă	**%, Recuperare, Estradiol**
Apă din lacul Techirghiol	99,98 ± 0,02
Nămol din lacul Techirghiol	99,95 ± 0,02
Nămol din Marea Moartă	99,02 ± 0,05

Rezultatele prezentate în Tabelul 7.5 au demonstrat că E2 a fost recuperat cu valori apropiate de 100,00% și cu abateri standard relative mai mici de 0,10%.

Atât prima, cât și a doua etapă de validare au demonstrat că senzorul stocastic 2D de unică folosință, realizat prin serigrafie, poate fi utilizat în mod fiabil pentru determinarea E2 în probele de nămol și în probele de apă asociate.

Senzorul stocastic 2D, realizat prin serigrafie, a fost proiectat, caracterizat și validat pentru determinarea estradiolului în probe de nămol prelevate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă, precum și din apa lacului Techirghiol.

Concluzii

Concluzii generale

Pentru determinarea substanțelor poluante, precum metalele grele din apă și nămol, înainte de utilizarea acestora în orice scop terapeutic, precum și pentru determinarea câtorva compuși activi cu acțiune terapeutică, cum ar fi acidul humic, estradiolul și acidul fulvic, au fost propuși senzori electrochimici și stocastici ultrasensibili.

De asemenea, a fost dezvoltată o metoda de screening a apei și a nămolului pentru identificarea poluanților organici persistenți, în vederea stabilirii prezenței acestora în probele de analizat. Toate instrumentele și metodele au fost caracterizate și validate folosind probe reale colectate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă.

Senzorii stocastici au fost utilizați în mod fiabil pentru testul de screening la fața locului al nămolului sapropelic, în scopul evaluării gradului de contaminare a acestuia cu Cd și Pb. Caracteristicile de răspuns nu se modifică semnificativ atunci când calibrarea se efectuează folosind soluții standard și nămol sapropelic. Principalele avantaje ale senzorilor stocastici sunt analiza la fața locului a Cd și Pb din nămolul sapropelic și faptul că nu este necesară prelucrarea probelor, precum și posibilitatea de a determina cu acuratețe Cd și Pb la concentrații extrem de mici în nămol, ajutând autoritățile competente să evalueze dacă nămolul sapropelic este contaminat sau nu și dacă poate fi utilizat în siguranță pentru proceduri cosmetice și terapeutice.

S-a efectuat o analiză de screening a poluanților organici persistenți (bisfenoli policlorurați și pesticide organoclorurate) din apa și nămolul lacului Techirghiol, utilizând cromatografia de gaze cu un detector cu captură de electroni, pentru a determina o posibilă contaminare a apei lacului și a nămolului cu poluanți organici persistenți. Rezultatele trebuie să atragă atenția autorităților

asupra prezenței acestor contaminanți, deoarece aceștia pot influența sănătatea populației care utilizează aceste reusrse naturale în scopuri terapeutice. Prin urmare, trebuie efectuat un control periodic al calității apei și a nămolului din Lacul Techirghiol , utilizând un astfel de test de screening, pentru a evita acumularea de contaminanți înainte de utilizarea apei și a nămolului în scopuri terapeutice. De asemenea, trebuie efectuate determinări suplimentare folosind GC-MS pentru a confirma prezența pesticidelor.

Au fost utilizați senzori stocastici și electrochimici pentru determinarea acidului humic în probele de nămol prelevate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă, precum și din apa Lacului Techirghiol. Senzorii s-au dovedit a fi extrem de fiabili pentru determinarea acidului humic în probele menționate. Datorită portabilității instrumentelor, acestea pot fi utilizate pentru determinarea concentrației de acid humic din nămolul și apa mării și a lacurilor, în scopul evaluării calității acestora și al stabilirii dacă sunt adecvate pentru tratamentele prescrise de medici.

Un senzor stochastic a fost utilizat pentru determinarea acidului fulvic în nămolul sapropelic provenit din Marea Moartă, din Lacul Techirghiol și din apa din Lacul Techirghiol. Caracteristicile de răspuns nu se modifică semnificativ atunci când calibrarea se efectuează în diferite soluții (soluții standard, nămol, apă din Lacul Techirghiol), ceea ce demonstrează că matricea nu influențează determinările.

Principala caracteristică a senzorului stocastic propus este utilizarea sa ca instrument ultrasensibil pentru screeningul la fața locului al nămolului sapropelic din Marea Moartă și din Lacul Techirghiol, precum și al apei din Lacul Techirghiol, în vederea determinării în timp real a concentrației de acid fulvic; acest lucru va ajuta autoritățile competente să afle dacă nămolul sapropelic și apa prezintă caracteristicile necesare pentru utilizarea în scopuri terapeutice. În plus,

având în vedere posibilitatea utilizării senzorului stocastic pentru analiza mai multor analiti, Senzorul poate fi calibrat pentru mai multe substanțe de interes terapeutic prezente în nămol și apă făcând posibil un control complet al calității.

