

| | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Pranuar me: 10-10-2022 | | | |
| Nj. org. | Numër | Sasia | Vlera |
| 01 | 5075 | 3 | - |

UNIVERSITETI I PRISHTINËS

“HASAN PRISHTINA”

FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKO-NATYRORE

Rr. "Eqrem Qabej" p.n.10 000 Prishtinë Republika e Kosovës

Tel. +381(0)38 249 872/ 249 873/ 249 874, Fax. +38138 226 104, Mail. fshmn@uni-pr.edu

KËRKESË

Për: Këshillin Mësimor të Departamentit të Kimisë.

Këshillin e Studimeve të Doktoratës - FSHMN

Këshillin e Fakultetit të Shkencave Matematike – Natyrore

Lënda: Formimi i komisionit për vlerësimin e dorëshkrimit të temës së doktoratës

Sipas Statutit të Universitetit dhe Rregullores ekzistuese të studimeve të Doktoratës, unë Msc. Arbër Frangu student i doktoratës konsideroj që i plotësoj të gjitha kushtet për vlerësim të dorëshkrimit, dhe me këtë i drejtohem titujve të lartpërmendur që të më mundësohet formimi i

Komisionit për vlerësimin e dorëshkrimit të temës së doktoratës me titull:

“Biosensori elektrokimik bazuar në tirozinazë për përcaktimin e komponimeve fenolike”

Kërkesës ju bashkangjes:

1. Tri publikime shkencore të publikuar në revista ndërkombëtare me faktor të impaktit dhe të indeksuara në platformat më kredibile të kohës, nga lëmia e fushës përkatëse.
2. Dëshmi për pjesëmarrje në konferenca shkencore
3. Kopjet e dorëshkrimit
4. Pëlqimi për dorëzim të dorëshkrimit të temës së doktoratës nga Mentori përkatës

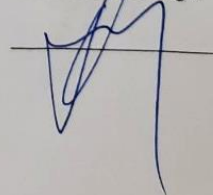
Më : 07 / 10 / 2022, Prishtinë

Email: arbfrangu@gmail.com

arber.frangu@uni-pr.edu

Emri dhe Mbiemri

Msc. Arbër Frangu



| | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Pranuar me: 10.10.2022 | | | |
| Nj. org. | Numër | Sasia | Vlera |
| 01 | 5076 | 3 | - |

UNIVERSITETI I PRISHTINËS
"HASAN PRISHTINA"

FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKO-NATYRORE

Rr. "Eqrem Qabej" p.n.10 000 Prishtinë Republika e Kosovës

Tel. +381(0)38 249 872/ 249 873/ 249 874, Fax. +38138 226 104, Mail. fshmn@uni-pr.edu

Për: Këshillin e Departamentit të Kimisë.

Këshillin e Studimeve të Doktoratës - FSHMN

Këshillin e Fakultetit të Shkencave Matematike – Natyrore

Lënda: Pëlqimi nga mentori për dorëzimin e dorëshkrimit të temës së doktoratës me titull:

"Biosensori elektrokimik bazuar në tirozinazë për përcaktimin e komponimeve fenolike"

dhe në gjuhën angleze :

"Tyrosinase based electrochemical biosensor for determination of phenolic compounds"

Mendimi:

Dorëshkrimi i temës së doktoratës përmban rezultatet në fushën e kimisë analitike konkretisht në fushën e elektroanalitikës, që kanë të bëjnë me zhvillimin e sensorëve dhe biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e komponimeve fenolike. Fokusi është i vendosur në komponimet fenolike me veti antioksiduese për destinime farmaceutike.

Metodat elektrokimike, si voltametria ciklike dhe amperometria hidrodinamike janë përdorur për zhvillimin e sensorëve në fjalë, konkretisht për të hulumtuar sipërfaqet e elektrodave, mekanizmin e reaksioneve redokse, efektet e modifikueseve dhe performacat për sistemet analitike të trajtuara.

Si elektroda punuese janë përdorur kryesisht materiale nga karboni si: karbon qelqor, pastë e grafitit, diamant i dopur me bor dhe elektroda të printuara të karbonit. Ndërsa si modifikues janë përdorur grafeni, nanotuba të karbonit dhe enzima (tirozinazë).

Rezultatet e fituara kanë treguar që biosensori elektrokimik i bazuar në përdorimin e elektrodave të printuara të karbonit të llojit DS-150, të modifikuara me grafen dhe tirozinazë është shumë efektiv në përcaktimin e paracetamolit në tabletat farmaceutike dhe gjithashtu në mostrat fiziologjike të cilat kanë një matriks mjaft komplekse siç është urina ku përcaktimet janë shpesh herë të vështira për shkak të interferimeve nga përbërësit e matriksit. Kështu biosensori në fjalë ka arritur të operojë në potencial(E) 0.00 V, rend linear deri në $130 \mu\text{mol L}^{-1}$, limit të përcaktimit $1.1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Gjithashtu edhe biosensorët tjerë janë treguar të aftë për të përcaktuar polifenolet dhe kapacitetin total antioksidues.

Sensorët e zhvilluar janë krahasuar me metoda tjera standarde dhe kanë treguar korrelacion të mirë sa i përket rezultateve gjatë matjeve në mostra reale ose standarde.

Si argument i asaj që u tha më lartë, nga këto hulumtime është arritur të botohen tre artikuj shkencorë në revista me faktor të impaktit dhe të gjitha të indeksuara në platformat më kredibile të kohës, por gjithashtu rezultatet e arritura janë prezantuar edhe në konferenca të ndryshme ndërkombëtare.

Artikujt shkencor të botuar:

1. **A. Frangu**, K. Pravcová, P. Šilarová, T. Arbneshi, M. Sýs, "Flow injection tyrosinase biosensor for direct determination of acetaminophen in human urine" Analytical and bioanalytical chemistry 2019, 411 (11), 2415-2424 <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01687-4> (**Faktor të impaktit 4.47**)
2. **A. Frangu**, AM. Ashrafi, M. Sýs, T Arbneshi, R. Metelka, V. Adam, M. Vlček, "Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes" Applied Sciences 2020, 10 (7), 2497 <https://doi.org/10.3390/app100724974>. (**Faktor të impaktit 2.83**).
3. T. Arbneshi, **A. Frangu**, M. Frühbauerová, L. Červenka, L. Berisha, K. Kalcher and M. Sýs. Flow Injection Amperometric Evaluation of Antioxidant Capacity of Chocolates Having Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode. Food Technology and Biotechnology <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6984> (**Faktor të impaktit 2.33**)

dhe janë realizuar pjesëmarrje në këto konferenca shkencore:

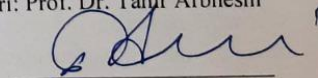
1. **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Kurt Kalcher, Milan Sýs: "Determination of total antioxidant capacity using boron doped diamond electrode in flow injection mode", 3rd Webinar on Nanotechnology & Nanomaterials, March 22-23, 2021
2. **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Milan Sýs: "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", 1st INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL SCIENCES, (10-12 SEPTEMBER 2021 Atatürk University, ERZURUM, TURKEY)
3. **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Milan Sýs "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", TNT2021 International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

Bazuar në atë që u tha më lartë, në cilësi të mentorit mendoj se hulumtimi i përmbush kriteret e punimit të doktoratës, paraqet kontribut domethënës në elektroanalitikë sidomos në fushën e biosensorëve elektrokimik dhe si tillë i përmbush kriteret për procedim sipas rregullores së studimeve të doktoratës në Universitetin e Prishtinës.

Prishtinë.

Datë: 10 / 10 / 2022

Mentori: Prof. Dr. Tahir Arbneshi



UNIVERSITETI I PRISHTINËS "HASAN PRISHTINA"

F6- Paraqitja e punimit të doktoratës

| PARAQITJA E PUNIMIT TË DOKTORATËS ¹ | |
|--|---|
| TË DHËNAT E PËRGJITHSHME | |
| Doktoranti: | Msc. Arbër Frangu |
| Adresa: | Rr. " 3 Prilli" , Sllatinë e Poshtme, Viti |
| Tel./ fax: | +383 44 23 55 29 |
| E-mail: | arhfrangu@gmail.com arber.frangu@uni-pr.edu |
| Emërtimi i studimit: | Doktoratë – Programi Kimi |
| Udhëheqësi i studimit: | Universiteti i Prishtinës " Hasan Prishtina" |
| TË DHËNAT PËR PUNIMIN E DOKTORATËS | |
| Titulli në gjuhën shqipe | "Biosensori elektrokimik bazuar në tirozinazë për përcaktimin e komponimeve fenolike" |
| Titulli në gjuhën angleze | "Tyrosinase based electrochemical biosensor for determination of phenolic compounds" |
| Fusha e hulumtimit | Kimi |
| DEKLARATA E MENTORIT/BASHKËMENTORIT | |
| <p>Mendimi:</p> <p>Teza e doktoratës përmban përmban rezultatet në fushën e kimisë analitike konkretisht në fushën e elektroanalitikës, që kanë të bëjnë me zhvillimin e sensorëve dhe biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e komponimeve fenolike. Fokusi është i vendosur në komponimet fenolike me veti antioksiduese për destinime farmaceutike.</p> <p>Metodat elektrokimike, si voltmetria ciklike dhe amperometria hidrodinamike janë përdorur për zhvillimin e sensorëve në fjalë, konkretisht për të hulumtuar sipërfaqet e elektrodave, mekanizmin e reaksioneve redokse, efektet e modifikueseve dhe performacat për sistemet analitike të trajtuara.</p> <p>Si elektroda punuese janë përdorur kryesisht materiale nga karboni si: karbon qelqor, pastë e grafitit, diamant i dopur me bor dhe elektroda të printuara të karbonit. Ndërsa si modifikues janë përdorur grafeni, nanotuba të karbonit dhe enzima (tirozinazë).</p> <p>Rezultatet e fituara kanë treguar që biosensori elektrokimik i bazuar në përdorimin e elektrodave të printuara të karbonit të llojit DS-150, të modifikuara me grafen dhe tirozinazë është shumë efektiv në përcaktimin e paracetamolit në tabletat farmaceutike dhe gjithashtu në mostrat fiziologjike të cilat kanë një matricë mjaft komplekse siç është urina ku përcaktimet janë shpesh herë të vështira për shkak të interferimeve nga përbërësit e matricës. Kështu biosensori në fjalë ka arritur të operojë në potencial(E) 0.00 V, rend linear deri në 130 µmol L⁻¹, limit të përcaktimit 1.1 µmol L⁻¹. Gjithashtu edhe biosensorët tjerë janë treguar të aftë për të përcaktuar polifenolet dhe kapacitetin total antioksidues.</p> <p>Sensorët e zhvilluar janë krahasuar me metoda tjera standarde dhe kanë treguar korrelacion të mirë sa i përket rezultateve gjatë matjeve në mostra reale ose standarde.</p> <p>Si argument i asaj që u tha më lartë, nga këto hulumtime është arritur të botohen tre artikuj shkencorë në revista me faktor të lartë ndikimi dhe të gjitha të indeksuara në platformat më kredibile të kohës. Gjithashtu rezultatet e arritura janë prezantuar edhe në konferenca të ndryshme shkencore me karakter ndërkombëtarë.</p> | |

¹ Lutei që ta plotësoni formularin dhe ta dërgoni të nënshkruar me postë elektronike.

Artikujt shkencor të botuar:

1. A. Frangu, K. Pravcová, P. Šilarová, T. Arbnesi, M. Sýs, "Flow injection tyrosinase biosensor for direct determination of acetaminophen in human urine" *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019, 411 (11), 2415-2424 <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01687-4> (Faktor i impaktit 4.47)
2. A. Frangu, AM. Ashrafi, M. Sýs, T. Arbnesi, R. Metelka, V. Adam, M. Viček, "Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes" *Applied Sciences* 2020, 10 (7), 2497 <https://doi.org/10.3390/app100724974>. (Faktor i impaktit 2.83).
3. T. Arbnesi, A. Frangu, M. Frühbauerová, L. Červenka, L. Berisha, K. Kalcher and M. Sýs. "Flow Injection Amperometric Evaluation of Antioxidant Capacity of Chocolates Having Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode". *Food Technology and Biotechnology* <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6984> (Faktor të impaktit 2.33)

dhe janë realizuar pjesëmarrje në këto konferenca shkencore:

1. Arbër Frangu, Tahir Arbnesi, Kurt Kalcher, Milan Sýs: "Determination of total antioxidant capacity using boron doped diamond electrode in flow injection mode", 3rd Webinar on Nanotechnology & Nanomaterials, March 22-23, 2021.
2. Arbër Frangu, Tahir Arbnesi, Milan Sýs: "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", 1st INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL SCIENCES, (10-12 SEPTEMBER 2021 Atatürk University, ERZURUM, TURKEY).
3. Arbër Frangu, Tahir Arbnesi, Milan Sýs "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", TNT2021 International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

Bazuar në atë që u tha më lartë, në cilësi të mentorit mendoj se hulumtimi i përbush kriteret e punimit të doktoratës, paraqet kontribut domethënës në fushë e elektroanalitikës sidomos në fushën e biosensorëve elektrokimik dhe si tillë i përbush kriteret për procedim sipas rregullores së studimeve të doktoratës në Universitetin e Prishtinës.

Vendi, data dhe nënshkrimi

Në Prishtinë, 10 10 2022

Nënshkrimi

TAHIR ARBNESE

(Emri e mbiemri i mentorit)

UNIVERSITETI I PRISHTINËS "HASAN PRISHTINA"
FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKE-NATYRORE
PRISHTINË

Nënshkrimi

(Emri e mbiemri i bashkëmentorit)

| | | | |
|-------------------------------|-------------|----------|----------|
| Pranuar me: <u>10-10-2022</u> | | | |
| Nj. org. | Numër | Sasia | Vlera |
| <u>09</u> | <u>5077</u> | <u>3</u> | <u>-</u> |



CERTIFICATE OF RECOGNITION

Coalesce Research Group and the Organizing Committee
would like to thank

Prof/Dr/Mr/Ms. Arben Pranqju

University of Prishtina, Republic of Kosovo

for his remarkable Oral Presentation on

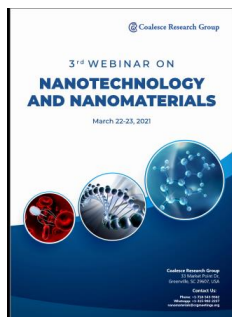
*“Determination of total antioxidant capacity using boron doped diamond
electrode in flow injection mode”*

3rd Webinar on

*“Material Science & Nanotechnology”
held during March 22-23, 2021*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alex'.

ALEXANDER RYAKHOVSKY
National Medical Research
Center of Dentistry, Russia



16:05 - 16:35 **Yuliyevna Shcherbakova**, Russian Academy of Science, Russia
 Physical and rheological properties of biodegradable poly (1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane (PBSu)/Alfa fiber composites
Wafaa Mahi, Abou Bekr Belkaid University, Algeria

Keynote Presentation


16:35 - 17:15 Design and development of smart and innovative multifunctional materials for sustainable applications
Maria Rosaria PLUTINO, ISMN-CNR, Italy

17:15 - 17:50 3D Printing an alternative for electrospinning in fabricating drug combination medical devices?
Mallesh Kurakula, University of Memphis, USA

Oral Presentations

17:50 - 18:20 Determination of total antioxidant capacity using boron doped diamond electrode in flow injection mode
Arbër Frangu, University of Prishtina, Republic of Kosovo

End of Day 2 Sessions



3rd Webinar on Nanotechnology & Nanomaterials

March 22 - 23, 2021 | 11:00 - 18:00 GMT (London Time)

DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY USING BORON DOPED DIAMOND ELECTRODE IN FLOW INJECTION MODE

Arbër Frangu¹, Tahir Arbnesi¹, Kurt Kalcher², Milan Sys³

¹University of Prishtina, Republic of Kosovo
²Karl-Franzens University, Austria
³University of Pardubice, Czech Republic

Abstract

Boron-doped diamond electrode (BDDE) shows good response on quantification of antioxidants as total antioxidant capacity (TAC), using flow injection analysis (FIA) system. As reference substances, hydroquinone (HQ) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) were studied in more details. The sensor could be operated under neutral pH (0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer), injection volume 100 µL, with an operating potential +0.6 V (vs. Ag/AgCl). However, BDDE shows higher responses at more positive potentials. The limits of detection (LOD) were 0.045 mg L⁻¹ and 0.95 mg L⁻¹ for HQ and Trolox, respectively. The repeatability was 1.64 % RSD (20 injection) and 2.59 % RSD (21 injection) for HQ and Trolox. Flow rate of 1 mL min⁻¹ for both HQ and Trolox was chosen as optimum. A relatively low background current makes to be BDDE useful for FIA analysis with amperometric detection at high positive potentials.



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This certificate is proudly presented to

Hakan Ozkan

in oral and online presentation,

recognition and appreciation of research contributions to

1st INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL SCIENCES (ICNAS-2021)

10-12 SEPTEMBER 2021

Atatürk University, ERZURUM, TURKEY

with the paper entitled

**"ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SCREEN-PRINTED CARBON
ELECTRODE MODIFIED WITH GRAPHENE AND TYROSINASE FOR DIRECT
DETERMINATION OF PARACETAMOL"**

Assoc. Prof. Dr. Hakan OZKAN
Congress co-Chairman
ATATURK UNIVERSITY /TURKEY

Assoc. Prof. Dr. Bekir GURBULAK
Congress Chairman
ATATURK UNIVERSITY /TURKEY

| | | |
|----------------|---|--|
| CHE49 P-111 | SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CuO/ZnO/Al ₂ O ₃ PARTICLES AND ITS UTILIZATION AS A CATALYST FOR ACRYLAMIDE DERIVATIVES | Northumbria University, Egypt |
| CHE50 P-112 | SOLVENT FREE SYNTHESIS OF THE CARBOXYMETHYL CELLULOSE/POLYANILINE SILVER NANOPARTICLES COMPOSITE THIN FILMS | Horus University EGYPT |
| CHE51 P-113 | PHASE RELATIONS IN THE MnSe-MnGa ₂ Se ₄ -MnIn ₂ Se ₄ SYSTEM AND CRYSTAL STRUCTURES OF Mn ₂ In ₂ Se ₅ , MnIn ₂ Se ₄ and MnGaInSe ₄ COMPOUNDS | ANAS, Azerbaijan |
| CHE52 P-114 | REINVESTIGATION OF THE PHASE EQUILIBRIA IN THE PbSe-Bi ₂ Se ₃ SYSTEM | Institute of Catalysis and Inorganic Chemistry, Azerbaijan |
| CHE53 P-115 | ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH GRAPHENE AND TYROSINASE FOR DIRECT DETERMINATION OF PARACETAMOL | University of Prishtina, Republic of Kosovo |
| CHE54 P-116 | NEW VARIABLE COMPOSITION PHASES in Sb-Bi-Te-I and Bi-Te-S-I SYSTEMS | ANAS, Baku, Azerbaijan |



1st INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL SCIENCES (ICNAS-2021)

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH GRAPHENE AND TYROSINASE FOR DIRECT DETERMINATION OF PARACETAMOL

Msc. Arbër Frangu, Dr.sc. Tahir Arbneshi

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10 000 Prishtina, Republic of Kosovo

Dr.sc. Milan Sys

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Corresponding author: milan.sys@upce.cz
(ORCID: 0000-0002-3982-3659)

ABSTRACT

The aim of this study was to develop an amperometric biosensor utilizing mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase (EC 1.14.18.1) suitable for the selective determination of acetaminophen in human urine. The presented biological device was based on a commercial screen-printed carbon electrode covered with a thin graphene layer (transducer) with an enzyme (bioreceptor) immobilized with glutaraldehyde and Nafion. Owing to the use of tyrosinase and presence of NFG, the developed analytical instrument is able to measure even at potentials of 0 V. Linear ranges differ according to choose of detection potential, namely up to 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at 0 V, up to 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.1 V, and up to 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.15 V. The first mentioned linear range is described by the equation $I_p [\mu\text{A}] = 0.236 - 0.1984c [\mu\text{mol L}^{-1}]$ and correlation coefficient $r = 0.9987$. The limit of detection of APAP was estimated to be 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A recovery of 96.8% ($c = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, $n = 5$ measurements) was calculated. Best flow rate in flow injection analysis was 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. It can be stated that this biosensor can be used to detect paracetamol in very complex samples such as urine, for the possibility of operation at potential 0V.

Keywords: Acetaminophen, Amperometry, Biosensor, Flow injection analysis, Tyrosinase



www.tntconf.org

Tirana (Albania)
October 04, 2021

This is to certify that

Arbër Frangu

from

University of Prishtina "Hasan Prishtina", (Republic of Kosovo)

has presented a Poster Contribution entitled: "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol" – Authors (Arbër Frangu, Tahir Arbnesi , Milan Sýs) at TNT2021 International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

On behalf of the Organising Committee



Dr. Antonio Correia
Phantoms Foundation, Spain

Phantoms Foundation - Calle Alfonso Gomez 17 / Planta 2 - Izt' 16 / 28037 Madrid (Spain) - www



www.tntconf.org

Tirana (Albania)
October 04, 2021

This is to certify that

Arbër Frangu

from

University of Prishtina "Hasan Prishtina", (Republic of Kosovo)

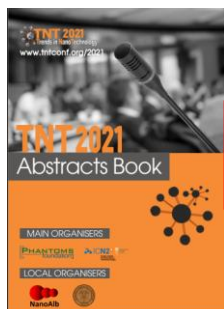
has attended "Trends in Nanotechnology (TNT2021)" International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

On behalf of the Organising Committee



Dr. Antonio Correia
Phantoms Foundation, Spain

Phantoms Foundation - Calle Alfonso Gomez 17 / Planta 2 - Izt' 16 / 28037 Madrid (Spain)



| | | | |
|---|---|----------------------|-----|
| Andrea Ferrari (Cambridge University/CGC, UK) | Layered Quantum Materials: A New Platform For The Next Digital Revolution | Plenary | - |
| Andrea Fiorani (Keio University, Japan) | Electrochemiluminescence application of boron-doped diamond electrodes | Cooperation Workshop | 117 |
| Arbër Frangu (University of Prishtina "Hasan Prishtina", Republic of Kosovo) | Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol | Poster | 135 |
| Meron Frankel Dinter (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) | Structure-function guided fabrication of biodegradable RNA-binding polymers | Keynote | 26 |
| Shanil Gandhi (Blusense Diagnostics APS, Denmark) | Antibody conjugated magnetic nanoparticles in agglutination assay for dengue biomarker detection | Poster | 137 |

TNT2021 • Tirana (Albania)

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH GRAPHENE AND TYROSINASE FOR DIRECT DETERMINATION OF PARACETAMOL

Arbër Frangu¹
Tahir Arbneshi¹
Milan Sys²

¹Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10 000 Prishtina, Republic of Kosovo

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

arber.frangu@uni-pr.edu

Abstract

The aim of this study was to develop an amperometric biosensor utilizing mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase (EC 1.14.18.1) suitable for the selective determination of acetaminophen in human urine. The presented biological device was based on a commercial screen-printed carbon electrode covered with a thin graphene layer (transducer) with an enzyme (bioreceptor) immobilized with glutaraldehyde and Nafion. Owing to the use of tyrosinase and presence of NFG, the developed analytical instrument is able to measure even at potentials of 0 V. Linear ranges differ according to choose of detection potential, namely up to 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at 0 V, up to 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.1 V, and up to 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.15 V. The first mentioned linear range is described by the equation $I_p [\mu\text{A}] = 0.236 - 0.1984c [\mu\text{mol L}^{-1}]$ and correlation coefficient $r = 0.9987$. The limit of detection of APAP was estimated to be 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A recovery of 96.8% ($c = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, $n = 5$ measurements) was calculated. Best flow rate in flow injection analysis was 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. It can be stated that this biosensor can be used to detect paracetamol in very complex samples such as urine, for the possibility of operation at potential 0V.



Flow injection tyrosinase biosensor for direct determination of acetaminophen in human urine

Arbër Frangu^{1,2} · Kateřina Pravcová² · Petra Šilarová² · Tahir Arbnesi¹ · Milan Sýs²

Received: 19 October 2018 / Revised: 14 January 2019 / Accepted: 12 February 2019 / Published online: 18 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

An amperometric biosensor compatible with a flow injection analysis (FIA) for highly selective determination of acetaminophen (APAP) in a sample of human urine was developed. This biosensor is also suitable for use in the routine pharmaceutical practice. To prove this statement, two different commercially available pharmaceutical formulations were analyzed. This nano-(bio)electroanalytical device was made from a commercially available screen-printed carbon electrode covered by a thin layer of non-functionalized graphene (NFG) as amperometric transducer. A biorecognition layer was prepared from mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase (EC 1.14.18.1) cross-linked using glutaraldehyde, where resulting aggregates were covered by Nafion[®], a known ion exchange membrane. Owing to the use of tyrosinase and presence of NFG, the developed analytical instrument is able to measure even at potentials of 0 V. Linear ranges differ according to choice of detection potential, namely up to 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at 0 V, up to 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.1 V, and up to 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.15 V. The first mentioned linear range is described by the equation $I_p [\mu\text{A}] = 0.236 - 0.1984c [\mu\text{mol L}^{-1}]$ and correlation coefficient $r = 0.9987$; this equation was used to quantify the content of APAP in each sample. The limit of detection of APAP was estimated to be 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A recovery of 96.8% ($c = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, $n = 5$ measurements) was calculated. The obtained results show that FIA is a very selective method for APAP determination, being comparable to the chosen reference method of reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Keywords Acetaminophen · Amperometry · Biosensor · Flow injection analysis · Tyrosinase · Human urine

Introduction

Acetaminophen (APAP), known also as paracetamol, is a *p*-aminophenol derivative (*N*-acetyl-*p*-aminophenol) with analgesic and antipyretic activities. APAP has widely replaced acetylsalicylic acid use in medicine [1]. In many countries, APAP is usually used as an alternative to aspirin and phenacetin [2]. The usual dose for adults is one or two 500 mg tablets

up to four times in 24 hours. The maximum recommended single dose for children is 500 mg usually over 8 hours, but this interval can be shortened [3]. Despite the recommended dosage, there is a serious risk of poisoning which causes up to 42% of acute liver failure and requires up to 300,000 hospitalizations per year [4]. The direct cost of APAP overdose has been estimated at \$87 million annually in the USA [5].