De asemenea, a fost proiectat, caracterizat și validat un senzor stocastic 2D de unică folosință, realizat prin serigrafie, pentru determinarea estradiolului în probe de nămol prelevate din Lacul Techirghiol și din Marea Moartă, precum și din apa Lacului Techirghiol. Instrumentul utilizat pentru toate măsurătorile, precum și smartphone-ul, au permis determinarea la fața locului a estradiolului în probele de nămol și în probele de apă asociate. Prin urmare, caracteristicile sale constau în utilizarea pentru determinarea estradiolului în nămol și în apele mării/lacurilor, cu scopul de a stabili conținutul de estradiol și de a preveni utilizarea nămolului și a apei din lacuri/mări în cazul în care efectele terapeutice ar putea afecta sănătatea populației.

Contribuții originale

Metodele moderne de utilizare a senzorilor stocastici 2D combinate pentru analiza simultană la fața locului, în timp real, a ionilor Cd(II) și Pb(II), comparativ cu alți senzori bazați pe materialul grafen, constau în principiul de recunoaștere a celor două metale (modul stocastic, care permite recunoașterea și cuantificarea moleculară precisă), precum și în designul său , electrodul de lucru, a fost proiectat prin imobilizarea grafenului pe mătase (folosind tehnica plasmei reci), și modificat cu α-ciclodextrină, fiind însoțit de un electrod de referință (Ag/AgCl) și de un electrod auxiliar (fir de carbon). Grafenul a fost modificat cu α-ciclodextrină (α-CD), deoarece α-CD dispune de canalul necesar pentru determinările stocastice. Grafenul are rolul de matrice pentru electrodul de lucru proiectat pe banda de detectare și poate menține canalul α-ciclodextrinei într-o stare optimă.

Pentru determinarea acidului humic în probele de nămol sapropelic a fost propus un senzor stocastic. Noutatea constă în proiectarea senzorului stocastic 2D utilizat pentru determinarea acidului humic în nămol, precum și în electroanaliza acidului humic din probele de nămol prelevate din lacul Techirghiol și din Marea Moartă, precum și din apa prelevată din Lacul Techirghiol. S-a utilizat o soluție de heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină ($^{1x10^{-3}}$mol $^{L^{-1}}$) pentru a modifica suprafața unui electrod serigrafiat, a cărui suprafață activă a fost acoperită cu nanotuburi de carbon cu perete unic (SWCNT). Utilizarea ciclodextrinei a facilitat formarea unor canale foarte stabile, necesare pentru măsurătorile stocastice.

Noutatea senzorului electrochimic de unică folosință utilizat pentru determinarea acidului humic constă în designul său, care folosește nanotuburi de carbon cu perete unic modificate cu o nouă ciclodextrină: heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină, care a sporit sensibilitatea măsurătorilor, aducând limita de detectare pentru determinarea acidului humic la fg $^{mL^{-1}}$.

Un avantaj al senzorului stocastic conceput pentru nămolul sapropelic constă în designul său: senzorul se bazează pe o pastă de oxid de grafen redus, decorată cu nanoparticule de aur și paladiu și modificată cu chinină, pentru determinarea ultrasensibilă, rapidă și la fața locului a acidului fulvic în nămolul sapropelic și în apa din Lacul Techirghiol. Utilizarea sa a facilitat controlul calității în timp real al nămolului și al apei; având în vedere că rezultatele pot fi transmise imediat către o bază de date specializată folosind smartphone-ul implicat în achiziția și prelucrarea datelor, se poate obține o hartă a concentrației acestuia, făcând posibilă luarea imediată a deciziilor cu privire la posibilitatea utilizării apei și a nămolului în scopuri terapeutice sau la prelevarea acestora pentru extragerea acidului fulvic în laboratoare specializate.

De asemenea, pentru determinarea estradiolului în nămolul sapropelic și în probele asociate , noutatea este legată de construcția senzorului stochastic 2D de unică folosință, care se bazează pe depunerea de nanoparticule de aur pe un material ceramic, urmată de modificarea acestuia cu o soluție conținând Zn(II)protoporfirină IX (ZnPPIX). Rolul ZnPPIX a fost acela de a asigura nano-canalele necesare pentru obținerea semnalului stocastic, întrucât moleculele de ZnPPIX formează agregate moleculare care prezintă nanocanale.

Perspective viitoare

Noile dispozitive dezvoltate în cadrul acestei teze au fost validate pentru determinarea a două metale grele, a poluanților organici persistenți și a trei substanțe active foarte importante: acidul fulvic, acidul humic și estradiolul. În primul rând, aplicarea lor în analiza la fața locului va aduce beneficii în domeniul terapeutic, deoarece acestea vor permite identificarea în timp real a faptului dacă nămolul și apa sunt conforme și dacă prezintă concentrațiile necesare de acid fulvic, acid humic și estradiol pentru a imprima acțiunea terapeutică urmarită.

Extinderea măsurătorilor cu ajutorul senzorilor de detectare pentru mai multe metale grele va facilita realizarea unei hărți în timp real privind calitatea nămolului și a apei. De asemenea, este absolut necesară dezvoltarea unor senzori de detectare și pentru poluanții organici persistenți. Este necesară extinderea listei la alte substanțe de importanță terapeutică, iar acest lucru se va realiza în continuare folosind conceptul benzilor de detectare pentru proiectarea senzorilor stocastici.