APAP is metabolized in the liver by conjugation to glucuronide, sulfate, and 4–15% is oxidized by cytochrome P450 (CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4) to the reactive *N*-acetyl-*p*-benzoquinone (NAPQI) metabolite which is conjugated with glutathione as a donor of SH groups. Most of the active substance is excreted from the body in the form of non-toxic metabolites in urine (40–60% as glucuronate, 30% as sulfates), and 2% in unchanged form [3]. In overdose, the production of the reactive metabolite NAPQI increases and unfortunately it can irreversibly bind to an SH group of at least 23 proteins (of which at least six are mitochondrial). Histological sections clearly indicate necrotic cell death by centrilobular hepatic necrosis [4, 6]. Thus, it is clear that

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01687-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Milan Sýs
milan.sys@upce.cz

¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10 000 Prishtina, Republic of Kosovo

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

selective determination of APAP in urine is of great importance in clinical analysis.

Flow injection analysis (FIA) utilizing screen-printed carbon electrodes (SPCE) or their modifications as amperometric detection systems is often used in analytical instruments in the pharmaceutical [7] and clinical analysis [8, 9]. APAP is usually directly detected at a constant positive voltage (oxidized) to form NAPQI with participation of $2e^-$ and $2H^+$ [10] or indirectly using catalytic biosensors [11–16]. Fundamentally, APAP is enzymatically oxidized to electroactive products which can be subsequently amperometrically detected. The former type is suitable for analysis of pharmaceuticals because interference from the accompanying substances is not expected. In contrast, different enzymes have been used in the construction of biosensors for the quantitative analysis of APAP. Tyrosinase biosensors represent an attractive alternative for APAP determination, given their better selectivity.

An aryl-acylamidase (EC 3.5.1.13) amperometric biosensor can be considered as the first type of these bioelectroanalytical devices. However, this biosensor is not suitable for use in the urine analysis because it is based on electrochemical oxidation of produced *p*-aminophenol whose determination is significantly interfered with in the presence of gentisic, ascorbic, and uric acids [11, 12]. Other biosensors utilized the polyphenol oxidase enzymes (EC 1.10.3.1) naturally occurring in avocado (*Persea americana*) [13] and eggplant (*Solanum melongena*) [14] tissues. As a result of the low catalytic activity of these enzymes, appropriate biosensors do not exhibit high enough sensitivity to be applied in clinical analysis.

The last type is represented by horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7) amperometric biosensors. These biosensors are based on electrochemical reduction of produced NAPQI at -0.2 V [15–17]. Although these biosensors are very sensitive analytical tools, they are not suitable for urine analysis because the matrix of urine provides a false positive signal. For that reason, they are preferred for pharmaceutical analysis. If the working potential is set to more negative values, the risk of interference by accompanying substances (products of oxidative metabolism) will increase because they will be reduced as well.

In 2003, a kinetic study of APAP oxidation by tyrosinase enzyme (EC 1.14.18.1) was performed [18]. In the first step, the APAP is hydroxylated to 4-acetamido-1,2-catechol (hydroxylase). Then, this intermediate product is oxidized to 4-acetamido-*o*-benzoquinone (4-AOBQ) in the second step (catecholase activity) [19, 20]. The resulting 4-AOBQ can be electrochemically reduced at a constant voltage with participation of $2e^-$ and $2H^+$ [21]. For application of tyrosinase biosensors in urine analysis it is very important that the reduction of 4-AOBQ begins at a potential closer to 0 V, unlike in cases of previously mentioned enzymatic sensors based on electrochemical reduction of NAPQI. At this detection potential, any

interference of substances contained in the sample matrix is not expected. The most common interfering substances (ascorbic acid and uric acid) are not subject to electrochemical reactions.

It should be noted that a tyrosinase biosensor for FIA has been already developed for real-time monitoring of the photocatalytic degradation of APAP [21]. An optimal potential of -0.05 V vs Ag/AgCl was found. Setting of this potential allowed the sensor to achieve good sensitivity while potential interferences were minimalized. However, this biosensor was not tested in the analysis of biological samples [21].

A completely new amperometric tyrosinase biosensor based on commercial screen-printed carbon electrode covered by a thin layer of graphene and Nafion[®] [22, 23] film embedded with tyrosinase enzyme cross-linked by glutaraldehyde [24] is presented. In this contribution, it is possible to understand why graphene [25] was preferred over popular carbon nanotubes [26], how the tyrosinase enzyme was anchored in the order to not be eluted during measurements, how amounts of cross-linker and polymer used for the tyrosinase encapsulation were chosen, and how other steps of time-consuming optimization were solved. Finally, the developed biosensor was tested in analysis of commercial drugs and spiked human urine from a healthy volunteer. The results obtained showed that flow injection analysis combined with the biosensor is a very selective analytical method for APAP determination, being comparable to reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with spectrophotometric detection, which was used as the reference method [27, 28]. It has to be also noted that a short lifetime was observed. This phenomenon is a typical disadvantage of tyrosinase-based biosensors [21, 29]. However, a solution to this problem was proposed.

Materials and methods

Materials and reagents

Acetaminophen, *N,N*-dimethylformamide (DMF), $\geq 99.9\%$ HPLC grade methanol, 25% glutaraldehyde (GTA), 5% Nafion[®] in 55% ethanol, hyaluronic acid sodium salt (30–50 kDa) from *Streptococcus equi*, chitosan (~ 50 kDa), and lyophilized powder of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase (EC 1.14.18.1) (119.5 kDa using electrophoresis) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). A single layer of non-functionalized graphene (NFG) (resistivity ≤ 0.30 Ω cm; specific surface area 400–1000 $m^2 g^{-1}$) was obtained from ACS Material, LLC (Medford, USA). Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) of diameter 10–30 nm, length 5–15 μm , specific surface area 40–300 $m^2 g^{-1}$, and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) of diameter < 2 nm, length 5–15 μm , specific surface area > 400 $m^2 g^{-1}$ both from Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd. (Shenzhen, China) were also tested as suitable surface modifiers. Highly purified

water (resistivity > 18 M Ω cm) was prepared using purification system Milli-Q from Merck Millipore (Burlington, USA). Chemicals needed for preparation of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PB) were from Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic).

Preparation of biosensor

A simple preparation of the SPCE/NFG amperometric transducer consisted of pipetting 20 μ L single layer graphene dispersion in DMF (2 mg mL⁻¹) onto a commercial screen-printed carbon electrode (DRP-150 from DropSens, Llanera, Spain) surface. The graphene dispersion in a small vial was carried out in an ultrasonic bath for 20 min. The resultant dispersed drop was left to dry under laboratory conditions for 24 h. Immobilization of tyrosinase enzyme on the transducer surface involved three separate steps. First, 5 μ L of enzyme solution (2.0 mg mL⁻¹) in PB was applied and allowed to dry under laboratory conditions for 30 min. After direct enzyme adsorption onto the thin graphene layer, individual enzyme molecules were cross-linked by addition of 1% glutaraldehyde (3 μ L) for 20 min to avoid excessive elution of the enzyme from the polymer used. Finally, 10 μ L fluoropolymer-copolymer solution (1% Nafion[®] neutralized with 8% ammonia solution [30]) was applied directly and allowed to dry under laboratory conditions for 30 min. When not in use, the biosensor was stored in a refrigerator at 5 $^{\circ}$ C.

Apparatus

Electrochemical experiments were performed using cyclic voltammetry in a conventional three-electrode arrangement consisting always of one of following electrodes: bare SPCE, SPCE/NFG, or SPCE/NFG/tyrosinase-GTA/Nafion[®] (proposed biosensor). All amperometric experiments were carried out using an FIA setup consisting of a multichannel peristaltic pump MINIPULS 3 from Gilson, Inc. (Middleton, USA), Rheodyne automatic six-stage dosing valve from IDEX Health & Science GmbH (Wertheim, Germany), the developed tyrosinase biosensor inserted into the wall-jet flow cell from DropSens (Llanera, Spain), and a computer. The different types of SPCEs were connected to a potentiostat/galvanostat AUTOLAB model PGSTAT101 operated via NOVA 1.11 software from Metrohm (Prague, Czech Republic).

Procedure

As supporting electrolyte, non-deaerated 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer of pH 7.0 was chosen for each electrochemical measurement owing to optimum tyrosinase biocatalytic activity in the neutral pH range. Characterization of the developed biosensor was accomplished using cyclic voltammetry of 500 μ mol L⁻¹ APAP at a potential window from -0.2 V to

+0.8 V, initial potential 0 V, potential step 5 mV, and scan rate 10 mV s⁻¹. Amperometric detection in the wall-jet configuration was usually performed at 0 V vs pseudo-reference silver electrode at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. Otherwise, any change in the working conditions is described in the legends of the corresponding figures.

Reference analysis by liquid chromatography

Chromatographic analysis was performed using a HPLC system equipped with a LC-20ADXR binary gradient pump, a DGU-20 degassing unit, a SPD-M30A DAD, a SIL-20 AC XR autosampler (all Shimadzu, Kyoto, Japan), and a LCO 102 column thermostat (Ecom, Prague). The optimum separation was achieved with an Ascentis Express C18 column (150 mm \times 3.0 mm, 2.7 μ m). The detection wavelength was set to 243 nm. The separation was performed with mobile phase consisting of 0.3% formic acid in water (A) and methanol (B) using a gradient program from 20% to 40% B for 10 min at constant temperature 30 $^{\circ}$ C. The flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and injection volume 5 μ L.

Sample preparation

Pills of Paralen[®] 500 and Tylex[®] 750 obtained from a Czech pharmacy were dissolved in a 250-mL volumetric flask using PB (amperometry) or 80% methanol (HPLC). The resulting solutions were filtrated through a polytetrafluoroethylene syringe filter with pore size 0.45 μ m and diluted 20-fold using deionized water.

Commercially available pooled normal human urine (50 mL) was purchased from Innovative Research, Inc. (Novi, USA) distributed by Divbio Science Europe (Ulvenhout, the Netherlands). Additionally, a sample of urine was obtained from a healthy volunteer who signed information consent. The obtained sample of human urine was anonymized before the study. Both urine samples were only artificially enriched with a defined amount of analyte and served only as a complex matrix. Thus, all experiments with urine samples were done in accordance with the WMA Declaration of Helsinki, June 1964.

A volume (250 μ L) of stock solution (0.01 mol L⁻¹ APAP in water) was pipetted into a 50-mL volumetric flask and then was filled to the mark with the human urine. Depending on the person's acid-base status, the pH of urine may range from 4.5 to 8. As a result of the very broad normal pH range and high salinity, the spiked urine sample had to be diluted a minimum of fivefold using PB and then was filtered through the 0.45- μ m polytetrafluoroethylene syringe filter before bioanalysis.

For HPLC analysis, the spiked urine sample was prepared according to the reported procedure [27, 28] with only minor modifications, because during optimization, it was found that acetonitrile can be fully replaced with methanol. The sample

of human urine (0.5 mL) with 4 mL of pure methanol was placed into a 10-mL volumetric flask. Several drops of 1.0 mol L^{-1} NaOH were added to the obtained solution to achieve the desired pH ~ 8 and the solution was completed to the mark by adding ultrapure water. The resulting mixture was centrifuged at 5000 rpm for 3 min, filtered through the $0.45\text{-}\mu\text{m}$ polytetrafluoroethylene syringe filter, and then injected into the liquid chromatograph.

All analyses of selected samples were always repeated five times and the final results are presented as confidence intervals $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}$, where \bar{x} is the arithmetic mean, s the standard deviation, and $t_{1-\alpha}$ the critical value of Student's t distribution (2.015) for a given number of determinations at a significance level α of 0.05 (95% probability).

Results and discussion

Biosensor design

The main objective of this study was to develop a highly sensitive and selective biosensor that could be used universally in the analysis of various pharmaceutical and clinical samples. In general, several necessary conditions must be met. Biosensors should be able to detect very low content of target analyte and provide a stable response for a long time duration (i). Substances other than analyte must not significantly affect the measurable signal (ii). If possible, they should be made from cost-effective materials (iii).

For amperometric sensors, it is necessary to have the biorecognition element (tyrosinase enzyme) as close as possible to the electrochemical transducer (electrode) which is often modified by conductive materials with high active surface area and catalytic effect. As mentioned above, the electrode surface should be as large as possible [31, 32]. Surfaces of SPCEs were modified by different types of non-functionalized carbon nanomaterials (CNs) to obtain the optimum amperometric transducer. Cyclic voltammetry (CV) showed that APAP provides significantly better electrochemical behavior at SPCE/NFG (see Electronic Supplementary Material (ESM) Table S1) than in the case of carbon nanotubes (CNTs). An explanation for this difference can be found by comparing the homogeneity of each surface structure which depends on the arrangement of CNs used. Immobilized CNTs create irregular skeins of various sizes and are mutually interconnected. Consequently, the active surface area of CNTs cannot be fully utilized unlike in the case of NFG which creates a structure of coarse cloth probably due to mutual interaction of graphene nanosheets having a typical planar configuration [33, 34]. Overall, the surface is characterized by higher homogeneity than in the previous case of CNTs. Thus, it is not surprising that more satisfactory repeatability of current response during amperometric detection can be predicted.

For effective immobilization of tyrosinase enzyme, three commonly used polymeric materials were tested, namely chitosan, hyaluronic acid sodium salt, and Nafion[®]. The presence of chitosan or hyaluronic acid caused many times higher increase in background current than in the case of Nafion[®]. For that reason, Nafion[®] was chosen as the optimum polymeric material for tyrosinase incorporation. As for glutaraldehyde used for preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [35], it was observed that addition of more than $3 \mu\text{L}$ of 1% solution causes a dramatically increased background current (baseline signal) and decreases the current response to APAP.

In order to investigate the suitable working electrode (see ESM Fig. S1a), APAP electrochemical behavior at different transducers was studied using cyclic voltammetry. No evident difference between using MWCNTs and SWCNTs was observed (see ESM Table S1). Figure 1 shows typical cyclic voltammograms obtained at bare SPCE, SPCE/NFG, and the biosensor itself. It was confirmed that APAP is reversibly oxidized to *N*-acetyl-*p*-benzoquinone-imine (NAPBQI) with participation of two electrons and two protons, as shown in ESM Fig. S1b. However, APAP undergoes hydroxylation reaction at the free *ortho* position and subsequent oxidation to form 4-acetamido-*o*-benzoquinone (4-AOBQ) in basic aqueous solutions [10]. This is a typical electrochemical oxidation pathway for *para*-substituted phenols at commonly used carbon-based electrodes [36]. The aforementioned hydroxylation reaction and subsequent oxidation of resulting 4-acetamido-1,2-catechol (3-OH-APAP) is dominant in the presence of tyrosinase enzyme (EC 1.14.18.1) from mushroom *Agaricus bisporus* which catalyzes these oxidation processes by dissolved oxygen due to cresolase and catecholase activity (see ESM Fig. S2), when the final products are 4-AOBQ and water.

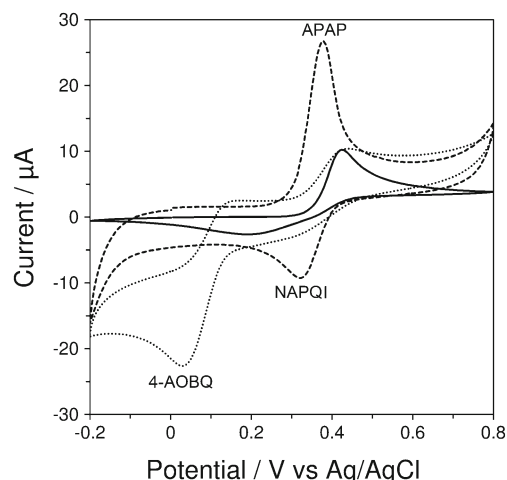


Fig. 1 Cyclic voltammetry of 0.5 mmol L^{-1} APAP at bare SPCE (solid line), SPCE/NFG (dashed), and tyrosinase biosensor (dotted line) performed in 0.1 mol L^{-1} PB pH 7 at 10 mV s^{-1}

Because of biosensor selectivity, it was important that cathodic reduction of 4-AOBQ starts at relatively high voltage (+0.146 V) with maximum current signal at +0.04 V vs pseudo-reference Ag/AgCl electrode (see Fig. 1). Consequently, amperometric detection at a constant voltage of 0 V can be selected for the detection of 4-AOBQ.

Effect of pH

The influence pH on the current response was studied in the pH range from 6 to 8. This interval was assumed to afford the highest catalytic activity of the enzyme used. The results showed that the highest sensitivity was obtained at pH 7.0, which is in agreement with the data reported previously [37–39].

Effect of flow rate

Flow rate represents one of the most important parameters in the FIA system because it defines the duration over which APAP is in the column where enzymatic reactions occur. At the set potential of -0.1 V, flow rate was investigated from 0.2 to 2.0 mL min⁻¹; for demonstration, the resultant flow-injection amperograms obtained for 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ APAP at 0.2 (red), 0.6 (blue), 1.0 (green), and 1.8 mL min⁻¹ (orange line) are shown in ESM Fig. S3. It was found that peak height significantly increased up to 0.6 mL min⁻¹. Above this flow rate, a slight decrease in peak current was observed. Therefore, a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ was chosen as optimum.

Effect of applied detection potential

Since the detection potential must be kept constant during the analysis, it plays the most important role in the application of amperometric biosensors [40]. This crucial parameter affects the sensitivity and the selectivity of the developed method [41]. The effect of applying different potentials from 0 to -0.3 V on peak current height was studied. Figure 2 shows that values lower than -0.15 V did not cause any statistically significant increase in peak current. Moreover, it was found that background current increased at potentials lower than -0.2 V. Hence, it can be assumed that the value of -0.15 V is the optimum detection potential. This value may be used in APAP determination in pharmaceuticals because they only contain non-interfering accompanying substances such as pre-swollen corn starch, Povidone K-30 (polyvinylpyrrolidone, PVP), croscarmellose sodium, and stearic acid. However, this statement does not apply if human urine is analyzed, because the urine is considered to be a very complex matrix.

A sample of human urine spiked with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ APAP was used to find the optimum detection potential (dashed line). This concentration has not been selected randomly because the APAP is marketed as Paralen in 500 mg pills. Assuming that 2% APAP is excreted unchanged, a minimum detected

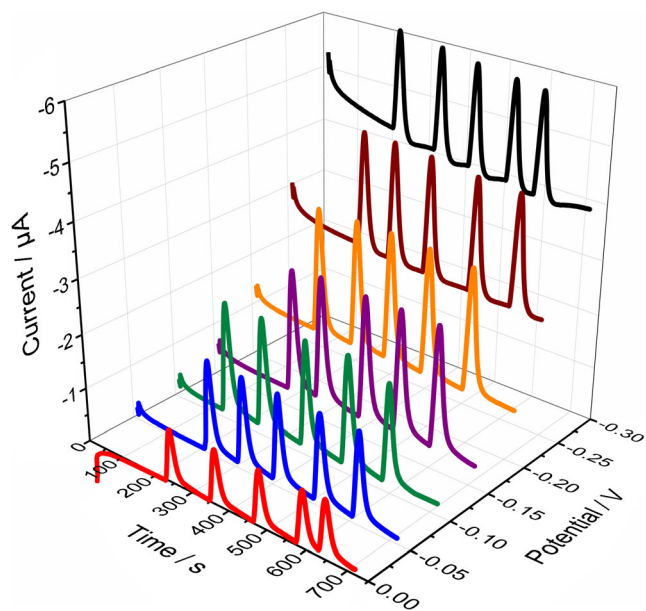


Fig. 2 Effect of detection potential of tyrosinase biosensor current response. Hydrodynamic amperograms obtained for five additions of 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ APAP. Supporting electrolyte, non-deaerated 0.1 mol L⁻¹ PB of pH 7.0; injection volume, 100 μL ; flow rate, 0.6 mL min⁻¹ and room temperature

concentration of ~ 50 μmol per liter of urine might be expected [3]. The urine itself provided a false positive current response corresponding to the electrochemical reduction of naturally occurring electroactive metabolites (solid line). The intensity of this parasitic signal increased with decrease in detection potentials to more negative values as is shown in Fig. 3. Only at potential of 0 V was the current response of pure urine not higher than the standard deviation of five repeated injections of spiked urine (see ESM Fig. S4). Therefore, a detection potential of 0 V was chosen as the optimum.

Performance of proposed system

The performance of the proposed system for FIA was studied at the optimum working conditions. Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated according to the equations $\text{LOD} = 3s/k$ and $\text{LOQ} = 10s/k$, respectively, where s is the standard deviation of five repetitions ($n = 5$) of chosen concentrations (5 μM) of APAP and k represents the slope of the calibration curve (linear range). Typical recorded peaks obtained during FIA of APAP at -0.15 V are shown in ESM Fig. S5. Linear ranges vary depending on the selected detection potential, namely 4.0–130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with $\text{LOD} = 1.1$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ at 0 V, 3.0–90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with $\text{LOD} = 0.8$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.1 V, and 1.5–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with $\text{LOD} = 0.5$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ at -0.15 V. The first mentioned linear range described by the equation $I_p = -0.0083c + 0.0101$ with a correlation coefficient $r = 0.9987$ was used for APAP determination in a model sample, two types of pills and spiked human urine (Fig. 4).

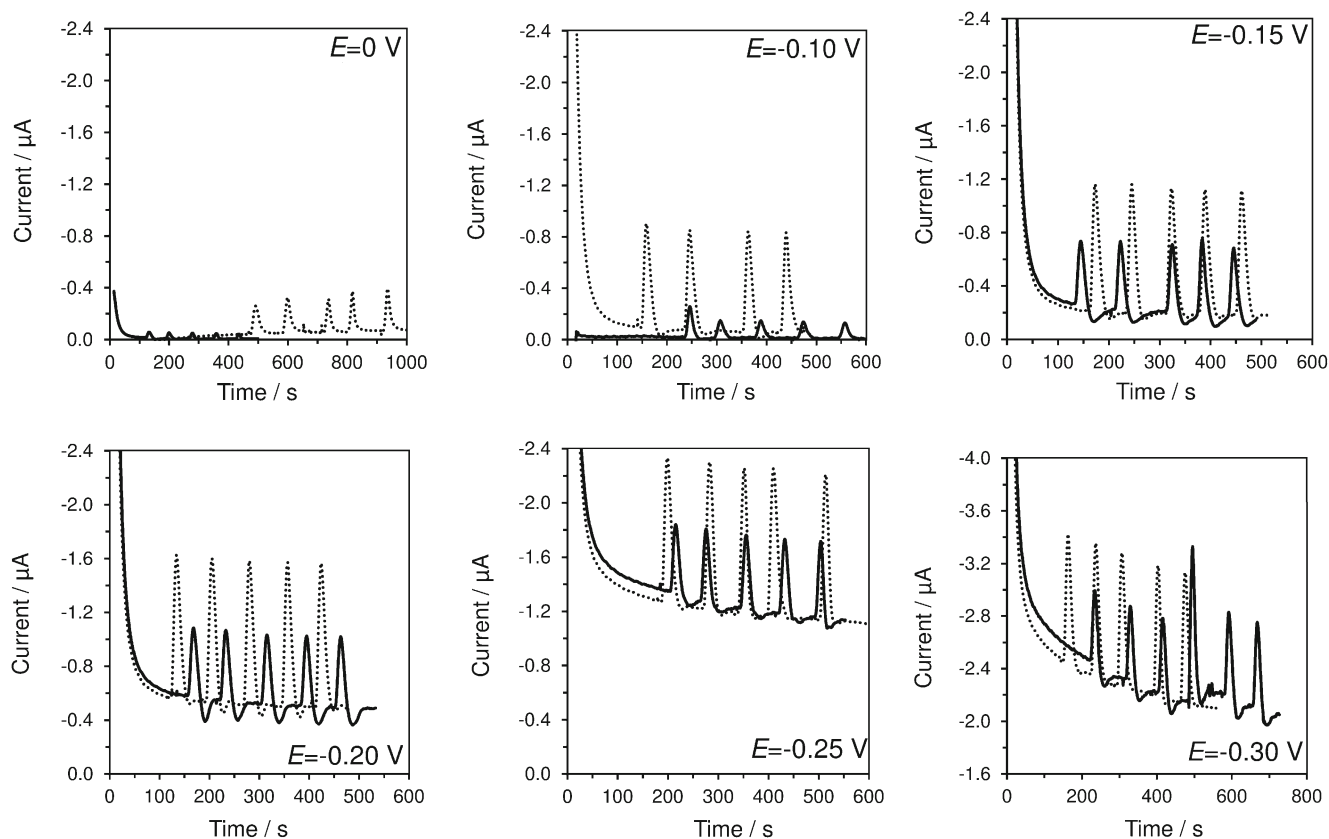


Fig. 3 Typical FIA amperograms obtained after five injections of fivefold diluted human urine (solid) and that containing $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP (dashed line) at different detection potentials. Supporting electrolyte,

non-deaerated 0.1 mol L^{-1} PB of pH 7.0; injection volume, $100 \mu\text{L}$; flow rate, 0.6 mL min^{-1} and room temperature

In comparison with previously developed enzymatic sensors (see Table 1), it should be emphasized that substantial progress in the sensitivity has been obtained at detection

potential -0.15 V . Existing biosensors based on different enzymes do not provide such selectivity to be used in human urine analysis. The previously reported enzymatic biosensors have been used in the determination of APAP in pharmaceutical formulations only [11–16].