References

1. Pritchard D. The rate of deposition of fine sediment from suspension. J Hydraul Eng 2006;132(5):533-6.
2. Momani K, El-Hasan T, Auaydeh S, Al-Nawayseh K. Heavy metals distribution in the Dead Sea black mud, Jordan. Jordan J Earth Environ Sci 2009;2(2):81-8.
3. Friedman G. On the origin of aragonite in the Dead Sea. J Earth Sci 1965, 14:79-85.
4. Khoury H, Salameh E, Udluft P. On the Zerka Ma'in (Therma Kallirrhoes) Travertine/Dead Sea (hydrochemistry, geochemistry and isotopic composition). Jb Geol Palaeontol 1984, 8:472-84.
5. N.G. Lensky, Y. Dvorkin, V. Lyakhovsky, I. Gertman, I. Gavrieli,Water, salt, and energy balances of the Dead Sea, Water Resour. Res. 41 (12), 2005, 1-13 W12418.
6. Y. Oumeish, Climatotherapy at the Dead Sea in Jordan, Clinics in Derinntaology 14 1996, 659-664.
7. K. Momani, T. El-Hasan, S. Auaydeh, K. Al-Nawayseh, Heavy metals distribution in the Dead Sea blackmud, Jordan, Jordan Journal of Earth and Environmental Sciences 2 (1) ,2009, 50-59.
8. Khlaifat, O. Al-Khashman, H. Qutob, Physical and chemical characterization of Dead Sea mud, Mater. Charact. 2010, 61, 564-568.
9. Abdel-Fattah, N. Pingitore Jr, Low levels of toxic elements in Dead Sea black mud and mud-derived cosmetic products,Environ. Geochem. Health 2009, 31, 4, 487-492.
10. M.F. Es-Shahat, K.M. Al-Nawayseh, A.G. Jiries, F.M. Al-Nasir, Pesticides and heavy metals distribution in southern Dead Sea basin, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2003, 71, 1230-1238.

11. S.G. Abdel-Samie, M.F. Es-Shahat, K.M. Al-Nawayseh, Mineralization sources of surface and subsurface water at the southeastern edges of Dead Sea basin in Jordan, Isotope and Radioactive Research 2004, 36, 167-186.
12. J. Kronfeld, S. Ilani, A. Strull, Radium precipitation and extreme 238U series disequilibrium along the Dead Sea coast, Israel, Appl. Geochem. 1991, 6, 355-361.
13. M. Stiller, Y.C. Yhung, Radium in the Dead Sea: a possible tracer for the duration of meromixes, Limnol. Oceanogr. 1984, 29, 574-586.
14. Surdu Olga -Histological study of the action of Techirghiol mud on the integument. Ovidus University Constanța, Faculty of Environment, General, PhD Thesis, 2007.
15. Tadao Enomoto -Liquefaction and post-liquefaction properties of sand-silt mixtures and undisturbed silty sands ,ScienceDirect ,8 November 2019.
16. Munteanu, C., Dumitrașcu Mioara - Nãmoluri terapeutice, Balneo-Research Journal, Vol.2 2011, nr.3, Balneara Publishing House, ISSN 2069-7600.
17. Hibbert, D.B.; Korte, E.H.; Örnemark, U. IUPAC Recommendations. Metrological and quality concepts in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2021). Pure Appl. Chem.2021, 93, 997-1048.
18. Stefan-van Staden, R.I. Perspective—Challenges in Biomedical Analysis: From Classical Sensors to Stochastic Sensors. ECS Sens. Plus 2022, 1, 011603.
19. Georgescu-State, R.; Comnea-Stancu, I.R.; Stefan-van Staden, R.I.; Ilie-Mihai, R.M. Green portable stochastic sensor based on poly-arginine and bimetallic nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for simultaneous determination of alpha-fetoprotein and CA 72-4 in the early detection of gastric cancer. Anal. Sens.2026, 6, e202500175.
20. Popa-Cobianu, L.M.; Stefan-van Staden, R.I.; Gheorghe, D.C. Sensing strip for determination of deoxynivalenol in urine samples. Anal. Lett. 2026, 59, 1196-1202.
21. Ilie-Mihai, R.M.; Stefan-van Staden, R.I. Novel stochastic sensors based on phthalocyanine complexes for the detection of C-NP, IL-6, and CRP in cardiovascular diseases. Life 2026, 16, 339.
22. Chatchakit, T., Nantarat, N. Integrated assessment of cadmium (Cd) and lead (Pb) contamination: bioaccumulation in the river snail Filopaludina martensi (Frauenfeld, 1864),

sediment, and water from the Maekha Canal, Chiang Mai Province, Thailand. Ecotoxicol., 2026, 35, 18.

23. Dilshad, M., Hussain, T., Ali, S., Shalizad, M.S., Javed, M., Ahmad, F.N., Zaki, A.A. Graphene-based electrochemical sensors for heavy metal ions detection: a comprehensive review. ASEAN J. Sci. Eng. Mat., 2025, 4, 23-42.
24. Du, J., Cui, C., Chen, H., Liu, H., Zhang, X., Zhang, W. Graphene field-effect transistor biosensors for detection of heavy metal ions. J. Food Measurem. Charact., 2024, 18, 5683-5694.
25. El-Raheem, H.A., Helim, R., Hassan, R.Y.A., Youssef, A.F.A., Korri-Youssoufi, H., Kraiya, C. Electrochemical methods for the detection of heavy metal ions: from sensors to biosensors. Microchem. J. 2024, 207, 112086.
26. El Sikaily, A., Ghoniem, D.Gh., Ramadan, O., El-Nahrery, E.M., Shahat, A., Hassan, R.Y.A. Highly selective detection of heavy metal ions detection of heavy metal ions in food and water using a 5-BHAHS@NC/MnO_2-based electrochemical sensor. Biochem. Eng. J.2025, 216, 109660.
27. Fakayode, S.O., Walgama, C., Narcisse, V.E.F., Grant, C. Electrochemical and colorimetric nanosensors for detection of heavy metal ions: a review. Sensors 2023, 23, 9080.
28. Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Lopez-Valdez, N., Bizarro-Nevares, P., Morales-Ricardes, G., Casarrubias-Tabarez, B., Cervantes-Valencia, M.E., Ustarroz-Cano, M., Garcia-Pelaez, I., Fortoul, T.I. Lead systematic toxicity: a persistent problem for health. Toxicology 2025, 515, 154163.
29. Hu, T., Lai, Q., Fan, W., Zhang, Y., Liu, Z. Advances in portable heavy metal ion sensors. Sensors 2023, 23, 4125.
30. Kabir, M.H., Alam, M.M., Mathanan, R., Ford, E., Chusnei, C.C., Wolvington, J.A., Demoubreun, K., Ghann, W., Uddin, J., Rahman, M.M., Ali, M.M. Simultaneous electrochemical sensing of ultra-trace multiple heavy metals using metal-organic frameworks -graphene oxide nanocomposite-modified electrodes. ACS Omega 2025, 10, 55950-55963.

31. Kalambate, P.K., Manoj, D. Historical evolution of electrodes and their impact on electrochemical sensing and biosensing. ECS Sens. Plus 4, 2025, 041601.
32. Kotnala, S., Tiwari, S., Nayak, A., Bhushan, B., Chanda, S., Medeiros, C.R., Coutinho, H.D.M. Impact of heavy meatl toxicity on the human health and environment. Sci. Total Env. 2025, 987, 179785.
33. Manasa, G., Rout, C.S. Versatile MXeene as electrochemical sensors for heavy metal ions and phenolic moiety – containing industrial chemicals: recent development and prospects. Mater. Adv. 2024, 5, 83.
34. Parthasarathy, J., Kumar, S.S., Sundaratajan, J. AI-driven graphene-based electrochemical sensors for predictive detection of heavy metals in waste water. Microchem. J. 2026, 221, 116839.
35. Rasin, P., Ashwathi, A.V., Basheer, S.M., Haribabu, J., Santibanez, J.F., Garrote, C.A., Arubraj, A., Mangalaraja, R.V. . Exposure to cadmium and its impacts on human health: a short review. J. Hazard. Mat. Adv. 2025, 17, 100608.
36. Saqib, M., Solomonenko, A.N., Hazra, N.K., Aljasar, S.A., Korotkova, E.I., Dorozhko, E.V., Vashisth, M., Kar, P.K. Electrochemical detection of heavy metals using graphene-based sensors: advances, meta-analysis, toxicity, and sustainable development challenges. Biosensors 2025, 15, 505.
37. Sengupta, J., Hussain, C.M. Sensitive and selective detection of heavy metal ions and organic pollutants with graphene-integrated sensing platforms. Nanoscale 2024, 16, 14195-14212.
38. Stefan-van Staden, R.I. Perspective – challenges in biomedical analysis: from classical sensors to stochastic sensors. ECS Sens. Plus 1, 2022, 011602.
39. Sultana, S.F., Iqbal, U.M., Suseela, S.B., Anbazhagan, R., Chinthaginjala, R., Chitathuru, D., Ahmad, I., Kim, T. Electrochemical sensors for heavy metal ion detection in aqueous medium: a systematic review. ACS Omega 2024, 9, 25493-25512.
40. Tian, Y., Liu, J., Qiao, J., Ge, F., Yang, Y., Zhang, Q. Advancements in electrochemical sensing technology for heavy metals ions detection. Food Chem.X, 2025, 25, 102204.
41. Turner, A.P.F. Perspective – an age of sensors. ECS Sens. 2022, Plus 1, 011601.