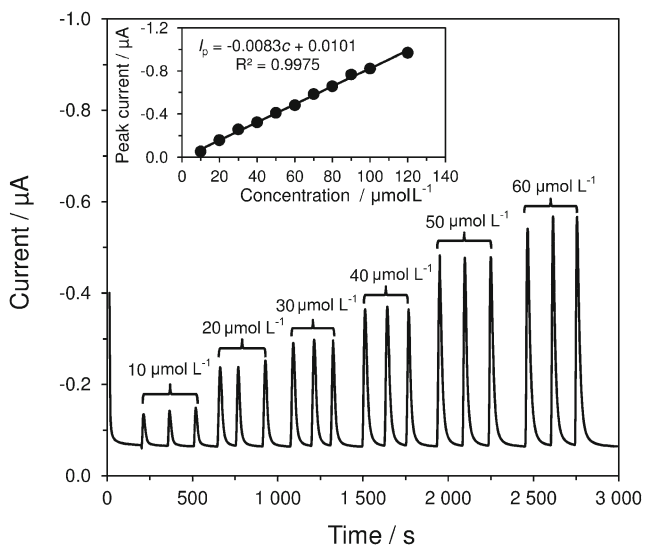


Fig. 4 Typical amperograms of calibration measurement obtained at detection potential 0 V . Supporting electrolyte, non deaerated 0.1 mol L^{-1} PB of pH 7.0; injection volume, $100 \mu\text{L}$; flow rate, 0.6 mL min^{-1} and room temperature

Freshly prepared biosensor provided unstable behavior due to elution of incompletely entrenched enzyme from the Nafion[®] membrane. A constant peak current with relative standard deviation (RSD) less than 2% was obtained after a half hour of washing with phosphate buffer (ESM Fig. S6). After this time, no significant decrease in the current response due to enzyme elution was observed, as shown in Fig. 5. Satisfactory repeatability, defined as a statistical measure of the consistency of repeated measurements, was achieved, namely about 1.9% RSD.

Another important criterion is response time which is usually shorter for amperometry in a batch configuration than in the case of FIA. It depends on the distance of the dosing six-way valve from the flow cell where the biosensor is located. From this distance and flow rate, it is possible to calculate the response time after contact of the analyte with the biosensor which was shorter than 5 s.

The relatively short lifetime is a typical drawback of tyrosinase biosensors [21, 29]. Hence, a basic study of lifetime was

Table 1 An overview of recently reported amperometric biosensors for acetaminophen determination

| Material/enzyme | LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Linear range ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | <i>r</i> | Reference |
|--|--------------------------------|---|----------|-----------|
| SPCE/aryl-acylamidase | — | 0–2800 | 0.9990 | [11] |
| CA-SPCE/aryl-acylamidase | — | 0–2000 | 0.9990 | [12] |
| CPE/avocado tissue | 88 | 120–5800 | 0.9927 | [13] |
| CPE/eggplant tissue | 5.0 | 20–200 | 0.9985 | [14] |
| GCE/HRP/PAM microgels | 3.1 | 10–500 | 0.9997 | [15] |
| GCE/HRP/Romanian clay-PEI | 0.6 | 5.3–50 | 0.9980 | [16] |
| GCE/PEI/SWCNT-HRP | 1.36 | 10–79 | 0.9633 | [17] |
| SPE-CoPC/tyrosinase | 0.5 | 1.6–40 | — | [21] |
| ^a SPCE/NFG/tyrosinase-GTA/Nafion® | 0.5 | 1.4–70 | 0.9989 | This work |
| ^b SPCE/NFG/tyrosinase-GTA/Nafion® | 1.1 | 3.8–130 | 0.9987 | This work |

CA cellulose acetate membrane, CO cobalt phthalocyanine, HRP horseradish peroxidase, GTA glutaraldehyde, NFG non-functionalized graphene, PEI polyethyleneimine, PAM polyacrylamide

Data obtained at $-0.15\text{ V}^{\text{a}}$ and 0 V^{b}

carried out to find out whether the developed biosensor could be utilized in routine pharmaceutical and clinical analysis. Generally, it can be stated that a freshly prepared biosensor may be used for analysis during a whole day. The main problem remains the storage of the biosensor. It leads to a significant decrease in sensitivity.

The stability of the system was evaluated by daily injection of $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP ($n = 5$). During the first 6 days, the amperometric signal of the enzymatic product dramatically decreased. After that, it decreased slightly and finally on the 12th day it became stable (ESM Fig. S7). It has to be clear that the sensitivity substantially decreases with the aging of the biosensor. From a practical point of view, there is not any problem to use an already prepared transducer, and before each analysis, freshly immobilize the tyrosinase enzyme. Moreover, the existence of commercially available SPCEs modified with NFG should be mentioned. They could

probably be used to guarantee the desired reproducibility between different biosensors. However, the reproducibility between different home-made biosensors is lower and depends on individual steps in the production process. A value less than 10% RSD was calculated for five simultaneously prepared tyrosinase biosensors. Therefore, it is recommended to always perform a calibration before the analysis.

Interferences

In the patient information leaflets, it was found that the analyzed pharmaceutical formulations usually contain corn starch, PVP, croscarmellose sodium, and stearic acid. These compounds cannot be classified as potential interferences because they are not subjected to any electrochemical reactions

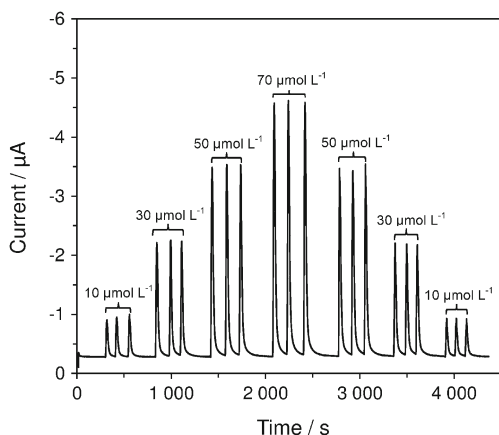


Fig. 5 FIA record obtained after injections of supporting electrolyte solutions containing different APAP concentrations at detection potential -0.15 V . Supporting electrolyte, non-deaerated 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer of pH 7.0; injection volume, $100\ \mu\text{L}$; flow rate, 0.6 mL min^{-1} and room temperature

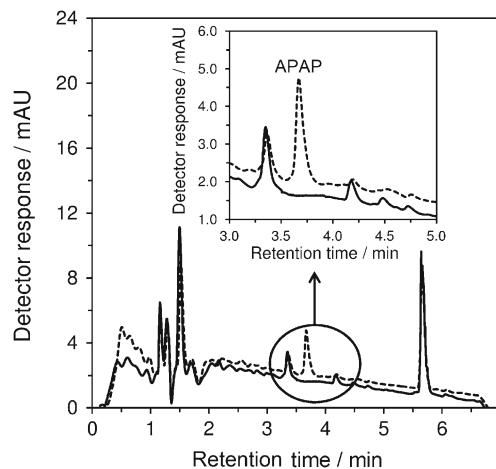


Fig. 6 HPLC analyses of sample of pure human urine (solid) and that containing $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP (dashed line). Ascenis Express C18 column ($150 \times 3\text{ mm}$, $2.7\ \mu\text{m}$); mobile phase, 0.3% formic acid in water (A) and methanol (B); gradient program from 20% to 40% B for 10 min; flow rate, 0.5 mL min^{-1} ; sample volume, $5\ \mu\text{L}$; temperature, $30\ ^\circ\text{C}$; detection at 243 nm

Table 2 Comparison of FIA with HPLC in analysis of pharmaceuticals and spiked human urine

| Sample | FIA | HPLC | Declared |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Model | 242 ± 19 μmol L ⁻¹ | 244 ± 15 μmol L ⁻¹ | 250 μmol L ⁻¹ |
| Paralen® 500 | 490 ± 28 mg per pill | 491 ± 9 mg per pill | 500 mg per pill |
| Tylox® 750 | 725 ± 52 mg per pill | 745 ± 16 mg per pill | 750 mg per pill |
| Human urine (spiked) | 52 ± 4 μmol L ⁻¹ | 51 ± 3 μmol L ⁻¹ | 50 μmol L ⁻¹ |

Values given as confidence intervals $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}$, where \bar{x} is the arithmetic mean, s the standard deviation, and $t_{1-\alpha}$ the critical value (2.015) of Student's t distribution for 5 repetitions of each analysis at $\alpha = 0.05$

at the applied working potentials. Thus, numerous direct voltammetric methods for APAP determination in the pharmaceutical formulations have been developed [42–44].

In the case of urine analysis, measurements shown in Fig. 3 and ESM Fig. S4 should be considered as sufficient interference studies because the matrix of urine did not have any statistically significant interference effect at 0 V. Current responses of pure urine were lower than standard deviation ($n = 5$) of 50 μmol L⁻¹ APAP (2% unmetabolized form of 500 mg dose in 2 L of urine) [3].

Analysis of pharmaceutical preparations and human urine

Before the analysis of real samples, it was necessary to determine the accuracy of the proposed system. The accuracy represents the accordance between the real concentration of analyte and that found by an analytical method used. This analytical parameter is often verified using analysis of a model sample (recovery), declared amount, or by comparison with a reference method based on another physicochemical principle. Both mentioned approaches were used in the accuracy validation. A recovery of 3.8% RSD was calculated from five repetitions for FIA of a model sample containing 250 μmol L⁻¹ APAP. Before the analysis, the model sample had to be tenfold diluted using PB.

Although this work is dedicated to the analysis of human urine, it was expedient to first test the biosensor in the analysis of pharmaceutical preparations, especially pills. A previously described protocol for urine analysis using HPLC was slightly modified by changing the gradient elution parameters to prevent elution of accompanying substances existing in the sample matrix at the same retention time as analyte (Fig. 6).

The calibration solutions (3.0–50 mg L⁻¹) were prepared by diluting of APAP in methanol. The calibration curve of the analytical method was characterized by the following equation: $A [\text{mA}U] = 17,610.82 + 35,118.84c [\text{mg L}^{-1}]$ with a correlation coefficient $r = 0.9993$. As shown in Table 2, the proposed tyrosinase biosensor provides results comparable to the chosen reference HPLC method characterized by recovery of 97.4% ($n = 5$).

Conclusion

A sensitive and selective amperometric tyrosinase biosensor for acetaminophen determination in the pharmaceutical formulas and human urine was successfully developed. It is based on the commercial screen-printed carbon electrode covered by a thin layer of graphene and Nafion® film embedded with tyrosinase enzyme cross-linked by glutaraldehyde. This type of immobilization permits the construction of a relatively simple biosensor (without elution of biorecognition element after certain time) which exhibits excellent selectivity owing to amperometric detection at a potential of 0 V. Nevertheless, it should be reminded that the sensitivity significantly decreased with the aging of the biosensor. It can be assumed that the storage conditions will have a significant effect on the biosensor lifetime. Optimization of storage conditions will be an important stage in tyrosinase-based biosensor development. From a practical point of view, simple immobilization of tyrosinase onto the surface of the designed transducer or on commercially available single-layer graphene-modified SPCE (type DRP-110GPH) allows one to always use the freshly prepared biosensor because the whole process does not take more than half an hour.

Acknowledgements Financial support from Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2019-003) and CEEPUS CIII-CZ-0212-10-1617 network for mobility funding are gratefully acknowledged.

Compliance with ethical standards

Informed consent The study was not aiming to investigate functions/diseases of the human body or a process of medical treatment; therefore, the administration of acetaminophen by the participant was not performed and the drug was used only for artificial spiking of commercial and the participant's own urine sample. A healthy volunteer received a complete description of the study and gave written informed consent before providing the urine samples. The obtained sample of human urine was anonymized before the study. The ethical principles for medical research of the components of human beings have not been violated because no compounds other than acetaminophen (artificially enriched urine) were determined. Therefore, all experiments with human urine samples were done in accordance with the WMA Declaration of Helsinki, June 1964.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ivey KJ, Settree P. Effect of paracetamol (acetaminophen) on gastric ionic fluxes and potential difference in man. *Gut*. 1976;17(11):916–9.
- Clissold SP. Paracetamol and phenacetin. *Drugs*. 1986;32(4):46–59.
- Hodis J. New facts about paracetamol, risks of overdose, intoxication and their management. *Practical Pharm*. 2015;11(3):90–2.
- Lancaster EM, Hiatt JR, Zarrinpar A. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Arch Toxicol*. 2015;89:193–9.
- Myers RP, Li B, Fong A, Shaheen AA, Quan H. Hospitalizations for acetaminophen overdose: a Canadian population-based study from 1995 to 2004. *BMC Public Health*. 2007;7:143.
- Björnsson ES. Drug-induced liver injury: an overview over the most critical compounds. *Arch Toxicol*. 2015;89:327–34.
- Luque de Castro MD, Valcárcel M. Flow injection analysis of pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 1989;7(12):1291–300.
- Mičová K, Friedecký D, Faber E, Polýnková A, Adam T. Flow injection analysis vs ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23–24):1957–62.
- Luque de Castro MD, Cases MV. Simultaneous determinations in flow injection analysis. A review. *Analyst*. 1984;109(4):413–9.
- Li Y, Chen SM. The electrochemical properties of acetaminophen on bare glassy carbon electrode. *Int J Electrochem Sci*. 2012;7:2175–87.
- Vaughan PA, Scott LDL, McAller JF. *Anal Chim Acta*. 1991;248(2):361–5.
- Gilmartin MAT, Hart JP. Rapid detection of paracetamol using a disposable, surface-modified screen-printed carbon electrode. *Analyst*. 1994;119(11):2431–7.
- Fatibello-Filho O, Lupetti KO, Vieira IC. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. *Talanta*. 2001;55(4):685–92.
- Garcia LF, Benjamin SR, Antunes RS, Lopes FM, Somerset VS, Gil ES. *Solanum melongena* polyphenol oxidase biosensor for the electrochemical analysis of paracetamol. *Prep Biochem Biotechnol*. 2016;46(8):850–5.
- González-Sánchez MI, Rubio-Retama J, López-Cabarcos E, Valero E. Development of an acetaminophen amperometric biosensor based on peroxidase entrapped in polyacrylamide microgels. *Biosens Bioelectron*. 2011;26(5):1883–9.
- Maghear A, Cristea C, Marian A, Marian IO, Sandulescu R. A novel biosensor for acetaminophen detection with Romanian clays and conductive polymeric films. *Farmacia*. 2013;61:1.
- Tertis M, Florea A, Sandulescu R, Cristea C. Carbon based electrodes modified with horseradish peroxidase immobilized in conducting polymers for acetaminophen analysis. *Sensors*. 2013;13:4841–54.
- Valero E, Varón R, García-Carmona F. Catalytic oxidation of acetaminophen by tyrosinase in the presence of L-proline: a kinetic study. *Arch Biochem Biophys*. 2003;416(2):218–26.
- Rolff M, Schottenheim J, Decker H, Tuzcek F. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem Soc Rev*. 2011;40(7):4077–98.
- Valero E, Varón R, García-Carmona F. Tyrosinase-mediated oxidation of acetaminophen to 4-acetamido-o-benzoquinone. *Biol Chem*. 2002;383(12):1931–9.
- Calas-Blanchard C, Istamboulié G, Bontoux M, Plantard G, Goetz V, Noguer T. Biosensor-based real-time monitoring of paracetamol photocatalytic degradation. *Chemosphere*. 2015;131:124–9.
- Mukaddam M, Litwiller E, Pinnau I. Gas sorption, diffusion, and permeation in Nafion. *Macromolecules*. 2016;49(1):280–6.
- Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, Latte G, Madeddu G, Galleri G, et al. Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*. 2016;16(6):780.
- Albareda-Sirvent M, Merkoçi A, Alegret S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors Actuators B Chem*. 2000;69(1–2):153–63.
- Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis*. 2010;22(10):1027–36.
- Lin Y, Yantasee W, Wang J. Carbon nanotubes (CNTs) for the development of electrochemical biosensors. *Front Biosci*. 2005;10:492–505.
- Baranowska I, Wilczek A. Simultaneous RP-HPLC determination of sotalol, metoprolol, alpha-hydroxymetoprolol, paracetamol and its glucuronide and sulfate metabolites in human urine. *Anal Sci*. 2009;25(6):769–72.
- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;26(5–6):939–47.
- Vandeput M, Patris S, Silva H, Parsajoo C, Dejaeghere B, Martinez JA, et al. Application of a tyrosinase microreactor – detector in a flow injection configuration for the determination of affinity and dynamics of inhibitor binding. *Sensors Actuators B Chem*. 2017;248:385–94.
- He Y, Cussler EL. Ammonia permeabilities of perfluorosulfonic membranes in various ionic forms. *J Membr Sci*. 1992;68:43–52.
- Birch ME, Ruda-Eberenz TA, Chai M, Andrews R, Hatfield RL. Properties that influence the specific surface areas of carbon nanotubes and nanofibers. *Ann Occup Hyg*. 2013;57(9):1148–66.
- Brownson DA, Foster CW, Banks CE. The electrochemical performance of graphene modified electrodes: an analytical perspective. *Analyst*. 2012;137(8):1815–23.
- Sýs M, Žabčíková S, Červenka L, Vyřas K. Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol. *Potr S J F Sci*. 2017;11(1):96–105.
- Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv Mater*. 2010;22:3906–24.
- Sheldon RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92:467–77.
- Gil ES, Cout RO. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Rev Bras*. 2013;23:542–58.
- Duckworth HW, Coleman JE. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem*. 1970;245:1613–25.
- Solná R, Skládal P. Amperometric flow injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized laccase, peroxidase and tyrosinase. *Electroanalysis*. 2005;23:2137–46.
- Sýs M, Pecek B, Kalcher K, Vyřas K. Amperometric enzyme carbon paste-based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *Int J Electrochem Sci*. 2013;8:9030–40.
- Gorton L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*. 1995;7(1):23–45.
- Calvo EJ, Danilowicz C. Amperometric enzyme electrodes. *J Braz Chem Soc*. 1997;8(1):563–74.
- Santos AM, Vicentini FC, Deroco PB, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O. Square-wave voltammetric determination of paracetamol and codeine in pharmaceutical and human body fluid samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *J Braz Chem Soc*. 2015;26(10):2159–68.

43. Lourenção BC, Medeiros RA, Rocha-Filho RC, Mazo LH, Fatibello-Filho O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*. 2009;78(3):748–52.
44. Babaei A, Khalilzadeh B, Afrasiabi M. A new sensor for the simultaneous determination of paracetamol and mefenamic acid in a pharmaceutical preparation and biological samples using copper(II) doped zeolite modified carbon paste electrode. *J Appl Electrochem*. 2010;40(8):1537–43.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article

Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries, Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes

Arbër Frangu¹, Amir M. Ashrafi^{2,3,4}, Milan Sýs^{5,*} , Tahir Arbnesi¹, Radovan Metelka⁵ ,
Vojtěch Adam^{2,3}, Milan Vlček⁶ and Lukáš Richtera^{2,3} 

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10000 Prishtina, Kosovo; arber.frangu@uni-pr.edu (A.F.); tahir.arbnesi@uni-pr.edu (T.A.)
 - ² Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic; amirmansoor.ashrafi@mendelu.cz (A.M.A.); vojtech.adam@mendelu.cz (V.A.); lukas.richtera@mendelu.cz (L.R.)
 - ³ Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkynova 123, CZ-612 00 Brno, Czech Republic
 - ⁴ CEITEC—Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic
 - ⁵ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 53210 Pardubice, Czech Republic; radovan.metelka@upce.cz
 - ⁶ Joint Laboratory of Solid State Chemistry of Institute of Macromolecular Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic and the University of Pardubice, 532 10 Pardubice, Czech Republic; milan.vlcek@upce.cz
- * Correspondence: milan.sys@upce.cz; Tel.: +42-05-4513-3311

Received: 12 February 2020; Accepted: 1 April 2020; Published: 5 April 2020



Abstract: In this contribution, Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was determined in various berries using carbon paste tyrosinase biosensor with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), coated with Nafion[®] layer. Electrochemical behaviour of the biosensor and influence of MWCNTs on carbon paste surface were studied with respect to the sensitive amperometric detection of total content of phenolic compounds in berries, expressed as concentration equivalent of Trolox. After optimization of key instrumental and electroanalytical parameters, the biosensor was used for determination of TEAC in blackberries, blueberries, cranberries, raspberries and strawberries by method of multiple standard additions. Electrochemical TEAC assays corresponded well with results obtained by spectrophotometric 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical method, known as DPPH assay. Obtained values were compared with those listed in the National Nutrient Database for additional antioxidant capacity assays as well.

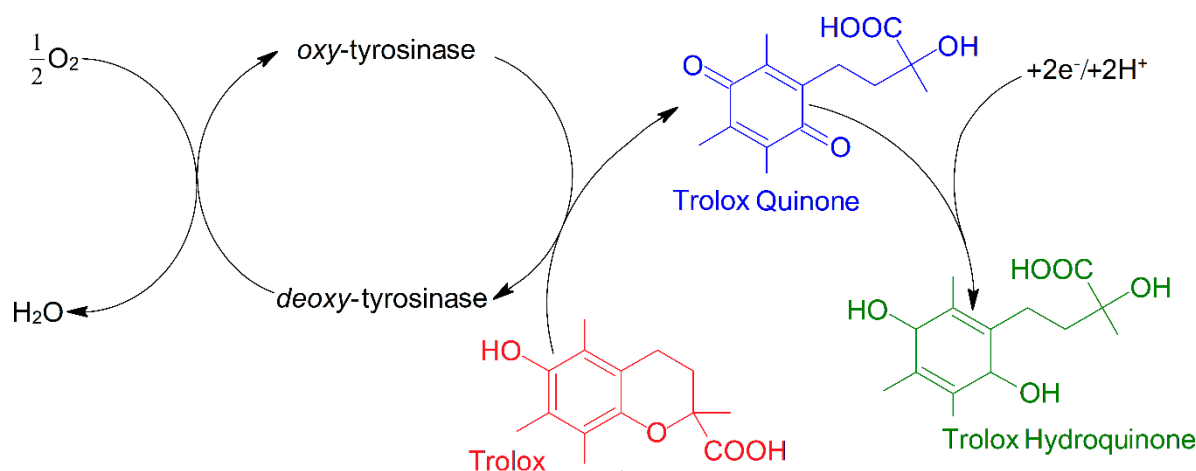
Keywords: amperometry; ascorbic acid; berries; biosensor; multi-wall carbon nanotubes; carbon paste electrode; tyrosinase; Trolox; antioxidant capacity

1. Introduction

The antioxidant properties of the phenolic compounds in berries (such as cranberry or blueberry) play a major role in their ability to decrease damages related to cardiovascular diseases and aging, as well as some of their reported antitumor activities [1–3]. Trolox is a synthetic water-soluble analogue of α -tocopherol, known as the most active form of vitamin E, which is used as standard chemical substance for comparison of antiradical activity of food expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [4]. The solubility of Trolox at neutral values of the pH is around $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, which is high enough for common antioxidant assays. For the determination of TEAC,

several spectrophotometric methods based on reductive properties of present antioxidants were developed. One of the most frequently performed method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay, is based on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [5]. Some methods, including an oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [6], ferric reducing antioxidant power (FRAP) [7], and total radical trapping antioxidant potential (TRAP) [8], were also employed in the analysis of berries. L-ascorbic acid (AA), known as vitamin C, is a non-phenolic chemical compound, contained also in berries with high antioxidant activity [9]. It occurs commonly together with polyphenols in foodstuffs. AA has an interfering effect during electrochemical analysis of polyphenols due to its reduction properties (reduction of resulting quinones back to polyphenols). The interfering effect of AA on the determination of hydroquinone (HQ), which has a similar chemical structure to α -tocohydroquinone [10], is known from previous studies [11]. The mechanism of HQ reduction by AA, which was proposed by Isaacs and Eldik, is shown in Scheme S1 [11]. However, it was found earlier that the presence of AA is not interfering up to the molar ratio of AA to HQ 1:1, in the case of the amperometric biosensor based on a carbon paste electrode modified with tyrosinase (TYR) [12].

Mushroom TYR enzyme from *Agaricus bisporus* (E.C. 1.14.18.1) is an oxidase enzyme which contains copper. It possesses a catalytic activity toward the oxidation of both catechols and cresols [13]. In the presence of TYR enzyme, the conversion of phenolic compounds to their quinone derivatives is catalyzed. Resultant products can then be detected by amperometric methods at constant reductive potential in phosphate buffer media of pH~7, where the enzyme exhibits optimum activity [14,15]. TYR is capable of catalyzing an oxidation reaction of Trolox by oxygen, resulting in the formation of Trolox quinone [12], which can be electrochemically reduced by $2 e^-/2 H^+$ to Trolox hydroquinone [16]. These reactions simply describe the principle of amperometric tyrosinase biosensor behavior (Scheme 1).



Scheme 1. Principle of amperometric tyrosinase biosensor for evaluation of TEAC.

As reported, the biosensor, prepared by covering the bare carbon paste electrode (CPE) with a thin layer of Nafion[®] and the TYR enzyme (CPE/Tyrosinase/Nafion[®]), provides a low sensitivity against Trolox in comparison to *o*-substituted polyphenols [12]. Hence, carbon nanotubes (CNTs) were used to improve this parameter, due to their high catalytic effect and large surface area. When considering the type of CNTs, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) exhibited similar behavior to single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), as shown in previously reported electrochemical study with Trolox [17]. Later, the CPE/MWCNTs/Tyrosinase/Nafion[®] biosensor was tested in analysis of polyphenols in various Moravian wines [18]. In this contribution, the previously introduced biosensor is employed in the determination of TEAC, in comparable matrices such as berries.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Chemicals

Spectroscopic graphite (with an average particle size of 2 μm) from Graphite Týn s. r. o., Týn nad Vltavou, Czech Republic and paraffin oil for spectrometry from Merck, Darmstadt, Germany were used for the preparation of CPE. Multi-walled carbon nanotubes (diameter 10–30 nm, length 5–15 μm and special surface area 40–300 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) from Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd., Shenzhen, China were used for CPE surface coverage. *N,N*-dimethylformamide (DMF), mushroom (ex. *Agaricus bisporus*) tyrosinase (E.C. 1.14.18.1; 3130 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ solid), Nafion[®] (5% in ethanolic solution), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical were obtained from Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic. The other chemicals used in this work were of analytical grade purity. The solutions were also prepared using the ultrapure water ($\rho = 18.3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$; Milli-Q system, Millipore, Burlington, MA, USA).

2.2. Preparation of Electric Transducer

To obtain a homogenous paste, an amount of 0.500 g of carbon powder and 0.125 g of paraffin oil were finely blended in a ceramic mortar for 30 min. Then, the freshly prepared homogeneous carbon paste was firmly packed into the cavity of piston-driven Teflon[®] holder (3 mm in diameter) [19]. Measured ohmic resistance of prepared carbon paste electrodes was 20 Ω maximum, which corresponds with already published values [20]. Laboratory conditions were used to store the bare CPEs. A suspension of MWCNTs ($\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in DMF was homogenized in an ultrasonic bath for 30 min. Afterwards, 20 μL of resultant dispersion was applied on the surface of bare CPE and left to dry for one day under laboratory conditions.

2.3. Preparation of Tyrosinase Biosensor

For the immobilization of the TYR enzyme on surface of amperometric transducer, a sulfonated tetrafluoroethylene-based fluoropolymer-copolymer (Nafion[®]) was used. The solution for casting the enzyme-entrapping membrane was prepared by mixing of 40 μL Nafion[®] (neutralized by 8% ammonia), 60 μL of redistilled water and 150 μL enzyme solution (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dissolved in 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate buffer of pH 7.0). In the next step, 10 μL of the mixture was drop-casted onto the surface of CPE/CNTs and left for drying under laboratory conditions for one hour. If not in use, the prepared biosensors were stored in solution of phosphate buffer (PB) in a fridge at 5 $^{\circ}\text{C}$, as reported previously [21].

2.4. Apparatus and Methods

All amperometric measurements were performed in a three-electrodes system, consisting of CPE/MWCNTs/Tyrosinase/Nafion[®] as a working electrode, Ag/AgCl/3.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl (Metrohm, Czech Republic) as a reference electrode and platinum wire as a counter electrode connected to potentiostat EmStat (Ivium Technologies B.V., Eindhoven, The Netherlands). Then, 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB (pH 7.0) was chosen as supporting electrolyte and every measurement was repeated minimally five times. Batch injection analysis (BIA) with amperometric detection was carried out in a voltammetric glass cell under constant stirring speed 400 rpm and at constant working potential of -0.25 V . For analysis, usually 1.0 mL of berries extract was injected into the 9.0 mL of the above-mentioned electrolyte. After that, three additions of standard Trolox solution (0.5 mL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were successively added.

Drier (Memmert, Schwabach, Germany) and Helios Delta UV-VIS spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) have been used for other experiments. Images of electrode surface structure were obtained by scanning electron microscope (SEM) JEOL JSM7500F (Tokyo, Japan). The DPPH assay was selected as a reference method. The procedure consisted of several steps: (i) 100 μL of ethanolic extract of individual berries was added into 5.0 mL of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DPPH methanolic solution and kept for reaction in darkness for 10 min; (ii) the colour of DPPH radical

solution changed from violet to yellow, causing a decrease in absorbance, which was measured at $\lambda = 517$ nm.

2.5. Preparation of Berries for Analysis

Five different kinds of berries, such as blackberries *Rubus fruticosus* (Spain), blueberries *Vaccinium corymbosum* (Chile), cranberries *Vaccinium erythrocarpum* (USA), raspberries *Rubus idaeus* (Morocco) and strawberries *Flagaria magna* (Spain) purchased from local stores were selected for analysis of TEAC. Approx. 40 g of berries were firstly dried to constant weight and then pulverized in a mortar for 20 min. Optimum temperature for drying these kinds of fruits ranges from 40 to 60 °C for 3 to 5 days [22]. Each berry powder (2.0 g) was transferred into the 50.0 mL volumetric flask and filled with 50% water ethanolic solution up to mark and kept in ultrasonic bath at laboratory temperature for 60 min. Afterwards, the sample suspension was filtered using regular filter paper. Filtration of strawberry suspension had to be performed using vacuum pump due to the high content of insoluble fiber, which caused clogging of filter paper pores.

3. Results and Discussion

Prior to the analysis of berries using previously introduced tyrosinase amperometric biosensor [17, 18], it was necessary to optimize several conditions such as influence of stirring speed, working potential and pH value of supporting electrolyte, as described in the following chapters. Moreover, some additional characterisation information related to transducer structure were added. From previous study [18] resulted that the transducer consisting of CPE/MWCNTs exhibits higher sensitivity rather than bare CPE due to higher electrode surface area, fast electron transfer and also due to high enzyme affinity towards hydrophobic CNTs, leading to enhanced enzyme loading at the electrode surface. Furthermore, enzyme/Nafion[®] mixture shows higher mechanical stability on CNTs layer of transducer due to the fibrous structure of polymers fitting into bundles of CNTs. The characterisation of transducer structures was performed using SEM (Figure 1) and differences between both types of CPEs can be clearly observed.

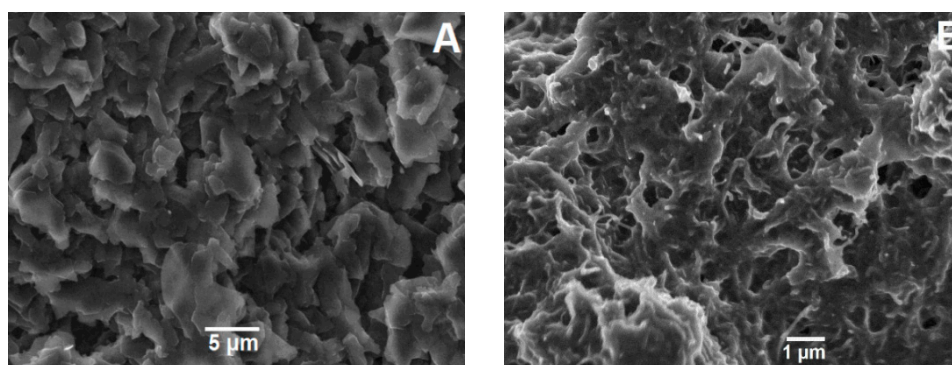


Figure 1. SEM images of bare CPE (A) and CPE/MWCNTs (B) surfaces.

3.1. Construction of Tyrosinase Biosensor

Expected catalytic activity of TYR enzyme towards Trolox in comparison with 1,2-dihydroxybenzenes was not sufficient to construct a simple bioelectroanalytical device [12]. This means that the amount of Trolox oxidation product formed during enzymatic conversion is low and, therefore, a more sensitive amperometric transducer is required for the detection in the given time frame. Generally, current response increases with larger electrode surface area. For that reason, MWCNTs were used to enlarge the surface of amperometric transducer. Furthermore, MWCNTs provide fast electron transfer, which positively affects the sensitivity of the detection.

Six different amounts (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mg·mL⁻¹) of MWCNTs in DMF were prepared and a volume of 20 µL was applied for immobilization of MWCNTs on CPE surface. Obtained CPE/MWCNTs electrodes were compared using cyclic voltammetry of 500 µmol L⁻¹ Trolox. As shown in Figure S1 (Supplementary Materials), a significant shift of the cathodic peak potential (E_p^c) to lower values ("easier reduction") was observed for the amount of 2.0 mg·mL⁻¹ MWCNTs, therefore, this amount was considered as optimum.

After that, a volume of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 µL, with a constant concentration of 2.0 mg·mL⁻¹ MWCNTs of fresh homogenized dispersion was applied on polished surfaces of CPE to immobilize MWCNTs. For volumes from 15 to 25 µL, a significant increase of current response for cathodic peak (I_p^c) was observed. From Figure S2, it is evident that the measured peak currents decreased for volumes higher than 20 µL, probably due to the aggregation of MWCNTs and unfavorable morphology at electrode surface. As the optimum volume for immobilization, the value of 20 µL MWCNTs (2.0 mg·mL⁻¹) dispersion was selected.

An amount of TYR enzyme in the biorecognition layer was optimised to achieve the highest current response. With increasing content of the TYR in the Nafion[®] membrane, the height of the anodic peak of Trolox decreased, while the corresponding cathodic peak increased. Higher amounts than 3.0 µg enzyme did not cause any significant improvement, and therefore it was further used to obtain sufficiently high current responses.

3.2. Characterisation of Tyrosinase Biosensor

Electrochemical behaviour of Trolox was investigated at bare CPE, CPE/MWCNTs, and CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] (TYR biosensor), to find out an effect of each component. Trolox provided a distinct oxidation signal with cathodic counterpart ($\Delta E_p = 65$ mV) in 0.1 mol·L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0 at bare CPE, attributed to one-electron oxidation to radical cation with subsequent proton transfer to form phenoxy radical and then immediate oxidation by one electron to phenoxonium cation (ECE mechanism), similarly to α -tocopherol [16]. After repetitive cycles, another redox couple was observed ($\Delta E = 280$ mV). It is assumed that after the formation of phenoxonium cation, a nucleophilic addition of water starts in aqueous solution with concomitant formation of Trolox quinone via hemiketal intermediate. Trolox quinone is then reduced to corresponding hydroquinone, which can be oxidized to quinone in subsequent scan to positive potentials [10,16]. Increasing current responses of the second redox couple with each cycle is caused by gradual buildup of Trolox quinone by oxidation of the original compound (Figure 2A).

The ratio of the peak currents (I_p^a/I_p^c) was equal to 1.544 at bare CPE, unlike ratio values of 0.615 and 0.320 obtained for CPE/MWCNTs and CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®], respectively. Several times, a higher reduction peak of Trolox was observed at the TYR biosensor at peak potential (E_p^c) of +0.049 V (compare with values of +0.079 and +0.099 V for CPE/MWCNTs and bare CPE, respectively), whereas its oxidation signal markedly decreased owing to catalytical activity of the TYR (Figure 2B) towards Trolox. According to these findings, working potential with values lower than +0.050 V should be investigated for amperometric detection in batch configuration. Based on these experimental data, a principle of amperometric tyrosinase biosensor for evaluation of TEAC (Scheme 1) was established, which will enable electrochemical detection of Trolox at low potentials with markedly improved sensitivity.

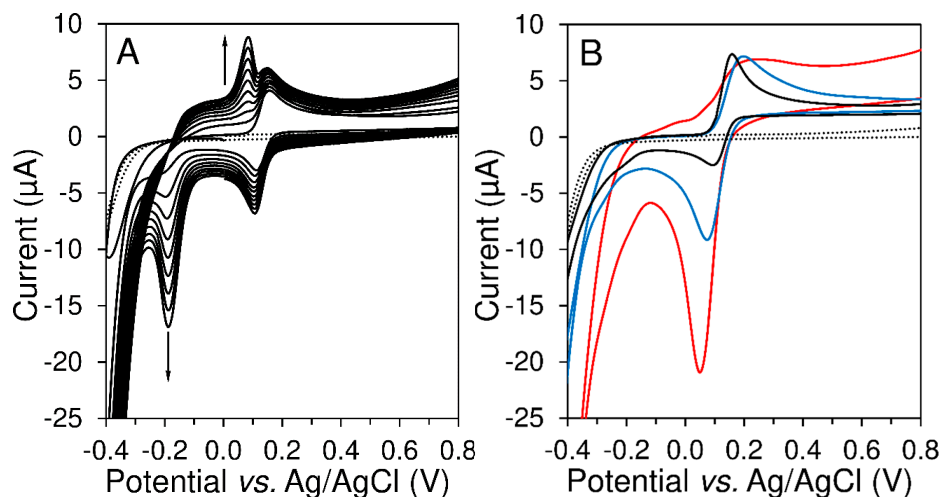


Figure 2. Repetitive ($n = 10$) cyclic voltammograms of $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox, obtained at bare CPE (A) and cyclic voltammograms of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trolox obtained at bare CPE (black), CPE/MWCNTs (blue), and CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] (red curve) (B) in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB of pH 7.0, $E_{\text{start}} = 0 \text{ V}$, $E_{\text{vertex1}} = -0.5 \text{ V}$, $E_{\text{vertex2}} = +1.3 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Dotted black lines represent voltammograms obtained at CPE in 0.1 mol L^{-1} PB (pH 7.0).

3.3. Tyrosinase Activity towards Trolox

Previous voltammetry experiments may suggest that mushroom TYR enzyme is able to catalyze the oxidation of Trolox to corresponding Trolox quinone (*p*-quinone with side chain). This claim had to be confirmed by further experiments. Trolox provides a wide band in the UV spectrum with a maximum at wavelength 291 nm (red line in Figure 3). If TYR enzyme is present, another overlapping band with maximum at wavelength 278 nm will be established. The width of this new band increases with the time of enzyme presence, as shown in Figure 4. This phenomenon can be considered as additional confirmation that Trolox probably does not inhibit catalytic activity of TYR enzyme but represents a substrate. A polymeric reaction of Trolox catalyzed by TYR enzyme cannot be excluded though.

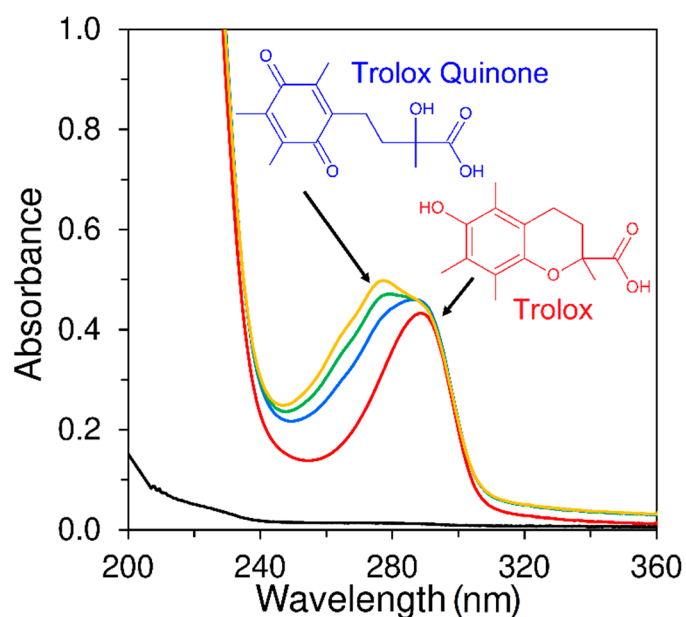


Figure 3. Ultraviolet spectra of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ TYR (black) and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox obtained in 0.1 mol L^{-1} PB (pH 7.0) for 0 (red), 10 (blue), 20 (green), and 30 min (yellow line).

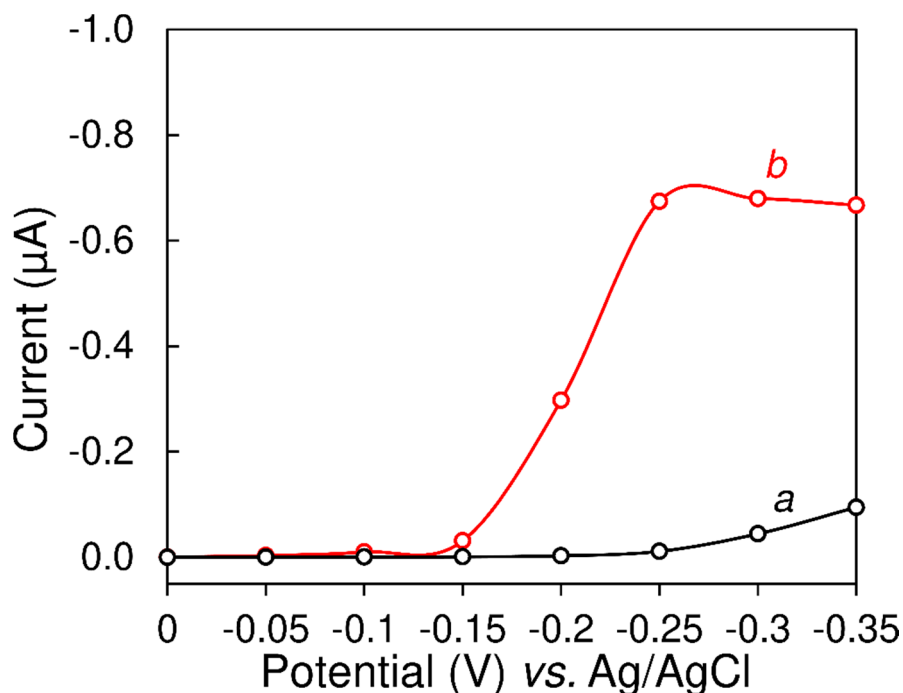


Figure 4. The dependency of the amperometric response on the magnitude of the working potential applied at the CPE/MWCNTs (curve *a*) compared to CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] (curve *b*); analyte 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trolox; supporting electrolyte 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB of pH 7.0; stirring speed of 400 rpm.

3.4. Effect of Stirring Speed

In BIA with amperometric detection, the rate of convective analyte transport (phenolic compounds and Trolox) to the biorecognition layer is affected dramatically by the stirring speed, therefore it has an effect on sensitivity of the TYR biosensor. The stirring speed was varied from 100 to 500 rpm. Finally, the stirring rate of 400 rpm was selected as the optimum value, because no significant increase was observed by further increasing the stirring rate.

3.5. Selection of Optimal pH Value of Working Medium

A pH range of the supporting electrolytes is limited in case of TYR enzyme use due to its lower activity in acidic or alkaline media. For that reason, it was found that neutral PB is the most convenient for following experiments. It was experimentally confirmed that the highest current response of Trolox at the developed CPE/CNTs/TYR/Nafion[®] biosensor was obtained at pH 7.0, which coincides with the previously obtained results [15,23].

3.6. Effect of Working Potential

If the electrochemical detection of the products of enzymatic reaction takes place at a constant value of the applied potential, the magnitude of the working potential will play the most important role in every amperometric biosensor application. The dependence of height of reduction current on working potential is shown in Figure 4. The resulting curve has the highest reduction response at -0.25 V. Therefore, it was selected as the optimum, which corresponds to the previously reported value (-0.24 V) for amperometric detection (reduction) of *p*-quinone [17]. Moreover, the negative working potentials more than -0.30 V have a negative influence on stability of baseline and background noise of amperometric signal due to oxygen reduction.

3.7. Water Content in Berries

The content of water in berries was determined during the drying of berries to a constant weight at 60 °C. The highest content of water was observed for strawberries (93%), whereas the lowest content of water was found in raspberries (82%). For other examined berries the content of water was 85%. TEAC values were determined in 100 g of dry berries, so it was very important to know the water content in individual berries in order to calculate the TEAC in the pulp.

3.8. Analysis of Berries

In order to eliminate the matrix effect, the multiple standard addition method was used in analysis with the developed TYR biosensor at optimal conditions, where a volume of 1.0 mL of berries extract was added to 9.0 mL of supporting electrolyte and subsequently 3 or 4 standard additions of 0.01 mol·L⁻¹ Trolox (each of 0.5 mL) were applied. A representative amperogram of raspberries analysis with standard addition curve $I (\mu\text{A}) = -2.0082 c (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) - 1.5137 (\mu\text{A})$ and $R^2 = 0.9978$ is shown in inset of Figure 5. As reference method, DPPH assay was used with these parameters of calibration curve for standard compound Trolox $A = -0.0103 c (\text{mmol L}^{-1}) + 0.3516$ and $R^2 = 0.9943$.

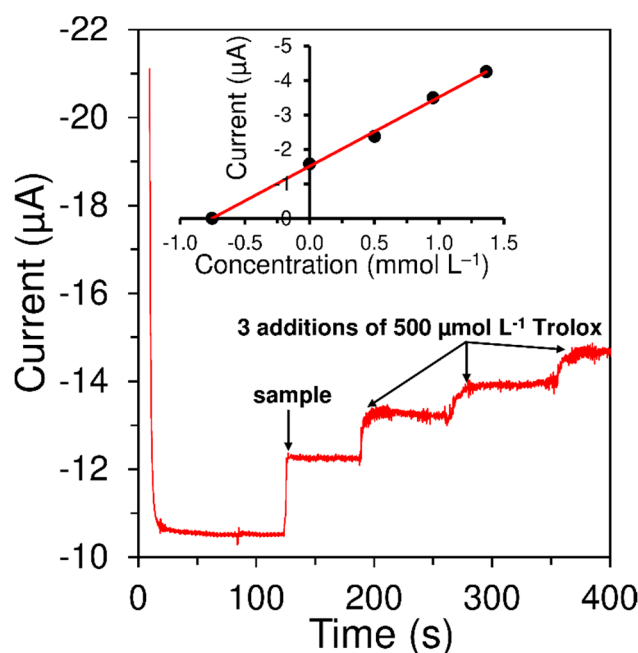


Figure 5. Representative TEAC analysis of raspberries using multiple standard additions method with CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] biosensor at constant working potential -0.25 V and stirring speed of 400 rpm.

The biosensor provided constant current response with stable base line after 120 s. In amperometric techniques, response time is one of the most important parameters describing the performance and quality of biosensors, because it reflects kinetics of electrode reaction. The response time differed with each kind of berries. It is interesting to note that a shorter response time was observed for raspberries and cranberries (<10 s) than for standard addition of Trolox (>25 s). It can be attributed to polyphenolic compounds present in berries, which are more suitable for TYR active site (simpler substrate) in comparison to Trolox.

In the case of lifetime, the long-term stability of the biosensor (stored dry in a fridge at 5 °C) was tested for up to two weeks by monitoring of 150 μmol L⁻¹ Trolox solution (see Figure S3) every 2 days (results not shown). TYR biosensor usually provides a constant current response for one week (signal drop by 19%). The fabrication method based on Nafion[®] is relatively simple, but potential leaching of

the enzyme should be taken in account. Moreover, a probable polymerisation of Trolox could shorten the lifetime of TYR biosensor.

Final TEAC values of individual dried berries obtained at the TYR biosensor and DPPH assay are shown in Table 1. It is obvious that TEAC values are different for the both used analytical methods. Generally, measurements with DPPH radical offer satisfactory repeatability of more than 95%. The repeatability of obtained results at TYR biosensor was comparable with DPPH assay for all studied berries except strawberries (90%). It can be caused by the high content of nonphenolic antioxidant e.g., AA, carotenoids, minerals with reduction properties, etc. and by presence of insoluble fiber. For example, the AA content in strawberries pulp is up to 90 mg·100 g⁻¹ depending on variety, which is at a similar level as in citrus fruits. A presence of AA in pulp of berries is known and its content taken from the National Nutrient Database (USDA) (U.S. Department of Agriculture, 2010); for standard reference, the release available can be found in Table 1. Presented data are also comparable with information from the literature [24,25].

Moreover, the studied amperometric CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] biosensor can be useful for determination of total phenolic content (TPC) [26] and also total antioxidant capacity (TAC) [27], as Trolox equivalent for samples with low concentration levels of other nonphenolic antioxidants. For dried berries (blueberries, cranberries and raspberries), the values of TEAC for the presented biosensor are in good correlation with reference method of DPPH assay as shown in Table 1. One of the discrepancies can be observed in the case of blueberries where, especially in pulp, the value of TEAC for the biosensor is lower than the value from the reference method. This is probably due to the presence of a higher amount of anthocyanins which exhibit anti-TYR activity [28].

Table 1. TEAC and AA content in various berries.

| Berries | TEAC in Dry Matter (in Pulp) (mg·100 g ⁻¹) | | AA in Pulp ^b [mg·100 g ⁻¹] |
|--------------|--|-------------------------|---|
| | Tyrosinase Biosensor ^a | DPPH ^a Assay | |
| Strawberries | 1569 (133) | 6735 (570) | 59 |
| Blackberries | 2593 (337) | 3868 (503) | 30 |
| Raspberries | 5317 (793) | 5968 (890) | 32 |
| Blueberries | 1917 (270) | 4878 (687) | 14 |
| Cranberries | 6738 (935) | 8027 (1114) | 13 |

^a Values given as arithmetic mean for five repetitions. ^b Data of AA content in berries are taken from U.S. Department of Agriculture [29] and Ref. [24,25].

Another difference can be observed in the analysis of strawberries which contain the highest concentration level of AA (according to literature). The enzyme TYR catalyzes the oxidation of polyphenolic compounds in berries only, therefore the lower TEAC values of strawberries at biosensor in comparison to reference method was found. This phenomenon corresponds to higher TEAC values obtained by DPPH assay compared to that of biosensor, because AA discolors the methanolic solution of DPPH radical, which tends to show a positive error. However, the developed biosensor could be applied in the direct determination of TPC as TEAC, in samples where phenolic compounds are major antioxidants. The comparison with other spectrophotometric assays such as ORAC, FRAP and TRAP intended for the determination of total antioxidant capacity in pulps of berries is shown in Table 2. Corresponding TEAC values in berries obtained at individual assays were found or calculated from data presented in literature [8,30–33].