42. Yan, J., Liu, R., Shi, J., Yang, W., Jiang, S., Zhang, Z., Jiang, M. Ultrasensitive, multi-component, and real-time detection of heavy metal ions via AgNPs@Cu-TCPP(Pt) sensitized strong coupling plasmonic sensor. Chem. Eng. J. 2025, 514, 162772.
43. Zhou, J., Deng, L., Li, X., Lv, S., Lu, Z., Chen, L., Gao, Y., Zhang, S., Chen, H., Lu, L. Confined MnO nanoparticles in N-doped carbon nanotubes for ultrasensitive anodic stripping voltammetry analysis of Pb(II) and Hg(II). Talanta 2026, 296, 128423.
44. Sahith, V.N.; Kumar J., A.; Sruti, V.S.; Sathish, S.; Venkatesan, D.; Prabu, D.; Samrot, A.V. Microbial and Enzymatic Biodegradation of Microplastics and Nanoplastics: Advances, Challenges, and Sustainable Solutions for Environmental Remediation. Desalin. Water Treat. 2025, 324, 101451. DOI: 10.1016/j.dwt.2025.101450.
45. Nadudvari, A.; Misz-Kennan, M.; Fabianska, M.; Ciesielczuk, J.; Krzykawski, T.; Simoneit, B.R.T.; Marynowski, L. Preservation of Labile Organic Compounds in Sapropelic Coals From the Upper Silesian Coal Basin, Poland. Int. J. Coal Geol. 2023, 267, 104186. DOI: 10.1016/j.coal.2023.104186.
46. Obuka, V.; Boroduskis, M.; Ramata-Stunda, A.; Klavins, L.; Klavins, M. Sapropel Processing Approaches Towards High Added-Value Products. Agron. Res. 2018, 16, 1142-1149. DOI: 10.15159/AR.18.119.
47. Lipizer, M.; Berto, D.; Cermelj, B.; Fafandjel, M.; Formalewicz, M.; Hatzianestis, I.; Ilijani´c, N.; Kaberi, N.; Kralj, M.; Matijevic, S.; Jack, M.E.M.; Parinos, C.; Tronczynski, J.; Giani, M. Trace Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Eastern Mediterranean Sediments: Concentration Ranges as a Tool for Quality Control of Large Data Collections. Marine Poll. Bull. 2022, 185, 114181. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.114181.
48. Oksana, S.; Polovko, N.; Maloshtan, L.; Liubov, S. Study of Anti-inflammatory Activity of Medicinal Products with Sapropel Extract on the Model of Acute Photodynamic Skin Injury in Rats. Res. J. Pharm. Tech. 2020, 13, 4381-4386. DOI: 10.5958/0974-360X.2020.00774.X.
49. Pavlovska, I.; Klavina, A.; Auce, A.; Vanadzins, I.; Silova, A.; Komarovska, L.; Silamikele, B.; Dobkevica, L.; Paegle, L. Assessment of Sapropel Use for Pharmaceutical Products

According to Legislation, Pollution Parameters, and Concentration of Biologically Active Substances. Sci. Rep. 2020, 10, 21527. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78498-6

50. Abalasei, M.E.; Teodosiu, C. A Critical Analysis of Drinking Water Quality Policies and Regulations in Romania. Bull. Inst. Politehnic Iasi. 2025, 71, 123-143. DOI: 10.5281/zenodo.17357581.
51. Wang, Q.; He, X.; Luo, Y.; Xu, J.; Li, Z. Simultaneous determination and removal assessment of organochloride pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in wastewater treatment plants, Zunyi, China. Water Resour. Ind. 2026, 35, 100345. DOI: 10.1016/j.wri.2026.100345.
52. Lazar, L.; Gomoiu, M.T.; Boicenco, L.; Vasiliu, D. Total organic carbon (TOC) of the surface layer sediments covering the seafloor of the Romanian Black Sea coast. Geo-Eco Marina 2012, 18. 121-132.
53. Habimana, E.; Sauve, S. A review of properties, occurence, fate, and transportation mechanisms of contaminants of emerging concern in sweage sludge, biosolids, and soils: recent advances and future trends. Front. Env. Chem. 2025, 6, 1547596. DOI: 10.3389/fenvc.2025.1547596.
54. B.A. Gomes de Melo, F. Lopes Motta, M.H.A. Santana, Humic acid: structural properties and multiple functionalities for novel technological developments, Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., Vol. 62, 2016, pp. 967-974.
55. A.M. Brondi, J. Daniel, V.X. Monteiro de Castro, A. Bertoli, J.S. Garcia, M.G. Trevisan, Quantification of humic and fulvic acids, macro- and micronutrients and C/N ratio in organic fertilizers, Comm. Soil Sci. Plant Anal., Vol. 47, Iss. 22, 2016, pp. 2506-2513.
56. R.I. Stefan-van Staden, R.M. Ilie-Mihai, L. Magerusan, M. Coros, S. Pruneanu, Anal. Bioanal. Chem.2020, 412, 3199–3207.
57. M. Kamalakannan, J. Thomas, N. Chandrasekaran, Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastics in combination with their copper nanoparticle co-pollutants in Artemia salina, Environ. Sci.: Nano, Vol. 11, 2024, pp. 4074-4088.
58. S. Wang, Z. Liang, Y. Wang, H. Jin, S. Li, R. Guan, Humic acid as eco-friendly corrosion inhibitor for EH40 ship plate steel, Surf. Interface Anal., Vol. 56, Iss. 9, 2024, pp. 654-665.