The TYR biosensor provides a similar sensitivity to DPPH and TRAP assays. In comparison to ORAC assay, the sensitivity of biosensor is twice as low. From all of the analytical methods, the lowest ability to eliminate the negative influence of free radicals was observed for strawberries and oppositely the highest for cranberries. If we want to compare antioxidant capacities of individual berries, TYR biosensor provides similar information as DPPH, ORAC and TRAP assays in this sequence: cranberries > raspberries > blackberries > blueberries > strawberries. A correlation

coefficient $R^2 = 0.8409$ was found during the comparison of the TYR biosensor with the DPPH assay in the analysis of TEAC in each berry's pulp. The better value of the correlation coefficient ($R^2 = 0.9374$) was obtained, when the TEAC of blackberries was excluded as an outlier. The same situation can be found for the comparison of TYR biosensor with TRAP assay ($R^2 = 0.9622$). Corresponding correlation graphs are shown in Figure 6.

Table 2. Survey of TEAC values in pulp of berries determined by other assays.

| Berries | TEAC (mg·100 g ⁻¹) | | |
|--------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| | ORAC ^a | FRAP ^b | TRAP ^c |
| Strawberries | 1077 | 543 | 214 |
| Blackberries | 1478 | 1269 | 526 |
| Raspberries | 1268 | 994 | 262 |
| Blueberries | 1169 | 911 | 233 |
| Cranberries | 2275 | 1259 | 678 |

Data of TEAC content in berries are taken from Ref. ^a [6,8], ^b [30,31] and ^c [32].

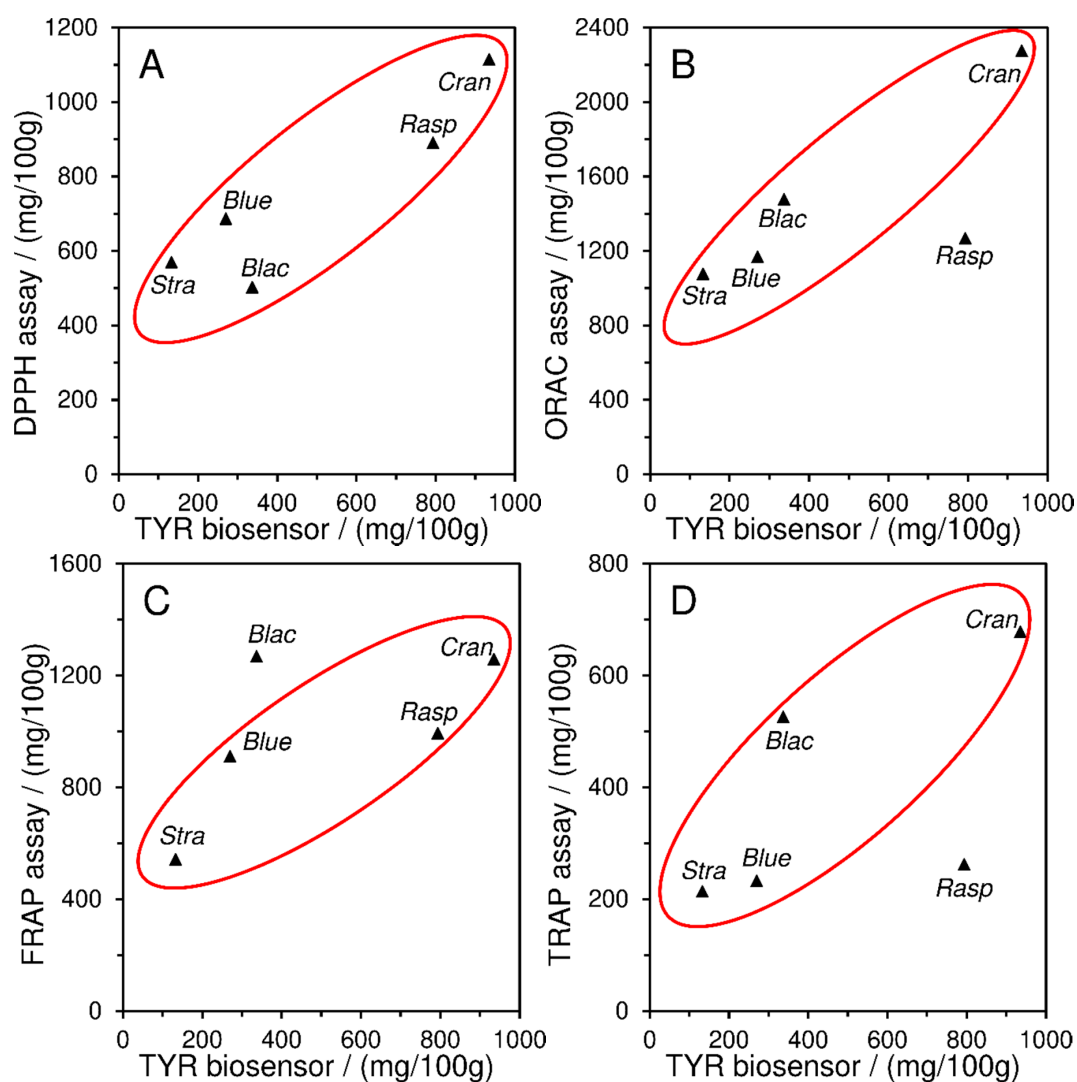


Figure 6. Comparison of TYR biosensor with other analytical assays (A) DPPH, (B) ORAC, (C) FRAP and (D) TRAP for analysis of TEAC in pulps of strawberries (Stra), blackberries (Blac), raspberries (Rasp), blueberries (Blue) and cranberries (Cran).

Moreover, it seems that ORAC and TRAP assays provide lower TEAC values than the TYR biosensor and two other spectrophotometric assays. An explanation could be found in different representations of phenolic substances in raspberries and cranberries, which probably contain a higher amount of phenolic substance, having catechol group in their chemical structures. It is also necessary to mention that spectrophotometric methods do not provide identical TEAC values for certain samples and their mutual correlations can have values from 0.6 to 0.9 [34].

4. Conclusions

In this contribution, the amperometric CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] biosensor behavior is demonstrated in the analysis of various kinds of berries. After several steps of optimization, the determination of TEAC in strawberries, blackberries, raspberries, blueberries, and cranberries was performed. The highest content of polyphenolic compounds expressed as TEAC values was found for cranberries (6378 mg/100 g) and raspberries (5317 mg/100 g) in dry matter and furthermore their pulp; cranberries (935 mg/100 g) and raspberries (793 mg/100 g). Contrary to this, the lowest TEAC value was found for strawberries in dry matter (1569 mg/100 g) and in pulp (133 mg/100 g). The obtained results were compared to the reference method of DPPH assay, as well as to the data of other methods (ORAC, TRAP, FRAP), based on the spectrophotometry taken from literature. It can be stated that our results from the presented TYR biosensor are in satisfactory correlation with above mentioned DPPH assay. For ORAC and TRAP assays, values of correlation coefficient higher than 0.9 can be achieved, excluding raspberries. It has to be mentioned that the results obtained by the biosensor exhibit a negative error, due to the presence of nonphenolic compounds, mainly AA. Therefore, TYR biosensor is suitable for determination of “total phenolic content” and “total antioxidant capacity” for samples with low content of non-polyphenolic antioxidants. It has also one disadvantage, namely its stability, which results from lifetime of present TYR enzyme; hence, the current response starts to decrease approximately after one week. The developed biosensor offers a portable device for rapid quality control of the foodstuff in terms of their freshness and nutritional value. It could bring some favorable features, like low costs, simple instrumentation, measuring of turbid samples, working with less hazardous chemicals, etc. It is by no means a replacement of spectrophotometric assays, but an alternative to them. The electrochemical approach could also serve as a complementary method to already established ones, which could bring additional information about analyzed samples, reflecting their electrochemical properties directly.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3417/10/7/2497/s1>, Figure S1: Effect of carbon nanotubes content in DMF dispersion on the anodic and cathodic peak potentials, Figure S2: Dependency of peak current on different volumes of MWCNTs, Figure S3: Typical amperometric responses of the CPE/MWCNTs/TYR/Nafion[®] biosensor, Scheme S1: Proposed mechanism of p-quinone reduction by ascorbic acid.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., A.M.A., R.M.; methodology, M.S.; formal analysis, M.S., A.F., T.A.; electrodes characterisation, M.V.; authors of manuscript, M.S., A.F., A.M.A.; final correction, V.A., L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Czech Science Foundation (project 19-03160S).

Acknowledgments: This work was financially supported by the Czech Science Foundation (project 19-03160S).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Neto, C.C. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 652–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Olas, B. Berry phenolic antioxidants – Implications for human health? *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4076–4082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Triantis, T.; Stelakis, A.; Dimotikali, D.; Papadopoulos, K. Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *536*, 101–105. [[CrossRef](#)]
5. Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Shaikh, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957–998. [[CrossRef](#)]
6. Atala, E.; Vásquez, L.; Speisky, H.; Lissic, E.; López Alarcón, C. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC pyrogallol red methodology. *Food Chem.* **2009**, *113*, 331–335. [[CrossRef](#)]
7. Rabeta, M.S.; Nur Faraniza, R. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 1691–1696.
8. Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, A.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M. Solid phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* **2010**, *123*, 1055–1061. [[CrossRef](#)]
9. Pantelidis, G.G.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G.A.; Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**, *102*, 773–778. [[CrossRef](#)]
10. Giacomelli, C.; Giacomelli, F.C.; Alves, L.O.; Timbola, A.K.; Spinelli, A. Electrochemistry of vitamin E hydro alcoholic solutions. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 748–755. [[CrossRef](#)]
11. Isaacs, N.S.; van Eldik, R. A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1997**, 1465–1468. [[CrossRef](#)]
12. Sýs, M.; Pekec, B.; Kalcher, K.; Vytřas, K. Amperometric enzyme carbon paste based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 9030–9040.
13. Rolff, M.; Schottenheim, J.; Peters, G.; Tuzcek, F. The first catalytic tyrosinase model system based on a mononuclear copper(I) complex: Kinetics and mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6438–6442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Weijn, A.; Mes, J.J.; Fusetti, F.; Wichers, H.J.; Dijkstra, B.W. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477–5486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Skládal, P. Mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode as an amperometric biosensor for phenols. *Collect. Czech. Chem.* **1991**, *56*, 1427–1433. [[CrossRef](#)]
16. Yao, W.W.; Peng, H.M.; Webster, R.D. Electrochemistry of α -tocopherol (vitamin E) and α -tocopherol quinone films deposited on electrode surfaces in the presence and absence of lipid multilayers. *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 21805–21814. [[CrossRef](#)]
17. Sýs, M.; Metelka, R.; Mikysek, T.; Vytřas, K. Improvement of enzyme carbon paste based biosensor using carbon nanotubes for determination of water soluble analogue of vitamin E. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 150–157. [[CrossRef](#)]
18. Sýs, M.; Metelka, R.; Vytřas, K. Comparison of tyrosinase biosensor based on carbon nanotubes with DPPH spectrophotometric assay in determination of TEAC in selected Moravian wines. *Monatshefte fuer Chem.* **2015**, *146*, 813–817. [[CrossRef](#)]
19. Švancara, I.; Vytřas, K.; Metelka, R. Casing for carbon paste for electrochemical measurements. Czech Patent CZ 301714 B6; Int. Cl. G01N 27/30, 2 December 2002.
20. Mikysek, T.; Stočes, M.; Švancara, I.; Ludvík, J. The ohmic resistance effect for characterisation of carbon nanotube paste electrodes (CNTPEs). *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3684–3690. [[CrossRef](#)]
21. Sýs, M.; Metelka, R.; Vytřas, K. Amperometric tyrosinase carbon paste based biosensor in food analysis. *Chem. Listy* **2014**, *108*, 179–182.
22. Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9329–9339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Akyilmaz, E.; Kozgus, O.; Türkmen, H.; Cetinkaya, B. A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino-benzene. *Bioelectrochemistry* **2010**, *78*, 135–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Ancos, B.; González, E.M.; Cano, M.P. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4565–4570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Jabłońska-Ryś, E.; Zalewska-Korona, M.; Kalbarczyk, J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolic content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* **2009**, *17*, 115–120.
26. Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4113–4117. [[CrossRef](#)]
27. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 701–705. [[CrossRef](#)]
28. Pornanong, A.; Nipaporn, B.; Teerapol, S. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1093–1097. [[CrossRef](#)]
29. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Available online: <https://ods.od.nih.gov/pubs/usdandb/VitaminC-Content.pdf> (accessed on 4 April 2020).
30. Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Myhrstad, M.C.W.; Barikmo, I.; Hvattum, E.; Remberg, S.F.; Wold, A.B.; Haffner, K.; Bargerod, H.; Andersen, L.F.; et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Nutr. J.* **2002**, *132*, 461–471. [[CrossRef](#)]
31. Holasová, M.; Fiedlerová, V. Comparison of methods for determination of antioxidant activity in fruit and vegetable juices. *Chem. Listy* **2011**, *105*, 766–772.
32. Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Nutr. J.* **2003**, *133*, 2812–2819. [[CrossRef](#)]
33. Tosun, M.; Ercisli, S.; Karlidag, H. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C575–C579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 669–675. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Flow Injection Amperometric Evaluation of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Chocolates with Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode

Tahir Arbneshi¹,
Arbër Frangu¹,
Michaela Frühbauerová²,
Libor Červenka²,
Liridon Berisha¹,
Kurt Kalcher³ and
Milan Sýs^{2*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10 000 Prishtina, Republic of Kosovo

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

³Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, Karl Franzens University, Universitaetsplatz 1, 8010 Graz, Austria

Received: 15 September 2020

Accepted: 6 May 2021



SUMMARY

Research background. The objective of this paper is to introduce an instrumentally simple analytical tool for determination of cocoa solid content in chocolates. This electroanalytical method is based on amperometric oxidation of all present antioxidants in chocolates at boron-doped diamond electrode (BDDE) that is integrated in a flow injection analysis (FIA) wall-jet electrode system.

Experimental approach. As part of optimisation, thirteen commonly occurring antioxidants were investigated using cyclic voltammetry at the BDDE in 0.1 mol/L phosphate buffer with different methanol (MeOH) content. Working parameters, such as MeOH volume fraction, flow rate and detection potential, were optimised. Principally, the height of the oxidation peak (current response) representing the oxidation of the sum of antioxidants (total antioxidant content; TAC) was expressed as Trolox equivalents.

Results and conclusions. For analytical purpose, a linear range from 5 to 100 mg/L described by regression equation and characterised by high correlation coefficient $R^2=0.9994$ was achieved. Obtained high positive correlation between the determined values of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and cocoa mass fractions characterised by correlation coefficient of 0.9187 for eight randomly selected samples (one white, two milk, and five dark chocolates) confirmed that cocoa solids represent the main source of antioxidants (reducing agents).

Novelty and scientific contribution. The research demonstrates that TEAC values could be considered as an additional marker of cocoa content in the chocolate analysis to the commonly used theobromine (authenticity of food products). The developed FIA could therefore serve as simple analytical tool in the food quality control.

Key words: Trolox equivalent antioxidant capacity, amperometry, boron-doped diamond electrode, flow injection analysis, cocoa mass fraction in chocolate

INTRODUCTION

Chocolate is a favourite food product made from cocoa beans that is consumed as sweets or beverage and to flavour or coat various confectionery and bakery products (1). Generally, the chocolate is divided into three main categories, namely dark, milk and white chocolate (1,2). Dark chocolate usually contains 50–90 % cocoa solids, cocoa butter and sugar, whereas milk chocolate contains 10–50 % cocoa solids, cocoa butter, milk in some form and sugar. White chocolate does not contain any cocoa solids and is made simply of cocoa butter, sugar and milk powder (3). Lower quality chocolates may also contain butter fat, vegetable oil or artificial colours or flavours. According to EU legislation (2000/36/ES), the last-mentioned type must not be labelled as chocolate (4). U.S. Food and Drug Administration (FDA) issued an order that semisweet chocolate must contain a minimum of 35 % chocolate liquor (5).

In the recent past, Czech Agriculture and Food Inspection Authority revealed the sad fact that most commercially available chocolates do not have the declared content of cocoa solids in order to be classified as a regular chocolate. Moreover, the statutory minimum content of cocoa solids was missing in some chocolate drinks (6). These unsatisfactory

*Corresponding author:

Phone: +420466037034

Fax: +420466037279

E-mail: milan.sys@upce.cz

reports demonstrate the urgency to develop a simple analytical method applicable in the chocolate analysis.

Theobromine (TBR) is the primary alkaloid contained in cocoa powder and chocolate. Since TBR ranges from 26 g/kg in cocoa to 140 mg/kg in cocoa butter, this alkaloid can be considered as a marker of cocoa content (7). Determination of fat-free cocoa solids is performed using a protocol ČSN 56 0578, based on the HPLC analysis (8).

In addition to TBR, dark chocolate is rich in minerals, such as potassium, iron, magnesium, copper, manganese and zinc. The cocoa in dark chocolate also contains antioxidants called flavonoids, which may provide several health benefits (3,9). Assuming that cocoa powder and cocoa butter are the only sources of antioxidants, it is possible to use the total antioxidant content (TAC) as another potential marker of cocoa content (10). Phenolic compounds, flavours (vanillin and ethylvanillin) and alkaloids (TBR and caffeine) present in chocolate represent reducing agents that can be electrochemically oxidised at carbon-based working electrodes (11–14).

Due to an insignificant passivation of the electrode surface, a boron-doped diamond electrode (BDDE) was integrated into wall-jet flow cell to find out whether a simple flow injection analysis (FIA) with amperometric detection could be used for evaluation of dark chocolates (15). A correlation (R or R^2), known as a statistical measure describing a relationship between two variables (16), represented ideal tool to clarify the dependence between the declared cocoa content and TAC values in numerous dark chocolate samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Analytical standards of $\geq 99.0\%$ L-ascorbic acid, $\geq 98.0\%$ caffeic acid, 99.0% caffeine, $\geq 99\%$ *trans*-cinnamic acid, $\geq 98\%$ (–)-epicatechin, 97% (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), $\geq 95\%$ chlorogenic acid, 97.5 – 102.5% gallic acid, $\geq 97.0\%$ kaempferol, $\geq 98\%$ (+)-catechin hydrate, $\geq 95\%$ naringin, $\geq 98\%$ sinapic acid, $\geq 98.0\%$ theobromine and $\geq 97\%$ vanillin were purchased from Sigma-Aldrich, Merck (Prague, Czech Republic). All voltammetric measurements were performed in their 1.0 mmol/L aqueous solutions of 0.1 mol/L phosphate buffer, $\text{pH}=7.0$, prepared from sodium dihydrogen phosphate dihydrate and disodium hydrogen phosphate, both obtained from Lach-Ner, Ltd. (Neratovice, Czech Republic). Due to low solubility, naringin, (+)-catechin, (–)-epicatechin and kaempferol had to be dissolved in phosphate buffer containing volume fraction of 10 and 50 % methanol (MeOH). Deionized water ($\rho=18.3\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtained with a Milli-Q® water purification system from Merck (Darmstadt, Germany) was used for the preparation of phosphate buffer.

Pretreatment of boron-doped diamond electrode

A commercially purchased boron-doped diamond electrode (BDDE) with boron to carbon ratio of 1:1000 and a

surface diameter of 3 mm (Windsor Scientific Ltd, Slough, UK) was used for all experiments. The BDDE surface was mechanically pretreated by carefully polishing it with a wet filter paper to eliminate the passivation layers on the electrode caused by oxidation products of polyphenols.

Instrumentation

The electrochemical behaviour of the dominant thirteen substances with antioxidant effect present in chocolate and Trolox was studied using cycling voltammetry at BDDE which was simultaneously connected with a silver/silver chloride electrode, 3.0 mol/L KCl as salt bridge (reference electrode) from Metrohm Česká republika s.r.o. (Prague, Czech Republic) and platinum sheet (auxiliary electrode) from Elektrochemické detektory, s. r. o. (Turnov, Czech Republic) to the potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT101 operated *via* the Nova 1.11 software from the above-mentioned Metrohm company (17).

Flow injection analysis (FIA) configuration consisted of a multi-channel peristaltic pump MINIPULS 3 from Gilson (Middleton, WI, USA), Rheodyne automatic six-position dosing valve from IDEX Health & Science (Wertheim, Germany), and BDDE inserted into the cross-flow cell from Inventek Sp. z o.o. (Warsaw, Poland), as shown in Fig. 1.

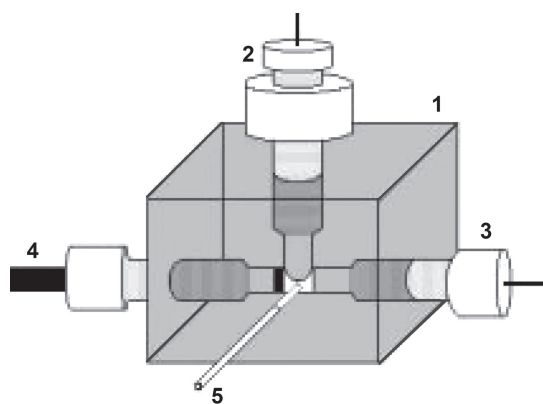


Fig. 1. Schematic diagram of the electrochemical flow cell used in the amperometric measurements in flow injection system: 1=polyurethane resin block, 2=silver chloride reference electrode, 3=auxiliary platinum electrode, 4=boron-doped diamond electrode, and 5=polyethylene tubing

Methods

Repetitive cyclic voltammetry (five cycles) was used to determine oxidation peak potentials of the investigated antioxidant substances. Potential range was set from -0.4 to $+1.6\text{ V}$, initial potential of 0 V , scan rate (v) 50 mV/s , and potential step (E_{step}) 2.5 mV . Flow injection analysis with amperometric detection in the wall-jet configuration was usually performed at $+1.3\text{ V}$ vs a miniature silver/silver chloride reference electrode at flow rate of 1 mL/min . The 0.1 mol/L phosphate buffer ($\text{pH}=7.0$) containing 30 % methanol was used as

flowing carrier solution. Otherwise, all necessary changes in the working conditions are listed in the legends of the corresponding figures.

Sample preparation

Several purposefully selected chocolates of imported origin, differing in the cocoa solid content from 0 to 80 %, were purchased from common stores in Prishtina, Kosovo. The extraction of potential antioxidants from the chocolate samples of 5 g containing different amounts of cacao were carried out in a total mixture of 50 mL of water (70 %), acetone (29.8 %) and glacial acetate acid (0.2 %) using the ultrasonic bath at 30 °C for 30 min. The acetone was evaporated in ultrasonic bath at 40 °C for 20 min. After this, the solution with chocolate was adjusted with 0.1 mol/L NaOH to pH=5 and diluted in 100-mL volumetric flask using 0.1 mol/L phosphate buffer (pH=7.0) and MeOH ($\varphi=30$ %). The sample was then centrifuged five times at stirring speed of 1000 rpm for 4 min and filtered through a filter paper of pore size less than 1 μm . The filtrate obtained from the chocolate extracts was diluted five-fold to reduce the high content of extract-reducing agents. Sample volume of 100 μL was used for FIA analysis.

Statistical evaluation

Analysis of chocolate extracts was always repeated five times ($N=5$) and final results were calculated and presented as error bars (confidence intervals) $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}$, where \bar{x} is the arithmetic mean, s the standard deviation, and $t_{1-\alpha}$ the critical value of Student's t -distribution for five (4 degrees of freedom) determinations (2.7764) at a significance level $\alpha=0.05$ (95 % probability).

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical behaviour of substances present in chocolate

In this work we investigated only the reducing power of the chocolate samples, *i.e.* the potential of a substance to reduce another substance either by removal of hydrogen atom

or release of electrons. We did not use conventional spectrophotometric assays, which are based on monitoring the reactions between the present antioxidants and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) or di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH^{•+}) radicals.

Since we can anodically oxidise most of the chocolate components with antioxidant activity at carbon-based working electrodes (18–20), we investigated the electrochemical behaviour of thirteen selected antioxidants using repetitive cyclic voltammetry (five cycles) at BDDE in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH=7.0) from 0 to +1.6 V and back to 0.4 V. Due to low water solubility, phosphate buffer with MeOH ($\varphi=10$ %) was used for electrochemical study of (+)-catechin, (–)-epicatechin and naringin, while addition of 50 % MeOH was necessary for kaempferol due to its low solubility in water.

To set a constant working potential for the subsequent amperometric detection, it was important to determine the values of the peak potentials of individual antioxidants. All investigated antioxidants provided minimally one oxidation peak, where for the analytical purpose (determination of cocoa powder content in chocolate), peak potential values of the first peaks are shown in ascending order as follows: caffeic acid at +0.398 V, kaempferol at +0.483 V, chlorogenic acid at +0.505 V, sinapic acid at +0.620 V, gallic acid at +0.635 V, (+)-catechin at +0.640 V, L-ascorbic acid at +0.649 V, vanillin at +0.688 V, (–)-epicatechin at +0.744 V, naringin at +1.011 V, cinnamic acid at +1.133 V, caffeine at +1.384 V, and theobromine (TBR) at +1.404 V.

For demonstration, repetitive cyclic voltammograms (5 cycles) of Trolox, vanillin, and TBR are shown in Fig. 2. In all cases, a decrease in the oxidation signal was observed with each subsequent cycle, indicating a slow transport of oxidation products from the BDDE surface. This phenomenon was solved when these products were flushed from the electrode surface by amperometric detection in a flow mode. From the above-mentioned peak potential values, it is clear that if a constant potential is set for amperometric detection of +0.623 V (Trolox), antioxidants having higher oxidation peak

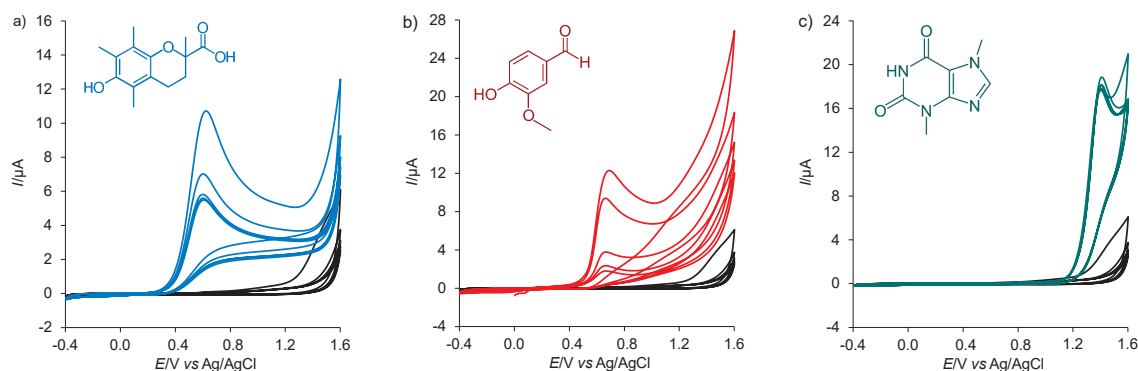


Fig. 2. Repetitive cyclic voltammograms (5 cycles) of: a) 1 mmol/L Trolox, b) vanillin, and c) theobromine recorded on boron-doped diamond electrode in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH=7.0) at a scan rate of 50 mV/s. Black curves (blank) indicate the cyclic voltammograms obtained for phosphate buffer only

potentials will not be included in chocolate analysis. Hence, an effect of amperometric detection on total antioxidant content (TAC) values was essential for optimisation. These TAC values are usually expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (21). The presence of short-chain alcohols in phosphate buffer (aqueous-alcoholic mixtures) generally has no effect on peak shift. However, this assumption had to be verified for a MeOH volume fraction of 10 to 50 %.

Optimisation of flow injection analysis

The optimisation procedure included selection of optimal working parameters, such as composition of carrier solution, potential of amperometric detection, and flow rate. Due to the presence of slightly water-soluble phenolic acids, flavonoids and tannins, it was necessary to select the MeOH volume fraction in the carrier solution of 0.1 mol/L phosphate buffer (pH=7.0). The whole optimisation was carried out in the dark chocolate extract with $w(\text{cocoa})=80\%$.

In general, polyphenolic compounds can be defined as weak organic acids for which it is known that their peak potentials are shifted to more positive potentials with decreasing pH values (22,23). The main reason for not performing FIA with acidic carrier solution is the necessity of amperometric detection at high positive potentials. The effect of pH in a range of pH=6–9 on current response of 1 mmol/L Trolox was investigated using cyclic voltammetry in 0.1 mol/L phosphate buffer. The obtained results indicate that the Trolox provides the maximum current response at pH=7, which was consistent with other studies that report the determination of polyphenols using FIA (24,25).

The optimum volume fraction of methanol in the carrier phosphate buffer solution was determined by varying $\varphi(\text{MeOH})=0\text{--}50\%$. For constant detection potential of +1.3 V and flow rate of 1 mL/min, the extract of dark chocolate provided an oxidation peak whose height increased with higher volume fractions of MeOH (up to 30 %) in the phosphate buffer (Fig. 3) and this was taken as an optimum for further measurements.

Retaining the detection potential constant throughout the analysis is of critical significance for the application of amperometric sensing. After injection of the chocolate extract into the flowing carrier solution, an evident increase in the current response became clear for potentials greater than +0.7 V, whereas setting at higher potential values triggered only a small increase in the current response. However, a significant increase in the baseline current response was observed at detection potentials greater than +1.4 V and thus the optimal value of +1.4 V was chosen for preventive purposes.

The carrier solution flow rate was also the important FIA working parameter to be optimised as it specifies the duration of reducing agents (polyphenols) in the column where their electrochemical oxidation takes place. The flow rate of

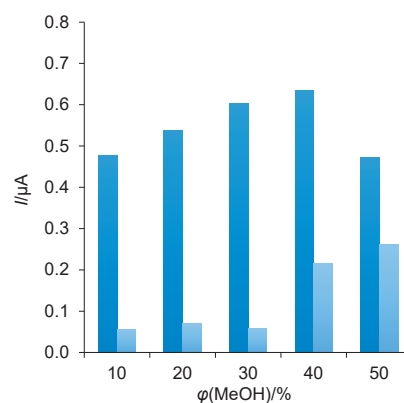


Fig. 3. Effect of MeOH volume fraction in phosphate buffer on the current response of the extract of dark chocolate with $w(\text{cocoa})=80\%$. Results were recorded on boron-doped diamond electrode in FIA mode at a flow rate of 1 mL/min and detection potential of +1.3 V. The light blue bars indicate the baseline current responses

0.2 to 1.6 mL/min for 50 mg/L Trolox was investigated at the fixed potential of +1.3 V. A sharp rise in peak height was seen up to 1 mL/min, while a constant current response was observed above that flow rate. Therefore, a flow rate of 1 mL/min was chosen as optimum.

Analytical method validation

First, it is necessary to note that the presented contribution is not an introduction of a newly developed analytical method for TEAC determination of chocolate extracts, but an initial study to find out whether TEAC values can be used as a marker for cocoa content in chocolate samples. However, a simple validation of FIA with amperometric detection at BDDE had to take place.

Precision, defined as the level of agreement of repeated measurements, was determined as relative standard deviation (RSD) of five analyses (injections). For example, RSD values of 3.3 and 3.8 % for milk chocolate (30 % cocoa) and dark chocolate (50 % cocoa) extracts, respectively, were calculated. If significance level of 5 % ($\alpha=0.05$) is taken into account, satisfactory precision can be obtained.

As shown in Fig. 4, the dependence of height of oxidation current on Trolox concentration was studied for calibration range from 5 to 160 mg/L. A calibration range from 5 to 100 mg/L Trolox was described by the following equation:

$$I=0.04859+0.0233c \quad R^2=0.9994 \quad /1/$$

where 0.04859 is a slope characterising the sensitivity, 0.0233 is y-intercept, and c is the concentration of the standard (Trolox). This linear behaviour between Trolox concentration and peak current response can be applicable for analytical purpose. If concentrations higher than 100 to 160 mg/L Trolox are included into calculations of linear regression, the following equation will be obtained:

$$I=0.05736+0.0211c \quad R^2=0.9954 \quad /2/$$

where 0.05736 is the slope, and 0.0211 is y-intercept. Due to the high value of the intercept, it was not possible to use the

method of standard addition, and therefore method of calibration curve was preferred. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 1.4 and 4.6 mg/L Trolox, respectively, were calculated according to the formulae:

$$\text{LOD}=3s/k \quad /3/$$

and

$$\text{LOQ}=10s/k \quad /4/$$

where 3 and 10 are statistically recommended multiples of the baseline noise, s represents the standard deviation of five repetitive measurements of 5 mg/L Trolox and k is the slope of linear regression (0.0233).

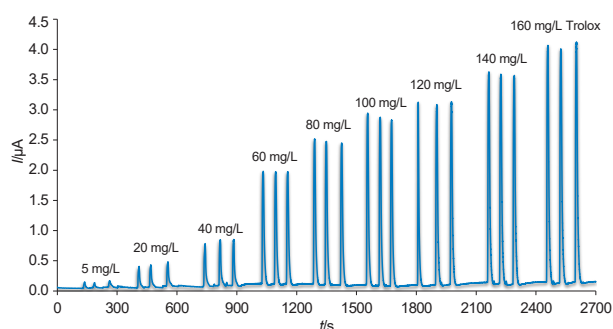


Fig. 4. Typical amperograms of flow injection analysis recorded on boron-doped diamond electrode within calibration measurements at optimum working conditions (phosphate buffer with $\phi(\text{MeOH})=30\%$, flow rate of 1 mL/min and detection potential of +1.3 V)

Analysis of chocolate samples

Extracts of white chocolate (0 % cocoa), two samples of milk chocolate (30 % cocoa), and three dark chocolates (50, 64 and 80 % cocoa) were analysed using FIA at BDDE. Two milk chocolates from different manufacturers with the same cocoa mass fraction were chosen to verify the accuracy of the analysis. **Fig. 5** shows that both extracts of milk chocolates provided comparable current response. In addition, a current response at the limit of detection was obtained for the extract of white chocolate which confirms that this type of chocolate cannot be considered as a rich source of antioxidants.

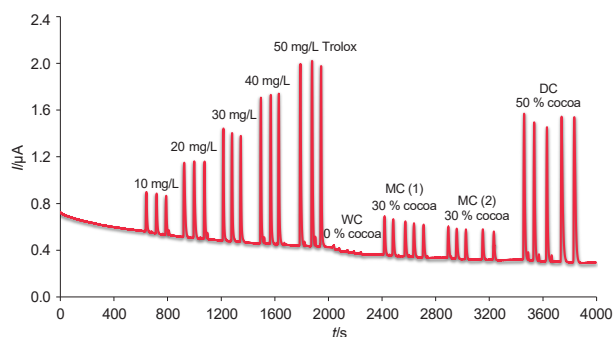


Fig. 5. Typical record obtained during flow injection analysis of white (WC), milk (MC) and dark chocolate (DC) at the boron-doped diamond electrode

Unlike this, the dark chocolate extract samples were diluted twice so that their current responses would not exceed the linear range.

Except for one sample of chocolate with 80 % cocoa (excluded from statistical evaluation), TEAC values (mg Trolox per 100 g sample) increased with higher cocoa mass fraction. The reason why the dark chocolate extract provided the current response like chocolate samples with half the cocoa content has not been further investigated. However, it can be assumed that the manufacturer probably declared false nutritional information.

Fig. 6 shows that TAC presented as TEAC could be considered as additional marker of cocoa content in the chocolate analysis to the commonly used TBR and caffeine (7). Moreover, a high positive correlation between the determined TEAC values and cocoa mass fractions characterised by $R=0.9187$ for eight randomly selected chocolate samples is proof of that. The calculated TEAC values from FIA are in close agreement with those previously reported routine spectrophotometric assays that are usually based on the reaction of antioxidants with a colour radical (26,27).

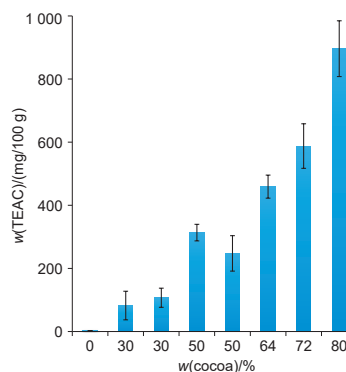


Fig. 6. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of white (0 %), milk (30 %), and dark (50-80 % cocoa mass fraction) chocolates obtained using the flow injection analysis with integrated boron-doped diamond electrode

CONCLUSIONS

The boron-doped diamond electrode integrated in the flow injection analysis (FIA) system could represent a simple analytical tool for evaluation of chocolate quality by determining its cocoa content. This basic study represents the first step in the development of a simple analytical method for determination of cocoa content as a source of polyphenols and other potential antioxidants (reducing agents). It is expected that the analyses of more chocolate samples containing different cocoa powder mass fractions and comparisons with measured total phenolic content as Trolox equivalents will be the subjects of the upcoming investigations. The developed FIA will find application in the food quality control if the presented assumption is confirmed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial supports from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2020-002) and mobility support from CEEPUS network CIII-CZ-0212-13-1920 are gratefully acknowledged.

FUNDING

This research received no external funding.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they do not have any known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

AUTHORS' CONTRIBUTION

T. Arbneshi evaluated the measured data. A. Frangu carried out all laboratory measurements. M. Frühbauerová prepared samples of chocolates for FIA analysis. L. Červenka made the final correction of the English language. L. Berisha constructed an electrochemical flow cell. K. Kalcher designed all steps leading to the development of the present electro-analytical method. M. Sýs coordinated the work of the whole scientific team and wrote the manuscript.

ORCID ID

T. Arbneshi  <https://orcid.org/0000-0003-3053-169X>
 A. Frangu  <https://orcid.org/0000-0001-9525-8466>
 M. Frühbauerová  <https://orcid.org/0000-0003-1286-7341>
 L. Červenka  <https://orcid.org/0000-0003-2316-8765>
 L. Berisha  <https://orcid.org/0000-0003-3516-0314>
 M. Sýs  <https://orcid.org/0000-0002-3982-3659>

REFERENCES

1. Aprotosoia AC, Luca SV, Miron A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products – An overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016;15(1):73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
2. Montagna MT, Diella G, Triggiano F, Caponio GR, De Giglio O, Caggiano G, *et al.* Chocolate, “Food of the Gods”: History, science, and human health. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(24):4960. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244960>
3. Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(10):2779–811. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697>
4. Directive 2000/36/EC of the European Parliament and of the Council relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption. *Off J Eur Comm.* 2000;L197:19–25. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:197:0019:0025:EN:PDF>.
5. Code of Federal Regulations (CFR). Title 21: Food and drugs. Part 163–Cacao products, Subpart B–Requirements for specific standardized cacao products, Paragraph 163.123 Sweet chocolate. Washington, DC, USA: US Government Publishing Office; 2019. pp. 546–7. Available from: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2020-title21-vol2/pdf/CFR-2020-title21-vol2-part163.pdf>.
6. Kopřiva P. As good as half of the cocoa content was missing in instant drink MalCao. Brno, Czech Republic: Czech Agriculture and Food Inspection Authority (CAFIA); 2016. Available from: <https://www.szpi.gov.cz/en/article/as-good-as-half-of-the-cocoa-content-was-missing-in-instant-drink-malcao.aspx?q=JmNobnVtPTEmaGw9Y29jb2E%3d>.
7. Risner CH. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (–)epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. *J Chromatogr Sci.* 2008;46(10):892–9. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.10.892>
8. ČSN 56 0578. Chocolate and chocolate confectionery – Determination of fat-free cocoa solids. Prague, Czech Republic: Czech technical standards (ČSN); 2017 (in Czech). Available from: <https://www.technickenormy.cz/csn-56-0578-cokolada-a-cokoladove-cukrovinky-stanoveni-ob-sahu-tukuproste-kakaove-susiny-1/>.
9. Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc.* 2003;103(2):215–23. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50028>
10. Genovese MI, da Silva Lannes SC. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. *Food Sci Technol.* 2009;29(4):810–4. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400017>
11. Švorc L, Tomčík P, Svitková J, Rievaj M, Bustin D. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. *Food Chem.* 2012;135(3):1198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.052>
12. Farag AS, Sýs M, Hájek T, Vytřas K. Voltammetric determination of ethylvanillin and methylvanillin sum at carbon paste electrode modified by sodium dodecyl sulfate in selected foodstuffs. *Monatsh Chem.* 2018;149:1945–53. <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2266-z>
13. Brčanović JM, Pavlović AN, Mitić SS, Stojanović GS, Manojlović DD, Kaličanin BM, Veljković JN. Cyclic voltammetric determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: Correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds. *Food Technol Biotechnol.* 2013;51(4):460–70.
14. Švorc L, Haššo M, Sarakhman O, Kianičková K, Stanković DM, Otrřal P. A progressive electrochemical sensor for food quality control: Reliable determination of theobromine in chocolate products using a miniaturized boron-doped

- diamond electrode. *Microchem J.* 2018;142:297–304.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.007>
15. Dejmikova H, Scampicchio M, Zima J, Berek J, Mannino S. Determination of total phenols in foods by boron doped diamond electrode. *Electroanalysis.* 2009;21(9):1014–8.
<https://doi.org/10.1002/elan.200804508>
 16. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med.* 2018;18(3):91–3.
<https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
 17. Nova, v. 1.11.0, Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands; 2014. Available from: http://www.ecochemie.nl/news/NOVA_1.11.html.
 18. Pekec B, Feketeföldi B, Ribitsch V, Ortner A, Kalcher K. Development of an electrochemical sensor for the determination of the total antioxidant capacity in berries based on boron doped diamond. *J Electrochem Sci Eng.* 2013;3(1):1–9.
<https://doi.org/10.5599/jese.2012.0024>
 19. Alpar N, Yardım Y, Şentürk Z. Selective and simultaneous determination of total chlorogenic acids, vanillin and caffeine in foods and beverages by adsorptive stripping voltammetry using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Sens Actuators B Chem.* 2018;257:398–408.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.100>
 20. Jiang L, Ding Y, Jiang F, Li L, Mo F. Electrodeposited nitrogen-doped graphene/carbon nanotubes nanocomposite as enhancer for simultaneous and sensitive voltammetric determination of caffeine and vanillin. *Anal Chim Acta.* 2014;833:22–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.010>
 21. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407–12.
<https://doi.org/10.1042/cs0840407>
 22. Macikova P, Halouzka V, Hrbac J, Bartak P, Skopalova J. Electrochemical behaviour and determination of rutin on modified carbon paste electrodes. *Sci World J.* 2012;2012:Article ID 394756.
<https://doi.org/10.1100/2012/394756>
 23. Chao M, Ma X. Voltammetric determination of chlorogenic acid in pharmaceutical products using poly(aminosulfonic acid) modified glassy carbon electrode. *J Food Drug Anal.* 2014;22(4):512–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.12.006>
 24. Leamsomrong K, Suttajit M, Chantiratikul P. Flow injection analysis system for the determination of total phenolic compounds by using Folin-Ciocalteu assay. *Asian J Appl Sci.* 2009;2(2):184–90.
<https://doi.org/10.3923/ajaps.2009.184.190>
 25. Freitas JM, da Costa Oliveira T, Munoz RAA, Richter EM. Boron doped diamond electrodes in flow-based systems. *Front Chem.* 2019;7:190.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>
 26. Calixto-Cotos MR, Chire-Fajardo GC, Orihuela-Rivera CA. Antioxidants properties of chocolates sold in Peru. *Acta Agron.* 2018;67(4):479–85.
<https://doi.org/10.15446/acag.v67n4.71357>
 27. Godočiková L, Ivanišová E, Árvay J, Petrová J, Kačániová M. The comparison of biological activity of chocolates made by different technological procedures. *Potr S J F Sci.* 2016; 10(1):316–22.
<https://doi.org/10.5219/628>

UNIVERSITETI I PRISHTINËS

"HASAN PRISHTINA"

FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKE-NATYRORE

DEPARTAMENTI I KIMISË

BIOSENSORI ELEKTROKIMIK BAZUAR NË TIROZINAZË PËR
PËRCAKTIMIN E KOMPONIMEVE FENOLIKE

PUNIM I DOKTORATËS

UNIVERSITETI I PRISHTINËS "HASAN PRISHTINA"
FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKE-NATYRORE
PRISHTINË

| | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| Pranuar me 10. 10. 2022 | | | |
| Nj. org | Numër | Sasia | Vlera |
| 01 | 5075 | 3 | — |

Mentori:

Prof. Dr. Tahir Arbneshi

Kandidati:

Arbër Frangu

PRISHTINË, 2022

UNIVERSITETI I PRISHTINËS
“HASAN PRISHTINA”
FAKULTETI I SHKENCAVE MATEMATIKE-NATYRORE
DEPARTAMENTI I KIMISË



BIOSENSORI ELEKTROKIMIK BAZUAR NË TIROZINAZË
PËR PËRCAKTIMIN E KOMPONIMEVE FENOLIKE

PUNIM I DOKTORATËS

Mentori:

Prof. Dr. Tahir Arbneshi

Kandidati:

Msc. Arbër Frangu

PRISHTINË, 2022

UNIVERSITY OF PRISHTINA
“HASAN PRISHTINA”
FACULTY OF MATHEMATICAL AND NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



**TYROSINASE BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR
DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS**

DOCTORAL THESIS

Mentor:
Prof. Dr. Tahir Arbneshi

Candidate:
Msc. Arbër Frangu

PRISHTINA, 2022

DEKLARATË E AUTORËSISË

Unë Arbër Frangu kandidat/e i/e studimeve të nivelit Doktoratë në drejtimin Kimi me nr. të ID: 160242300008 në Fakultetin e Shkencave Matematike Natyrore të Universitetit të Prishtinës "Hasan Prishtina" deklaroj se dorëshkrimi i dorëzuar është puna ime origjinale përpos ku është cekur ndryshe.

Me anë të kësaj deklarate vërtetoj se kjo tezë hulumtimi apo ndonjë pjesë e tij nuk është paraqitur më parë për arritjen e ndonjë shkalle ose ndonjë kualifikimi tjetër në Universitetin e Prishtinës

Unë kam treguar qartë praninë e të gjitha materialeve të shfrytëzuara dhe kam cituar burimet, duke përfshirë çdo diagram, foto, grafik ose tabelë.

Prishtinë, më _____

Kandidati:.....Arbër Frangu.....

Nënshkrimi:

1. Lexo me emrin e Zotit tënd, i cili krijoi (çdo gjë).
2. Krijoi njeriun prej një gjaku të ngjizur (në mitrën e nënës).
3. Lexo! Se Zoti yt është më bujari!
4. Ai që e mësoi (njeriun) të shkruaj me pendë.
5. Ia mësoi njeriut atë që nuk e dinte.

El 'Alak [1:5]

Falënderime

Të gjitha falënderimet i takojnë Zotit të Botëve që më dhuroj dije, qëndrueshmëri mbështetjen, përkrahjen e vazhdueshme të familjes sime dhe besimin e njerëzve gjatë gjithë kohës së studimeve.

Në përmbyllje të këtij aktiviteti nuk mundem pa e shpreh falënderimit tim për të gjithë njerëzit që ishin pran meje gjatë gjithë kësaj kohe.

Ndjej kënaqësi dhe obligim të falënderoj mentorin tim Prof. Dr. Tahir Arbneshti për përkrahjen dhe këshillat e tij, ku falë angazhimit e tij është arritur që kjo temë të punohet në njërin prej Universiteteve më cilësore në Evropë në fushën e elektrokimisë, atë të Pardubices në Republikën Çeke. Falënderim tejet i veçant i dedikohet Ing. Milan Sýs, Ph.D. hulumtues shkencor nga Universiteti i Pardubices, i cili ka qëndruar mbas çdo aktiviteti tim me këshilla, udhëzime e sidomos në aspektin e punës kërkimore dhe hulumtuese laboratorike, pjesë e kësaj pune ka qenë edhe Ing. Radovan Metelka, Ph.D. profesor në Departamentin e Kimisë Analitike po ashtu nga i njëjti Universitet që ndjej kënaqësi të shprehi falënderimin tim për të.

Falënderim për të gjithë mësimdhënësit, profesorët, dhe asistentët nga të gjitha nivelet e studimeve të cilët ishin krahë meje me këshilla, udhëzime duke ofruar njohuri dhe shkathtësi të shumëta shkencore.

Shoqëria e cila ka qenë pjesë e veçantë dhe e pazëvendësueshme.

Për fund por më të rëndësishmit nga thellësia e shpirtit i falënderoj ata që qëndruan pas meja nga momenti i lindjes, ata që më mbështeten në çdo hap të jetës, përkrahën ambiciet e mija dhe kanë qenë përkrahja më e madhe morale dhe fizike, është kjo familja ime.

Ju faleminderit

Arbër FRANGU

Përmbajtja

| | |
|--|----|
| Lista e tabelave..... | 7 |
| Lista e figurave..... | 8 |
| REZYME | 11 |
| SUMMARY..... | 13 |
| PJESA TEORIKE | 15 |
| 1. KOMPONIMET FENOLIKE..... | 16 |
| 1.1 <u>Paracetamoli</u> | 19 |
| 1.1.1 Shembuj të biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit..... | 20 |
| 1.2 Polifenolet..... | 23 |
| <i>Metodat analitike për përcaktimin e polifenoleve (kapacitetit antioksidues)</i> | 24 |
| 1.3 Tirozinaza..... | 26 |
| 2. SENSORËT..... | 28 |
| 2.1. Sensorët kimikë..... | 28 |
| 2.2. Sensorët elektrokimik..... | 30 |
| 2.3 Biosensorët elektrokimikë..... | 32 |
| 2.4. Voltametria dhe amperometria..... | 34 |
| 2.4.1 Voltametria ciklike | 36 |
| 2.4.2 Amperometria hidrodinamike | 38 |
| 2.4.3. Amperometria te sistemet në rrjedhje FIA (Flow Injection Analysis) | 38 |
| 2.2.4. Elektrodat..... | 40 |
| 2.2.5. Nanomaterialet nga karboni..... | 43 |
| PJESA EKSPERIMENTALE | 45 |
| 3. MATERIALI DHE METODAT | 46 |
| 3.1 Reagjentët kimik..... | 46 |
| 3.2 Llojet e elektrodave të përdorura..... | 46 |
| 3.3 Përgatitja e biosensorëve elektrokimik..... | 49 |
| 3.4 Aparatuara e përdorur..... | 51 |
| 3.5 Përgatitja e mostrave për analizë..... | 53 |
| 3.6 Procedura e punës dhe metodat e studimit | 55 |
| 3.6.1 Metodat referente për analizimin e mostrave reale..... | 56 |
| 4. REZULTATET DHE DISKUTIMET | 57 |

| | |
|--|------------|
| 4.1. Karakterizimi elektrokimik dhe performanca analitike e biosensorit elektrokimik bazuar në elektrodat e printuar për përcaktimin e paracetamolit | 57 |
| 4.1.1 Efekti i shpejtësisë së rrjedhjes në sistemin me analizë në rrjedhje | 61 |
| 4.1.2 Efekti i potencialit operues | 62 |
| 6.1.3 Efekti i vlerës pH | 64 |
| 6.1.4 Përformanca e sistemit..... | 65 |
| 6.1.5 Analiza e tabletave farmaceutike dhe urinës | 71 |
| 4.2. Karakterizimi elektrokimik dhe performanca analitike e biosensorit elektrokimik bazuar në elektrodat e pastë karboni për përcaktimin e polifenoleve..... | 74 |
| 4.2.1 Konstruktimi i biosensorit | 74 |
| 4.2.3 Karakteristikat e biosensorit | 75 |
| 6.2.4 Aktiviteti i tirozinazës kundrejt Troloksit..... | 76 |
| 4.2.4 Efekti i shpejtësisë së përzierjes dhe vlerës pH..... | 77 |
| 4.2.5 Efekti i potencialit operues | 77 |
| 4.2.6 Analiza e frutave..... | 78 |
| 4.3 Përcaktimi i kapacitetit total antioksidues ekuivalent me troloksin në mostrat e çokolletës duke përdorur elektrodën e diamantit dopuar me bor në sistemin me analizë në rrjedhje | 84 |
| 4.3.1. Voltametria ciklike | 84 |
| 4.3.2 Optimizimi i kushteve në analizën me injektim në rrjedhje | 84 |
| 4.3.3 Validimi i metodës | 88 |
| 4.3.4 Analiza e mostrave të çokolletës | 90 |
| 5. PËRFUNDIMET | 92 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 94 |
| 7. BIOGRAFIA | 103 |
| 8. ANEKS – KONFERENCA, PUBLIKIME DHE MOBILITETE SHKENCORE..... | 104 |
| 8.1__ Publikime shkencore | 104 |
| 8.2__ Konferencat Shkencore | 104 |
| 8.3__ Mobilitete shkencore | 109 |

Lista e tabelave

Tabela 2.1: Principet e shndërrimit dhe teknikat e matjes të sensorëve elektrokimikë

Tabela 4.1. Sjellja elektrokimike e paracetamolit në shëndërrues të ndryshëm amperometrik

Tabela 4.2. Prezantimi dhe krahasimi i disa biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit.