59. J. Chen, B. Zhang, C. Wang, P. Wang, G. Cui, H. Gao, B. Feng, J. Zhang, Insight into the enhancement effect of humic acid on microbial degradation of triclosan in anaerobic sediments, J. Hazard Mater., Vol. 461, 2024, 132549.
60. L. Jarukas, L. Ivanauskas, G. Kasparaviciene, J. Baranauskaite, M. Marksa, J. Bernatoniene, Determination of organic compounds, fulvic acid, humic acid, and humin in Peat and sapropel alkaline extracts, Molecules, Vol. 26, Iss. 10, 2021, 2995.
61. R.I. Stefan-van Staden, A.E. Sandu-Dorneanu, C. Cioates Negut, G. Stanciu, Fast analysis of humic acid in mud and water samples, J. Electrochem. Soc., Vol. 171, 2024, DOI 10.1149/1945-7111/ad8fd6.
62. E. DeVoe, S. Andreescu, Review – catalytic electrochemical biosensors for dopamine: design, performance, and healthcare applications, ECS Sens. Plus, Vol. 3, Iss. 2, 2024, 020601.
63. C.J. Weber, M.D. Whisonant, O. Clay, O. Simoska, Perspective – Surface – display techniques in electrochemical biosensor designs for health monitoring, ECS Sens. Plus, Vol. 3, Iss. 2, 2024, 020603.
64. AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, DC Gheorghe, Ultrasensitive and fast determination of fulvic acid in sapropel and in the Techirghiol Lake water, Electroanalysis, 2025, 37, e70050.
65. Kazmierkiewicz, K., Chojnacka, M., Lis, M.E., Ciechauska, E., Kapusniak, K., Suszczyhska, W., Rumianek-Fidziukiewicz, K. & Lasota, Z., The effect of fulvic acid on Alzheimer's disease – a systematic review, Quality on Spot, 2025, 41, 60196.
66. Winkler, J. & Ghosh, S., Terapeutic potential of fulvic acid in chronic inflammatory diseases and diabetes, J. Diabetes Res., 2018, 5391014.
67. Hoseinifar, S.H., Fazelan, Z., Lieke, T., Nedaei, S., Safari, R, Yazici, M. & van Doan, H., Effects of fulvic acid on zebrafish (Danio rerio) growth, immunity and antioxidant status, Comp. Biochem. Phys. B, 2025, 277, 111073.
68. Klavina, A., Reste, J., Martinsone, I., Vanadzins, I. & Lece, A., Unlocking the therapeutic potential of freshwater sapropel extracts: in vitro analysis and antioxidant profiling for skincare applications, Medicina, 2024, 60, 546.

69. Aoyama, M., Separation and spectroscopic characterization of soil fulvic acid constituents by hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography with π-π interactions, Soil Sci. Plant Nutr., 2025, 71, 18-26.
70. Wu, F.C., Evans, R.D., Dillon, P.J. & Cai, Y.R., Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters, App. Geochem., 2007, 22, 1598-1605.
71. de Wuilloud, J.C.A., Wuilloud, R.G., Sadi, B.B.M. & Caruso, J.A., Trace humic and fulvic acid determination in natural water by cloud point extraction/preconcentration using non-ionic and cationic surfactants with FI-UV detection, Analyst, 2003, 128, 453-458.
72. Gan, D., Kotob, S.I. & Walia, D.S., Evaluation of a spectrophotometric method for practical and cost effective quantification of fulvic acid, Ann. Env.Sci., 2007 , 1, 11-15.
73. Ghabbour, E.A. & Davies, G., Spectrophotometric analysis of fulvic acid solutions - a second look, Ann.Env.Sci., 2009, 3, 131-138.
74. Soares, H.M.V.M. & Vasconcelos, M.T.S.D., Study of the lability of copper(II)-fulvic acid complexes by ion selective electrodes and potentiometric stripping analysis, Anal.Chim.Acta, 1994, 293, 261-270.
75. Gokula Krishnan S.A., Gumpu M.B., Arthanareeswaran G., Goh P.S., Aziz F. & Ismail A.F., Electrochemical quantification of atrazine-fulvic acid and removal through bismuth tungstate photocatalytic hybrid membranes, Chemosphere, 2023, 311, 137016.
76. Liu, T., Lu, X., Patel, R.J., Eldredge, R., Padilla, D.J., Kayastha, V. & Zhu, J., A self-powered electrochemical sensor based on a zinc-air battery for oxygen detection, ECS Sens. 2024, Plus, 4, 020601.
77. Kalligosfyri, P.M., Miglione, A. & Cinti, S., Screen-printing and 3D-printing technologies in electrochemical (bio)sensors: opportunities, advantages and limitations, ECS Sens. Plus . 2025, 4, 010601.
78. Stefan-van Staden, R.I., Ion, C.B., van Staden, J.F., Cioates Negut, C. & Ilie-Mihai, R.M., New stochastic sensors for simultaneous determination of ochratoxin A, and of aflatoxins B1 and M1 in food and biological samples, ECS Sens. Plus, 2024, 3, 042801.