Tabela 4.3. Stabilizimi i sinjalit tek biosensori i ri.

Tabela 4.4 Krahasimi i rezultateve të FIA-s me ato të HPLC për mostrat farmaceutike dhe atë të urinës

Tabela 4.5 Përmbajtja e TEAC dhe AA në fruta të ndryshme

Tabela 4.6. Shqyrtimi i vlerave të TEAC në pulp të frutave përcaktuar nga analizat tjera TEAC (mg për 100 g)

Lista e figurave

Figura 1.1. Struktura e fenolit

Figura 1.2. Shembuj të komponimeve fenolike

Figura 1.3. Struktura kimike e molekulës së paracetamolit

Figura. 1.4. Mekanizmi i propozuar i oksidimit të paracetamolit në formë elektrokimike

Figura 1.5. Struktura e disa polifenoleve të cilat gjenden në bimën të ndryshme

Figura 1.6. Mekanizmi i propozuar i reduktimit të hidrokinonit nga acidi askorbik

Figura 1.7. Forma strukturore e tirozinazës (majtë) dhe pjesa aktive e saj (djathtë)

Figura 1.8. Mekanizmi i oksidimit të hidrokinonit nga tirozinaza

Figure 2.1. Procedimi i sinjalit nga organizmat e gjallë dhe procedimi nga një makinë inteligjente[

Figura 2.2 Paraqitja skematike e një sensori tipik kimik.

Figura 2.3. Parimi i punës së një biosensori elektrokimik

Figura 2.4. Celula elektrokimike me sistemin tri elektroda.

Figura 2.5. Sinjali i ekscitimit potencial-kohë gjatë eksperimentit në voltometri ciklike

Figura 2.6. Karakteristikat e një voltamogrami ciklik

Figura 2.7. Skema e përgjithshme dhe pajisjet e sistemit të analizës me injektim nën rrjedhje për detektim amperometrik

Figura 2.9 Disk elektroda e punës

Figura 2.10. Procesi i përgatitjes së pastës së karbonit dhe vendosja e saj në piston

Figura 2.11. Elektrodat të ndryshme nga karboni: A) Elektroda e printuar në shtresë të hollë, B) Elektroda nga karboni qelqor, C) Elektroda e diamantit e dopuar me bor

Figura 2.12. Disa materiale dhe nanomateriale nga karboni

Figura 3.1 A) Pasta e karbonit e përgatitur dhe B) Procesi i vendosjes së pastës në piston

Figura 3.2 Elektroda e komerciale e printuar e llojit DS-150

Figura 3.3 Elektroda nga karboni qelqor (A), dhe elektroda e diamantit e dopuar me bor (B)

Figura 3.4 Procesi i modifikimit të elektrodës së punës të tipit DS-150

Figura 3.5. Pamja e elektrodave të punës gjatë procesit të modifikimit. A) elektroda e printuar, B) elektroda pastë karboni

Figura 3.6 . Potenciostati/galvanostatin AUTOLAB medel PGSTAT 101

Figura 3.7 . (A) Celula elektrokimike nga DropSens, dhe (B) celula elektrokimike Inventek Sp. z o.o

Figura 3.8 Mikroskopin me skanim elektronik (SEM) JEOL JSM7500F

Figura 3.9. Ekstrakte e frutave pas procesit të filtrimit

Figura 3.10. Procesi i filtrimit për tretësirën e çokollatës

Figura 4.1 Voltamogrami ciklik i APAP me përqendrim $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ të elektroda e pamodifikuar SPCE(vija plotë), SPCE/MWCNT (vija e ndërprerë), dhe SPCE/NFG(vija me pika) realizuar në pufferin fosfat $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0, shpejtësi të skanimit $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Figura 4.2. Voltamogrami ciklik i APAP me përqendrim $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ të elektroda e modifikuar me grafen (vija e ndërprerë), dhe elektroda e modifikuar me grafen dhe tirozinazë(vija me pika) realizuar në pufferin fosfat $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0, shpejtësi të skanimit $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Figura 4.3 Efekti katalitik dhe oksidimi i paracetamolit nga tirozinaza.

Figura 4.4. Efekti i shpejtësisë së rrjedhjes

Figura 4.5 Efekti i potencialit operues. Elektroliti mbështetës pufferi fosfat 0.1, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Figura 4.6 Amperogramet e fituara në systemin FIA gjatë pesë injektiveve të tretësirës së holluar të urines(zi) dhe tretësirës cila përmban $50\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$ APAP (kuq), në potencialle të ndryshme të punës. Elektroliti mbështetës pufferi fosfat 0.1, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Figura 4.7 Sinjali amperometrik për urinën e pastër (kaltër) dhe urinën me $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ paracetamol (verdhë). Elektroliti mbështetës pufferi fosfat 0.1M, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Figura 4.8 Sinjali amperometrik gjatë shtimit të paracetamolit në përqendrime të ndryshme, në potencial operues 0 V. Elektroliti mbështetës pufferi fosfat 0.1, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Figura 4.9 Sinjali amperometrik gjatë shtimit të paracetamolit në përqendrime të ndryshme, në potencial operues -0.15 V. Elektroliti mbështetës pufferi fosfat $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Figura 4.10. Procesi i stabilizimit të elektrodës gjatë largimit të enzimës së pa inkorporuar.

Figura 4.11 Amperogram i fituar në sistemin FIA si rezultat i injektimit të tretësirës së paracetamolit me përqendrime të ndryshme në potencial -0.15 V. Elektroliti mbështetës pufferi fosfat $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100\text{ }\mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C

Figura 4.12 Jetëgjatësia e biosensorit

Figura 4.13. Kromatogrami i fituar gjatë analizës së mostrës së urinës së pastër me HPLC(vija e plotë) dhe urinës që përmban $50\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ paracetamol (vija e ndërprerë). Është përdorur kolona Ascentis Express C18 (150 mm x 3.0 mm, $2.7\text{ }\mu\text{m}$). Gjatësia valore e detektimit ka qenë 243 nm. Ndarja është realizuar duke përdorur fazën mobile e përbërë nga 0.3% acid formik në ujë (A) dhe metanol (B) me program të gradientit nga 20% deri në 40% B për 10 min në temperaturë konstante 30°C . Shpejtësia e rrjedhjes ka qenë 0.5 mL min^{-1} , vëllimi i injektimit $5\text{ }\mu\text{L}$.

Figura 4.14 Fotografitë e fituara nga SEM për elektrodën e pastër (A) dhe elektrodën e modifikuar me nanotuba të karbonit (B)

Figura 4.15 Efekti i sasisë së natotubave të karbonit të disperguara në DMF në piket e rrymave anodike (E_p^a) dhe atyre katodike (E_p^c) në përqendrimin e Troloksit $5\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ tek elektroda pastër karboni, elektroliti mbështetës pufferi fosfat 0.1 mol L^{-1} (pH 7.0), shpejtësia e skanimit 0.05 V s^{-1} .

Figura 4.16 Voltamogramet ciklike ($n = 10$) të përsërituara në përqendrimet e Troloksit $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ të fituara në elektrodën e pastër (A) dhe voltamogramet ciklike për Troloksin me përqendrim 500

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ në elektrodën e pa modifikuar CPE (vija e zezë), CPE/MWCNTs (vija e kaltërt) dhe CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® (vija e kuqe) (B), në puferin fosfat $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.0, $E_{\text{filllestare}} = 0 \text{ V}$, $E_{\text{vertex1}} = -0.5 \text{ V}$, $E_{\text{vertex2}} = +1.3 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Figura 4.17 Spektri ultraviolet i tirozinazës me përqendrim $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (lakorja e zezë) dhe $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ duke përdorur puferin fosfat $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.0 për 0 (lakorja e kuqe), 10 (lakorja kaltër), 20 (lakorja e gjelbër), dhe 30 min (lakorja e verdh).

Figura 4.18 Efekti i potencialit operues kur është përdorur CPE/MWCNTs (a), dhe CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® (b). Analiti $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Troloks; elektroliti mbështetës puferi fosfat $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0; shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

Figura 4.19 Analiza e TEAC duke përdorur metodën e shtimit të standardit me anë të biosensorit CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® në potencialin operues -0.25 V , shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

Figura 4.20 Amperogram tipik i fituar duke përdorur biosensorin elektrokimik CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® gjatë shtimit individual të Troloksit me përqendrim $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Elektroliti mbështetës puferi fosfat $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0; shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

Figura 4.21. Krahasimi i biosensorit elektrokimik me metodat tjera analitike (A) DPPH, (B) ORAC, (C) FRAP, (D) TRAP për analizën e TEAC në pulp të dredhëzës (Dre), manaferrave (Man), mjedrës (Mjed), boronicës (Bor) dhe boronicës së kuqe (Bkuqe).

Figura 4.22. Voltamogramet ciklike të përsëritura (5 cikle) 1 mmol L^{-1} të: Troloks (A), vanilinë (B), dhe theobrominë (C) regjistruar tek BDDE në 0.1 mol L^{-1} PB (pH 7.0), shpejtësi të skanimit prej 50 mV s^{-1} . Lakoret e zeza (blank) tregojnë që matja është bërë në pufer të pastër.

Figura 4.23. Ndjeshmëria në raport me shpejtësinë e rrjedhjes (A) dhe ndryshmi në intensitetin e rrymës kur është përdorur shpejtësia e rrjedhjes $0.2 \text{ mL}/\text{min}$ (B₁) dhe $1 \text{ mL}/\text{min}$ (B₂), potenciali operues $+1.3 \text{ V}$, gjatë shtimit të troloksit me përqendrim 50 ppm, bartës puferi fosfat pH = 7.0.

Figura 4.24. Varësia e intensitetit të rrymës ndaj ndryshimit të potencialit operues, BDDE si elektrodë e punës, pufer fosfat (pH 7.0), shpejtësi e rrjedhjes $1 \text{ mL}/\text{min}$, duke përdorur trolaksin me përqendrim 50ppm(A) dhe mostrën e çokollatës(B), lakorja me ngjyrë të kuqe paraqet rrymën bazike.

Figura 4.25. Efekti i metanolit në tretësirat e punës duke përdorur ekstrakt të çokollatës me 80% (ë/ë) kakao. Matjet janë realizuar duke përdorur BDDE në sistemin me analizë në rrjedhje, shpejtësi të rrjedhjes $1 \text{ mL}/\text{min}$ dhe potencial operues $+ 1.3 \text{ V}$. Ngjyra e kaltër e zbehtë tregon rrymën bazë.

Figura 4.26. Amperogram tipik i analizës me injektim në rrjedhje realizuar në BDDE, potenciali operues $+1.3 \text{ V}$, shpejtësia e rrjedhjes $1 \text{ mL}/\text{min}$, pufer fosfat me 30% MeOH (v/v).

Figura 4.27. Amperogrami hidrodinamik në FIA, gjatë matjeve të standardevë të Troloksit dhe mostrave të çokollatave me sasi të ndryshme të kakaos.

Figura 4.28 TEAC i çokollatës së bardhë (0%), me qumësht (30%), dhe asaj të zezë (50-80% kakao; w/w), regjistruar në FIA duke përdoruar BDDE.

REZYME

Komponimet fenolike në përgjithësi janë klasë e gjerë e komponimeve organike me rëndësi mjaftë të madhe. Ato janë molekula organike të cilat në unazën apo unazat aromatike përmbajnë një ose më shumë grupe hidroksile.

Komponimet me përbërje fenolike janë të përhapura shumë në botën e gjallë po ashtu edhe disa prej tyre sintetizohen nga industritë e ndryshme për nevoja të caktuara. Një pjesë e madhe e komponimeve më përmbajtje fenolike marrin pjesë në shumë procese metabolike në trupin tonë. Ato mund të metabolizohen ose të merren në formë të tabletave farmaceutike.

Acetaminofeni, i njohur si paracetamol, është një aminofenoli derivat (N-acetil-p-aminofenoli) me efekte analgjetike dhe antipiretike. Paracetamoli përdoret gjerësisht si zëvendësues i acidit acetilsalicilik dhe fenacetinës.

Përdorimi në doza të mëdha është treguar të jetë shumë i dëmshëm për shëndetin. Pjesa më e madhe e substancës aktive ekstrahohet nga trupi në formë të metaboliteve jo toksike në urinë (40-60% si glukuronat, 30% si sulfate), dhe 2% në formë të pandryshuar. Këto paraqesin fakte të rëndësishme për përcaktimin e paracetamolit në analiza klinike.

Polifenolet janë klasë e madhe e komponimeve kimike të cilat gjenden në shumë bimë, këto komponime kanë tërhequr vëmendjen për shkak të mirave shëndetësore që i posedojnë. Janë të njohura më shumë se 8000 komponime të cilat janë izoluar dhe përshkruar. Polifenolet mund të ndahen në tri grupe kryesore, flavonoidet, acidet fenolike dhe sibenoidet. Polifenolet janë antioksidant potent, ata janë në gjendje të neutralizojnë radikalet e lira. Radikalet e lira janë specie kimike të cilat kanë së paku nga një elektron të pa çiftëzuar dhe në këtë gjendje janë shumë reaktive duke shkaktuar reaksione detyruese në organizëm reaksione të cilat bëjnë çrregullimin e shumë proceseve metabolike. Dëmtimet mund të jenë edhe në qeliza, proteina, etj.

Komponimet fenolike të ngjashme me paracetomolin mund të oksidohen duke përdorur metodat elektrokimike. Forma e zhvillimit të reaksionit kimik të këto komponime varet shumë nga natyra e sipërfaqes së elektrodës. Në përgjithësi shpejtësia e transferimit të elektroneve është e ngadalshme dhe sinjali elektrokimik në përqendrimet të vogla është vështirë ose i pamundur të matet, që çon në zhvillimin e disa metodave të reja rreth modifikimit të sipërfaqeve të ndryshme të elektrodave.

Synimi i hulumtimit tonë ka qenë zhvillimi i sensorëve dhe biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e komponimeve me përbërje fenolike duke vënë theks të veçantë ato për destinim farmaceutik.

Metodat elektrokimike, si voltametria ciklike dhe amperometria hidrodinamike janë përdorur për zhvillimin e sensorëve në fjalë, konkretisht për të hulumtuar sipërfaqet e elektrodave, mekanizmin e reaksioneve redokse, efektet e modifikuesëve, performacën e sistemeve analitike të zhvilluar etj.

Në këtë temë të doktoratës janë arritur të zhvillohen sensor dhe biosensor amperometrik për përcaktimin e komponimeve me përmbajtje fenolike duke vënë theks te veçante ato për destinim farmaceutik. Zhvillimi i sensorëve dhe biosensorëve është arritur duke përdor

materialet nga elektrodave të pastra të karbonit ose duke i modifikuar ato. Modifikimet janë realizuar duke përdorur teknika shumë komplekse dhe interesante me çka është arritur të rritet sinjali analitik dhe mundësia e operimit në potenciale ku interferencat janë minimale. Kjo më pas ka mundësuar të analizohen edhe mostra fiziologjike të cilat përmbajnë matriks mjaft kompleks. Sa i përket elektrodave të punës janë përdorur kryesisht materiale nga karboni si: karbon qelqor, pastë e grafitit, diamant i dopur me bor dhe elektroda të printuara të karbonit. Ndërsa si modifikues është përdorur grafeni, nanotuba të karbonit si dhe enzime (tirozinazë).

Rezultatet e fituara kanë treguar që biosensori elektrokimik që bazohet në përdorimin e elektrodave të printuara të karbonit të llojit DS-150, modifikuar me grafen dhe tirozinazë është shumë efektiv në përcaktimin e paracetamolit në tabletat farmaceutike dhe gjithashtu në mostrat fiziologjike të cilat janë mjaftë komplekse siç është urina, ku përcaktimet janë shpesh herë të vështira. Kështu biosensori në fjalë ka arritur të operojë në potencial 0.00 V, rend linear deri në $130 \mu\text{mol L}^{-1}$, limit të përcaktimit $1.1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Me këtë kontribut gjithashtu është demonstruar sjellja biosensorit amperometrik në analizën e frutave të ndryshme të malit, i përbërë nga pasta e karbonit dhe modifikuar me nanotuba të karbonit dhe tirozinazë. Pas disa hapave të optimizimit është realizuar përcaktimi i sasive totale antioksiduese ekuivalent me Troloksin (TEAC) në dredhëza, manaferra, mjedër, boronicë dhe boronicë e kuqe.

Elektroda e diamantit e dopuar me bor e integruar në sistemin FIA ka treguar të jetë efikase në përcaktimin e sasive totale antioksiduese ekuivalent me Troloksin gjatë analizës së mostrave të çokolatës duke paraqitur një pajisje të thjeshtë analitike për përcaktimin e kualitetit të çokollatës, veçanërisht në përcaktimin e përmbajtjes së kakaos (w/w).

Metodat e zhvilluara janë krahasuar me metoda tjera standarde dhe kanë treguar korrelacion të mirë sa i përket rezultateve gjatë matjeve në mostra reale ose standarde.

SUMMARY

Phenolic compounds in general are a broad class of organic compounds of great importance. They are organic molecules that contain one or more hydroxyl groups in the aromatic ring or rings.

Compounds with phenolic composition are widespread in the living world, and some of them are also synthesized by various industries for specific needs. A large part of phenolic compounds participates in many metabolic processes in our body. They can be metabolized or taken in the form of pharmaceutical tablets.

Acetaminophen, known as paracetamol, is an aminophenol derivative (N-acetyl-p-aminophenol) with analgesic and antipyretic effects. Paracetamol is widely used as a substitute for acetylsalicylic acid and phenacetin.

The use in large doses has been shown to be very harmful to health. Most of the active substance is extracted from the body in the form of non-toxic metabolites in the urine (40-60% as glucuronate, 30% as sulfate), and 2% in unchanged form. These present essential facts for the determination of paracetamol in clinical analyses.

Polyphenols are a large class of chemical compounds found in many plants; these compounds have attracted attention due to the health benefits they possess. More than 8000 compounds are known which have been isolated and described. Polyphenols can be divided into three main groups, flavonoids, phenolic acids, and sibenoids. Polyphenols are potent antioxidants; they are able to neutralize free radicals. Free radicals are chemical species that have at least one unpaired electron and in this state are very reactive, causing secondary reactions in the body, reactions that disrupt many metabolic processes. Damage can also be in cells, proteins, etc.

Phenolic compounds similar to paracetamol can be oxidized using electrochemical methods. The form of development of the chemical reaction in these compounds depends greatly on the nature of the electrode surface. In general, the rate of electron transfer is slow and the electrochemical signal at low concentrations is difficult or impossible to measure, which leads to the development of several new methods around the modification of various electrode surfaces.

The goal of our research has been the development of electrochemical sensors and biosensors for the determination of compounds with phenolic composition, with particular emphasis on those for pharmaceutical use.

Electrochemical methods, such as cyclic voltammetry and hydrodynamic amperometry, have been used to develop the mentioned sensors, specifically to investigate electrode surfaces, the mechanism of redox reactions, the effects of modifiers, the performance of developed analytical systems, etc.

In this Ph.D. topic, amperometric sensors and biosensors have been developed for the determination of compounds with phenolic content, with particular emphasis on those for pharmaceutical use. The development of sensors and biosensors has been achieved using materials from pure carbon electrodes or by modifying them. The modifications were carried out using very complex and interesting techniques, with which it was possible to increase the analytical signal and the possibility of operating at potentials where the interferences are minimal. This has made it possible to analyze even physiological samples which contain a quite

complex matrix. As for working electrodes, mainly carbon materials were used, such as glassy carbon, graphite paste, boron-doped diamond, and printed carbon electrodes. While graphene, carbon nanotubes, and enzyme (tyrosinase) were used as modifiers.

The obtained results have shown that the electrochemical biosensor based on the use of DS-150 printed carbon electrodes modified with graphene and tyrosinase is very effective in the determination of paracetamol in pharmaceutical tablets and also in physiological samples which are quite complex such as it is urine, where determinations are often difficult. Thus, the biosensor in question has managed to operate at a potential of 0.00 V, linear order up to 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the limit of determination 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

With this contribution, the behavior of the amperometric biosensor in the analysis of different mountain fruits, made up of carbon paste and modified with carbon nanotubes and tyrosinase, has been demonstrated. After several steps of optimization, the determination of total antioxidant amounts equivalent to Trolox (TEAC) in strawberry, blackberry, raspberry, blueberry, and cranberry was carried out.

The boron-doped diamond electrode integrated into the FIA system has been shown to be efficient in the determination of total antioxidant amounts equivalent to Trolox during the analysis of chocolate samples presenting a simple analytical device for the determination of chocolate quality, especially in the determination of cocoa content (w/w).

The developed methods have been compared with other standard methods and have shown a good correlation in terms of results during measurements on real or standard samples.

PJESA TEORIKE

1. KOMPONIMET FENOLIKE

Komponimet fenolike janë klasë e gjerë e komponimeve organike të cilat përmbajnë një ose më shumë grupe hidroksilike (-OH) të lidhura direkt në unazën aromatike. Anëtari më i thjeshtë përfaqësues i komponimeve fenolike është fenoli me formulë kimike C_6H_5OH . Emri sistematik për C_6H_5OH është benzenol, mirëpo emërtimi fenol për këtë komponim është pranuar sipas nomenklaturës IUPAC, ndërsa komponimet që rrjedhin nga zëvendësimi i mëtejshëm në unazën benzenike njihen si derivate të fenolit [1].

Të gjitha atomet e karbonit të cilat formojnë unazën aromatike kanë hibridizim sp^2 . Prandaj, fenoli ka strukturë heksagonale planare, ku të gjitha lidhjet kanë këndë prej 120° me elektrome π të shpërndara të tërë unazën aromatike. Lidhja C-O formohet nga orbitalet $Csp^2 - Osp^2$ ndërsa lidhja O-H formohet nga orbitalet $Osp^3 - Hsp^1$. Dy orbitalet tjera të atomit të oksigjenit janë të okupuara nga dy çiftet elektronike jo lidhëse. Për këtë arsyeje, grupi funksional hidroksil C-O-H ka formë të përkulur me kënd të lidhjes 109.5° siç është paraqitur në Figurën 1.1. Oksigjeni është më elektronegativ se sa atomet e karbonit dhe hidrogjenit, me çka bënë që dy lidhjet C-O dhe O-H të janë polare [2].

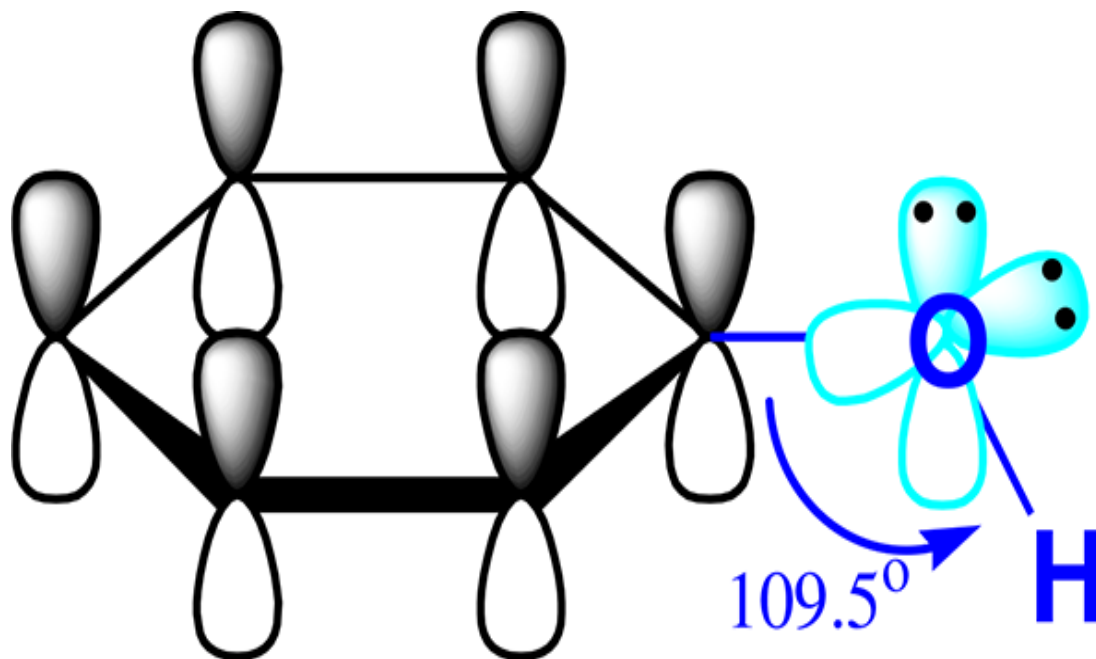


Figura 1.1. Struktura e fenolit [4]

Për më tepër çiftet elektronike të atomit të oksigjenit janë të konjuguara me sistemin e unazës aromatike duke shkaktuar transferimin e ngarkesës parçiale negative nga atomi i oksigjenit brenda në unazë, dhe delokalizmin e ngarkesës. Ky efekt ndikon që të grupi O-H të ketë polaritet më të madh, e që si pasojë kemi rritjen e karakterit acidik të fenolit duke mundësuar më pas formimin e joneve fenokside (fenolateve) [2, 3]. Këto karakteristika të përmendura i japin fenolit veti specifike kimike dhe fizike. Në Figurën 1.2 janë paraqitur disa shembuj të komponimeve fenolike.