79. Gheorghe, D.C., Stefan-van Staden, R.I., Ilie-Mihai, R.M. & Sfarloaga, P., Nanoplatform-based analysis for the detection of HER3 and HER4 for gastric cancer diagnosis, Nanotechnol., 2023, 34, 345101.
80. Han F., Wu Y., Zhao Y., Jing W., Zheng K., Wang C., Wang S., Zhang Y., Dong T. & Jiang Z., Superior sensitive graphene fiber sensor enabled by constructing multiple nanoembossments for glucose detection, Microsyst. Nanoeng., 2025, 11, 48.
81. Zhan M., Xu M., Lin W., He H. & He C., Graphene oxide research: current developments and future directions, Nanomaterials, 2025, 15, 507.
82. Fobiri K., Eghan B., Seidu R.K. & Tawiah B., A review of functionalized graphene-oxide in wearable textile sensors and supercapacitors for biomedical applications, Essential Chem., 2025, 2, 2493111.
83. Ramirez C.A., Thiruppathi A.R., Ozoemena O. & Chen A., Recent advances in graphene oxide-based electrochemical sensors, Canadian J. Chem., 2024, 102, 667-681.
84. Muedas-Taipe G., Badawi M., Baena-Moncada A.M., Ponce-Vargas M., Rational design of electrochemical sensors based on quinone derivatives adsorbed on graphene for the detection of $[Cd(CN)_4]^{2-}$, Phys. Chem. Chem. Phys., 2025, 27, 12211-12219.
85. Wei N., Xiao Y., Jin Y., Zhang L., Chen P. & Du S., Thioether-bridged carbon dots-dopamine quinone conjugate probe for glutathione conjugate probe for glutathione sensing and discrimination between glioblastoma and normal cells, Talanta, 2025, 249, 128249.
86. Gosser D.K., Cyclic Voltammetry Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms, VCH Publishers, 1993.
87. X. Meng, Z. Li, W. Yue, L. Zhang, Z. Xie, Towards at-home and wearable monitoring of female hormones: emerging nanotechnologies and clinical prospects, ACS Sens., 2025, 10, 54-75.
88. J.C. Corton, G. Matteo, B. Chorley, J. Liu, B. Vallanat, L. Everett, E. Atlas, M.J. Meier, A. Williams. C.L. Yauk, A 50-gene biomarker identifies estrogen receptor-modulating chemicals in a microarray compendium, Chem.-Biol. Interact., 2024, 394, 110952.
89. F. Gersh, J.H. O'Keefe, A. Elagizi, C.J. Lavie, J.A. Laukkanen, Estrogen and cardiovascular disease, Prog Cardiovasc Dis, 2024, 84, 60-67.

90. F.L. Mart, I. Gutmark-Little, T. Streich-Tilles, A.T. Trout, J. Khoury, K. Bowers, L. Casnellie, P. Backeljauw, Current recommended estrogen dosing for pubertal induction in turner syndrome results in normal uterine growth, J.Clin. Endocrin. Metabol., 2024, 109.
91. C. Tortolini, V. Gigli, A. Angeloni, A. Isidori, R. Antiochia, Simple and sensitive voltammetric sensor for in-situ clinical and environmental 17-β-estradiol monitoring, Electroanalysis, 2024, 36, e202300417.
92. J.S. Seok, H.Ju, Ultrahigh-sensitivity detection of 17-β-estradiol, Chemosensors, 2024, 12, 61.
93. S. Ren, Y. Feng, Y. Zhang, Y. Liu, J. Zhao, X. Li, J. Li, H. Jia, Z. Li, X. Lou, Optical-fiber sensor for 17β-estradiol-binding aptamer evaluation and specific detection of 17β-estradiol in serum at physiological concentrations, Talanta,2025, 285, 127320.
94. H.S. Gumaih, A.H.M. Almawgani, M.G. Daher, Y.S. Adam, S.A. Taya, Y.K. Prajapati, Novel detection of progesterone and estradiol levels in blood using sensitive SPR biosensor employing cerium oxide and MXene nanomaterial, 2024 https://doi.org/10.1007/s12596-024-02352-5.
95. W. Kim, Y.L. Cha, D.J. Kim, Advances and challenges in molecularly imprinted conducting and non-conducting polymers for selective and sensitive electrochemical sensors, ECS Sens. Plus, 2025, 4, 015201.
96. N. Alyamni, J.L. Abot, A.G. Zestos, Perspective-advances in voltammetric methods for the measurement of biomolecules, ECS Sens. Plus, 2024, 3, 027001.
97. Casanova, A. Gomis-Berenguer, C.E. Banks, J. Iniesta, Insights into the electrochemical behaviour of brominated RNA nucleobases at microband screen-printed graphite electrodes, Electrochim.Acta, 2025, 524, 146000.
98. R. Šelešovská, O. Matvieiev, R. Sokolová, M. Vojs, K. Schwarzová-Pecková, Electrochemical oxidation of triticonazole on boron-doped diamond-based electrodes for analysis of real matrices, Sens. Actuat. B, 2025, 430, 137331.
99. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, Trends Anal. Chem. 2013, 50, 78–84.

100. F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE—analytical GREEnness metric approach and software, Anal. Chem. 2020, 92(14), 10076–10082.
101. F.R. Mansour, J. Płotka-Wasylka, M. Locatelli, Modified GAPI (MoGAPI) Tool and Software for the Assessment of Method Greenness: Case Studies and Applications. Analytica, 2024, 5, 451–457.
102. N.O. Gomes, A.M. de Campos, M.L. Calegaro, S.A.S. Machado, O.N. Oliveira Jr., P.A. Raymundo-Pereira, Core-Shell Nanocables Decorated with Carbon Spherical Shells and Silver Nanoparticles for Sensing Ethinylestradiol Hormone in Water Sources and Pills, ACS Appl. Mater. Interfaces 2024, 16, 10897–10907.
103. Stefan-van Staden, R.I.; Chera-Anghel, I.A.; Cioates Negut, C. Fast screening of milk for deoxynivalenol. Food Chem. 2025, 463, 141337.
104. AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, DC Gheorghe, 2D Disposable stochastic strip for ultrasensitive assay of Pb(II) and Cd(II) in sapropel, Chemosphere, 2026, 400, 144902.
105. AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, G Stanciu, D Danilov, HY Aboul-Enein, Preliminary Screening of Persistent Organic Pollutants in the Water and Sludge of Techirghiol Lake Using GC-ECD, J. Env. Sci. Health, Part B, 2026; https://doi.org/10.1080/03601234.2026.2685438
106. RI Stefan-van Staden, AE Sandu Dorneanu, C Cioates Negut, G Stanciu, Fast analysis of humic acid in mud and water samples, J. Electrochem.Soc., 2024, 171, 117515.
107. AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut, Disposable electrochemical sensor for determination of humic acid in sapropel and in water samples, UPB Sci Bull, 2025, 87(3), 97-102.
108. AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut, G Stanciu, A Dan, Determination of estradiol in surface waters and related mud samples, Microchem. J., 2025, 214, 114067.

Anexa 1 Participări la Conferințe

1. Rosca Adrian Comin, **Andreea-Elena Dorneanu**, Aspecte biofarmaceutice recente privind administrarea medicamentelor pe cale cutanata- **poster**, MED-FARM LAB Galati, Octombrie 06-08.
2. **Andreea-Elena Dorneanu**, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Catalina Cioates Negut, Gabriela Stanciu, Determination of Estradiol in Sapropel and Water using a New Stochastic Microsensor, - **poster,** 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering Constanța - Mamaia, ROMANIA, September 4 – 7, 2024.
3. **Andreea-Elena Dorneanu**, Raluca-Ioana van Staden, Catalina Cioates Negut, Gabriela Stanciu, Determination of humic acid in sapropel using a new stochastic sensor – **poster** PN8, INTERNATIONAL CONFERENCE ″CHIMIA″ 2024, NOMARES Workshop, 30th of May – 1st of June 2024, Constanta, Romania, ISSN 2360-3941, p. 139.
4. **Andreea-Elena Dorneanu**, Raluca-Ioana van Staden, Catalina Cioates Negut, Gabriela Stanciu, Determination of estradiol and humic acid in sapropel and Techirghiol lake water- **poster**, Eurachem Workshop-Complex Matrices: Applications, Laboratory Standards, and Accreditation, Bucharest, ROMANIA, May 26 – 27, 2025, p. 63.

Anexa 2 Lucrări publicate ISI Journals

1. Fast analysis of humic acid in mud and water samples
   RI Stefan-van Staden, **AE Sandu Dorneanu**, C Cioates Negut, G Stanciu
   J. Electrochem.Soc., 171, 117515, 2024 **Q2, FI = 3.3**

2. Disposable electrochemical sensor for determination of humic acid in sapropel and in water samples
   AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut
   UPB Sci Bull, 87(3), 97-102, 2025 **Q4, FI = 0.147**

3. Determination of estradiol in surface waters and related mud samples
   AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, C Cioates Negut, G Stanciu, A Dan
   Microchem. J., 214, 114067, 2025 **Q1, FI = 5.1**

4. Ultrasensitive and fast determination of fulvic acid in sapropel and in the Techirghiol Lake water
   AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, DC Gheorghe
   Electroanalysis, 37(9), e70050, 2025 **Q3, FI = 2.3**

5. 2D Disposable stochastic strip for ultrasensitive assay of Pb(II) and Cd(II) in sapropel
   AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, DC Gheorghe
   Chemosphere, 400, 144902, 2026. **Q1, FI =8.8**

6. Preliminary Screening of Persistent Organic Pollutants in the Water and Sludge of Techirghiol Lake Using GC-ECD
   AE Sandu Dorneanu, RI Stefan-van Staden, G Stanciu, D Danilov, HY Aboul-Enein
   Journal of Environmental Science and Health, Part B, 00, 000, 2026; https://doi.org/10.1080/03601234.2026.2685438 **Q4, FI = 1.8**

Cite score: 21.1