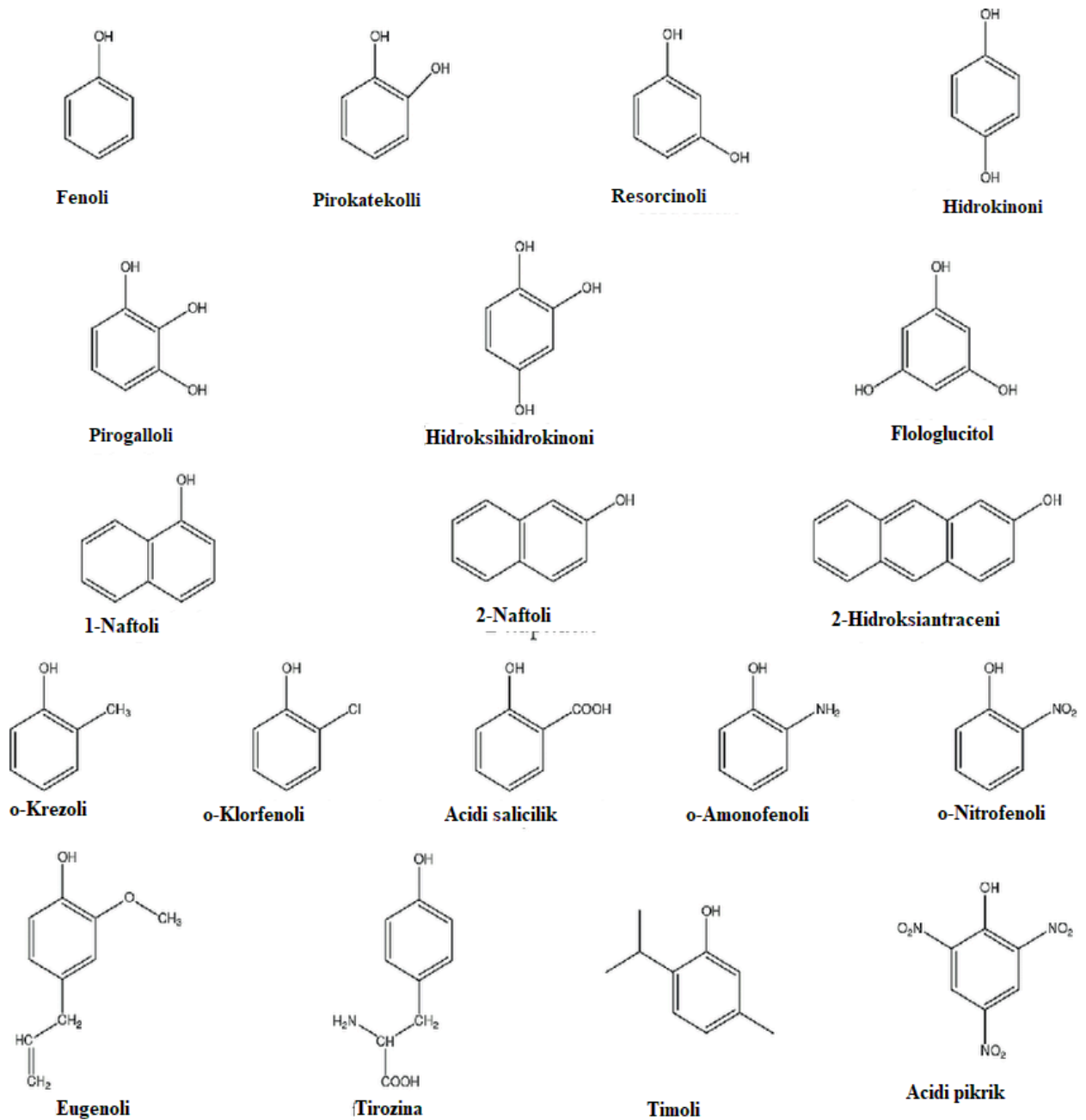
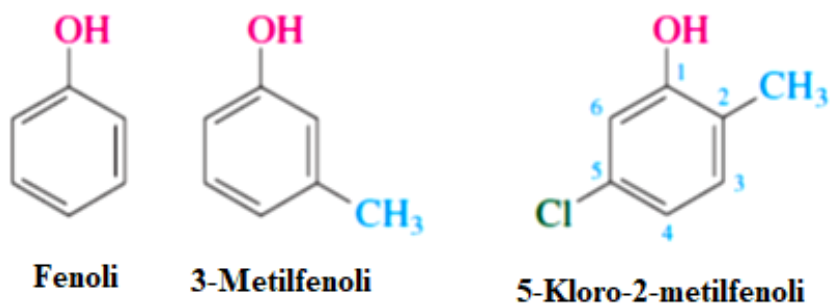
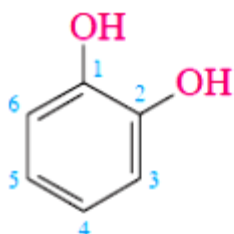


Figura 1.2. Shembuj të komponimeve fenolike [4]

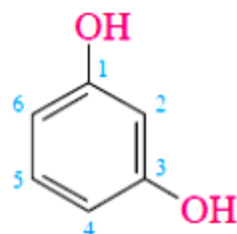
Emërtimi i derivateve të fenolit bëhet në atë mënyrë që numërimi në unazën aromatike fillon nga karboni që lidh grupin hidroksil në drejtim të karbonit të zëvendësuar më të afërt me karbonin që lidh grupin hidroksil [1].



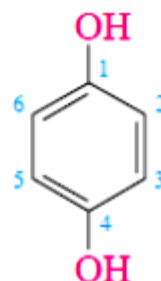
Përveç emrave sipas nomenklaturës IUPAC, për emërtimin e një numri të konsiderueshëm të komponimeve fenolike përdoren edhe emrat trivialë të tyre siç është rasti me 1,2-benzendioli, 1,3-benzendioli dhe 1,4-benzendioli, të cilët njihen me emrat si pyrokatekol ose katekol, rezorcinoli dhe hidrokinoni.



**1,2-Benzendioli
(Katekoll)**

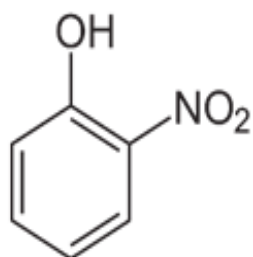


**1,3-Benzendioli
(Resorcinoli)**

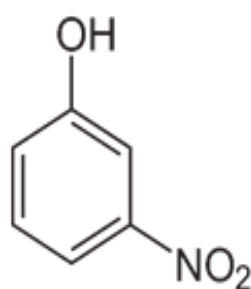


**1,4-Benzendioli
(Hidrokinoni)**

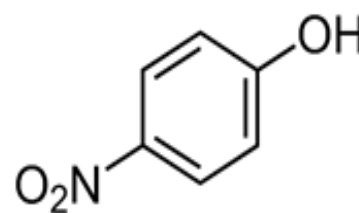
Po ashtu për të treguar pozicionin e zëvendësuar në unazën benzenike shpesh përdoren edhe parashtesat orto-, meta- dhe para- (o-, m-, p-) për pozicionet 2, 3 dhe 4 ndaj karbonit, i cili lidh grupin hidroksil [1, 5].



o-Nitrofenoli



m-Nitrofenoli



p-Nitrofenoli

Në varësi të numrit të grupeve hidroksilike, fenolet mund të klasifikohen si monohidroksilike, dihidroksilike, trihidroksilike dhe polihidroksilike [6].

1.1 Paracetamoli

Që nga kohët e lashta komponimet fenolike natyrale janë përdorur si ngjyrues dhe në mjekësinë tradicionale. Shumë komponime të tilla, natyrale ose jo natyrale, janë evidentuar si ilaçe për trajtimin e kancerit, infeksioneve virusale, astmës, dhe sëmundjeve që janë të lidhura me sistemin nervor [7].

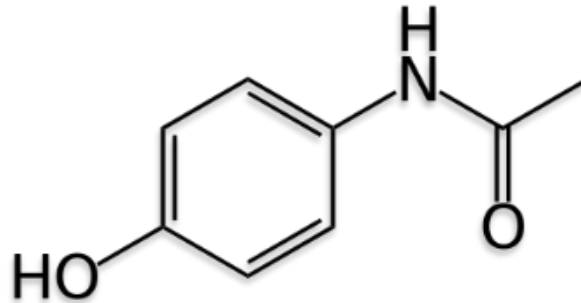


Figura 1.3. Struktura kimike e molekulës së paracetamolit [8].

Acetaminofeni (APAP), i njohur si paracetamol, është një derivat aminofenoli (N-acetil-p-aminofenoli) me efekte analgjetike dhe antipiretike. Paracetamoli përdoret gjerësisht si zëvendësues i acidit acetilsalicilik dhe fenacetinës. Për shkak të çmimit shumë të ulët ky medikament gjen përdorim të gjerë, shpeshherë edhe në mënyrë të pakontrolluar [9-10].

Zakonisht doza për të rritur është një ose dy tableta nga 500 mg deri në pesë herë në 24 orë. Për fëmijë doza maksimale për 8 orë është 500 mg. Edhe përkundër dozës së rekomanduar, ekziston rrezik serioz i helmimit që shkakton dëmtim akut të mëlçisë deri në 42% , më shumë se 300,000 të hospitalizuar për vit. Përdorimi në doza të mëdha është treguar të jetë shumë i dëmshëm për shëndetin. Pjesa më e madhe e substancës aktive ekstrahohet nga trupi në formë të metaboliteve jo toksike në urinë (40-60% si glukuronat, 30% si sulfate), dhe 2% në formë të pandryshuar. Këto paraqesin fakte të rëndësishme për përcaktimin e paracetamolit në analiza klinike [10-12].

Është konfirmuar se APAP në mënyrë reversibile oksidohet në N-acetil-p-benzokinon-iminë (NAPBQI) me participimin e dy elektroneve dhe dy protoneve, siç shihet në figurën 1.3[13-15].

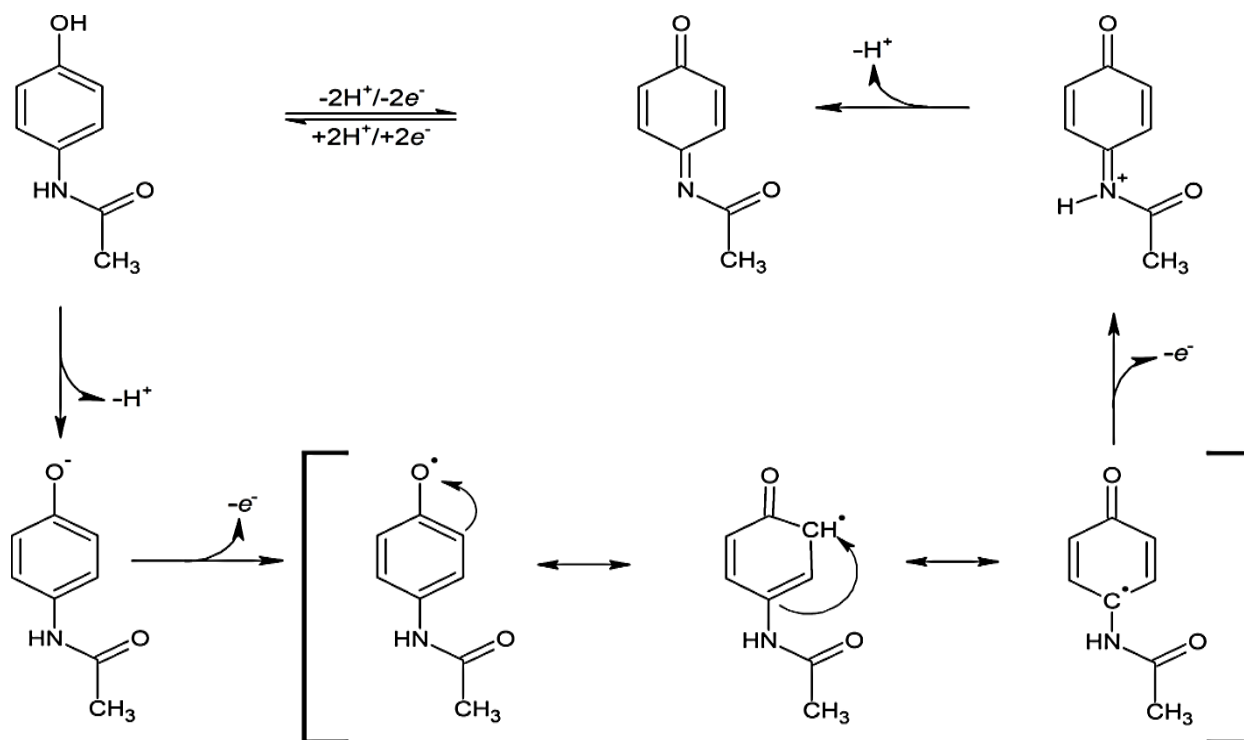


Figura. 1.4. Mekanizmi i propozuar i oksidimit te paracetamolit në formë elektrokimike [13].

Komponimet e ngjashme me paracetamoln mund të oksidohen duke përdorur metodat elektrokimike. Forma e zhvillimit të reaksionit kimik te këto komponime varet shumë nga natyra e sipërfaqes së elektrodës. Në përgjithësi shpejtësia e transferimit të elektroneve është e ngadalshme dhe sinjali elektrokimik në përqendrimet të vogla është vështirë ose i pamundur të matet, që çon në zhvillimin e disa metodave të reja rreth modifikimit të sipërfaqeve të elektrodave të ndryshme [15].

1.1.1 Shembuj të biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit

Përcaktimet e sasive antioksiduese totale janë pjesë me e shpeshtë e analizës kimike, dhe përderisa bëhet analizimi i një grupi të madh molekulash, në fruta të ndryshme kryesisht, bënë më të lehtë zhvillimin dhe konstruktimin e biosensorëve për këtë qëllim edhe pse ka sfida në këtë drejtim. Problemi më i madh qëndron në rastet kur kemi të bëjmë me analizimin e mostrave fiziologjike dhe kemi për ta përcaktuar një analit të vetëm në mesin e shumë të tjerëve (mostra shumë komplekse). Një situatë e tillë është më përcaktimin e paracetamolit në urinë që paraqet sfidën kryesore të këtij hulumtimi. Për këtë qëllim është bërë një hulumtim më në detaje rreth biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit në mostra të ndryshme, për të parë sfidat dhe mundësitë e zhvillimit të një biosensorit të kohës i cili do të ketë performancë më të lartë se biosensorët paraprak, por edhe për të mësuar rreth teknikave të modifikimit dhe hulumtimit në përgjithësi. Në këtë pjesë do të prezantohen disa hulumtime që janë realizuar rreth zhvillimeve të biosensorëve të tillë elektrokimik, duke i klasifikuar në bazë të entiteteve biologjike të përdorura (fruta, enzima, bakterie etj.)

Përdorimi i indeve të frutave dhe perimeve

Në vitin 2001 është prezantuar një hulumtim i cili ka të bëjë zhvillimin e një biosensori elektrokimik bazuar në përdorimin e pastës së karbonit me inde të avokados (*Persea americana*) si burim i polifenol oksidazës (PPO) [16]. Sensori i tillë është ndërtuar duke përdorur pastën e karbonit si material bazë e më pas duke e modifikuar me inde të avokados në raport 75% me 15% (w/w) dhe 10% material lidhës (vazelinë). Sensori elektrokimik ka qenë i aftë të operojë

ne pH neutral duke përdorur pufer fosfat. Hulumtimi është zhvilluar duke përdorur tretësirë standarde të paracetamolit me pastërti analitike ose edhe të produkteve farmaceutike të paracetamolit për të dhënë informacione rreth performancës së sensorit dhe krahasuar rezultatet.

Teknika me të cilën është janë zhvilluar matjet kanë qenë kronoamperometria hidrodinamike duke përdorur mënyrën e akumulimit të analitit pranë sipërfaqes së elektrodës me përzierje të vazhdueshme dhe pas ndërprerjes së përzierjes, elektroda është polarizuar në potencial operues $-0.12V$ vs $Ag/AgCl$. Sensori i konstruktuar në mënyrë të tillë ka treguar rezultate të mira në testet për “recovery” në produkte të ndryshme që përmbajnë paracetamolit.

Përveç avokados, bananet, patatet, mollët, arrat e kokosit, kërpudhat, patëllgjani i zi etj., përmbajnë tirozinazë ose enzimë polifenol oksidazë (PPO). PPO katalizojnë dy lloj procese, o-hidroksilimin e monofenoleve në o-difenole dhe oksidimin e tyre në kinone përkatëse. Më tutje do të shtjellohet përdorimi i patëllgjanit të zi dhe i banave si burim i PPO në kuadër të zhvillimit të biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit.

Një biosensor elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit duke përdorur patëllgjanin e zi si burim i PPO [17] është ndërtuar duke bërë përzierjen e pastës së karbonit më ekstrakt të patëllgjanit të zi.

Pasta e tillë është vendosur në piston dhe teknika më të cilën është bërë matja elektrokimike ka qenë voltametria me puls diferencial (DPV) duke e përdorur biosensorin elektrokimik si elektrodë e punës dhe si elektrodë referente $Ag/AgCl$ 3M, ndërsa teli i platinës ka shërbyer si elektrodë ndihmëse. Biosensori ka operuar në pH 6.0 (aktivitet maksimal enzimatik) dhe pH 7.0 (stabilitet maksimal). Rendi linear për sensorin ka qenë 20-200 μM me limit të detektimit 5 μM . Aplikimi i sensorit për përcaktimin e paracetamolit në tableta dhe tretësirat orale ka treguar rezultate të kënaqshme, me vlera të RDS 1.26-1.72 %, ndërsa për “recovery” për paracetamol in ka variruar nga 97.% deri 99.8% për përcaktimet voltametrike.

Kur jemi tek përparësitë e një biosensori elektrokimik faktorë i rëndësishëm është edhe sasia e mostrës që duhet marr për analizë, është shumë me interes që sasia të jetë sa më e vogël. Një biosensor i tillë elektrokimik është paraqitur [18] i cili mund të operojë në nivel të mikrolitrave saktësisht me një mikrolitër. Biosensori i tillë është zhvilluar duke e përdorur si bazë pastën e karbonit e cila është modifikuar me hidrogjel (polimer) dhe inde të bananes. Hidrogjeli është përgatitur duke kombinuar akril amidën dhe acidin akrilik si dhe si lidhës i tyre është shtuar N,N-metilen bisakrilamida, ky lloje hidrogjeli ka pasur rolin e absorbuesit ndërsa indet e bananës kanë shërbyer si burim i PPO. Elektroda e tillë e modifikuar ofron limit të detektimit të ulët (1.6 μM) me rend linear 10-250 μM , riprodhueshmëri të mirë dhe stabilitet në dy mjediset, atë acidik dhe bazik, si dhe jetëgjatësi të madhe të enzimës (20 ditë).

Frutat Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) raportohen që përmbajnë gjithashtu PPO dhe të tillat janë përdorur gjithashtu si burim i komponentës biologjike për të zhvilluar biosensor elektrokimik [19]. Ky sensor është testuar duke përdorur paracetamol in, acidin acetil salicilik, metil dopan dhe acidin askoribik. Performancë më e mirë është arritur në testimet me paracetamol me rend linear 5 deri 245 μM ($R = 0.9994$), limit të detektimit 3 μM dhe rend të përsëritshmërisë në mes 1.52 % dhe 1.74 % (RSD). Gjithashtu edhe kungulleshat iu bashkëngjiten grupit i cili përmban burim të PPO [20].

Përdorimi i enzimave për zhvillimin e biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit

Një mekanizëm tjetër përmes të cilit është arritur të bëhet përcaktimi i paracetamolit është duke e përdorur enzimën aril acilamidazën e cila konverton paracetamol in në 4-aminofenol [21].

Produkti i fituar më pas është oksiduar duke aplikuar potencial +0.25 V në elektrodën e punës vs Ag/AgCl elektrodës referente. Biosenzori i tillë elektrokimik është përdorur për të përcaktuar paracetamolën në plazmën e gjakut. Si problem në përcaktim sipas autorëve është prezenca e tiroleve të cilat mund të lidhen me produktet e oksiduara duke i reduktuar prapë ato, e që të tillat më pas ato arrijë të oksidohen prapë në elektrodë duke gjeneruar sinjal elektrokimik shtesë. Amidaza si enzimë është përdorur edhe si bashkë modifikues me ceriumin dhe dioksidin e grafenit në sipërfaqe që printuara nga nanotubat e karbonit[22].

Lakaza është përdorur për të modifikuar sipërfaqet e elektrodave të paktën dy herë në funksion të zhvillimit të biosensorëve për ta përcaktuar paracetamolën [23-24]. Në rastin e parë pasta e karbonit është modifikuar me lakazë dhe dioksid të titanit. Rezultatet kanë treguar se ky biosensor elektrokimik është shumë i ndjeshëm dhe gjithashtu selektiv për të përcaktuar paracetamolën. Matjet janë zhvilluar duke përdorur voltmetrinë me puls diferencial, rend linear 8 deri 120 μM dhe kufi shumë të ulët të detektimit 1 μM [23].

Në rastin tjetër si material bazë është përdorur elektroda e karbonit qelqor e cila fillimisht është modifikuar me nanotuba të karbonit e në fund me lakazë e cila është lidhur me sipërfaqen e elektrodës duke shtuar glutaraldehyd i cili ka rol lidhës. Sipërfaqja e modifikuar është dhe ajo e pa modifikuar është fotografuar me mikroskop elektronik për të paraqitur dhe argumentuar ndryshimet. Është përdorur Voltmetria ciklike, voltmetria me puls diferencial dhe ajo me valë kuadratike për të zhvilluar matjet analitike. Për dallim nga biosenzori paraprak i fundit ka kufi të detektimit më të lartë 7 μM [24].

Biosensorët tjerë për përcaktimin e paracetamolit

Biosensorët elektrokimik përdorin entitete të ndryshme biologjike duke përfshi edhe bakteriet. *Bacillus spp* është një bakterie e cila përmban polifenol oksidazë, metalproteina të cilat katalizojnë procesin e oksidimit të fenoleve dhe polifenoleve. Përdorimi i një entiteti të tillë në konstruktimin e biosenzorit elektrokimik është paraqitur [25]. Teknika e zhvillimit të këtij biosenzori duket interesante e cila konsiston në përdorimin e elektrodës së arit e cila më pas modifikohet me nanotuba të karbonit shumë shtresor të karboksiluara së bashku me anilinën. Modifikimi është kryer duke bashkuar në një tretësirë të vetme të këto dy substancave dhe duke i depozituar ato në mënyrë elektrokimike në sipërfaqen e elektrodës. Në fund elektroda është modifikuar me bakterie dhe sipërfaqja përfundimisht është mbuluar me glutaraldehyd. Në mekanizmin e propozuar paracetamolit oksidohet në o-kinone korresponduese nga polifenol oksidaza e ndihmar nga shtresa e cila përmban nanotuba shumë shtresor dhe polianilinën (Au/PANI-cMWCNT/*Bacillus sp./GA*) dhe më pas duke u reduktuar elektrikimisht të o-kinoneve, në këtë mënyrë duke formuar cikël amplifikues biokatalitik dhe duke gjeneruar elektrone. Elektronet më pas pranohen nga MWCNT/PANI për ta formuar formën e tyre të reduktuar, më vonë MWCNT/PANI oksidohet duke liruar elektrone e që migrojnë drejt sipërfaqes së arit ku dhe formojnë rrymën apo sinjalin analitik. Rryma e matur ka qenë proporcionale me sasinë e paracetamolit. Biosenzori është testuar në analizat e mostrave reale duke përdorur disa produkte të paracetamolit dhe gjithashtu përgjigjja e sensorit ndaj analitëve tjerë.

Ari është material i rëndësishëm për ndërtimin e biosensorëve elektrokimik. Në sipërfaqen e arit mund të lidhjen molekula të ndryshme (kryesisht tirole ose aminoacide) me lidhje kovalente në mënyrë spontane ose elektrokimike. Me lidhjen e molekulave siç janë aminoacidet formohen kushte të favorshme që të lidhjen edhe makromolekula tjera me theks të veçantë acidet nukleike dhe enzimet. Teknikë e tillë është përdorur për ta parë sjelljen elektrokimike të paracetamolit dhe për ta përcaktuar atë [26]. Biosenzori elektrokimik është zhvilluar në atë mënyrë ku fillimisht elektroda e arit është modifikuar me cistinë dhe në fund është shtuar acidi desoksiribonukleik (ADN). Ky biosensor elektrokimik operon në pufër fosfat, me kufi të detektimit 7.8 μM , rend linear 65-730 μM . Është testuar gjithashtu edhe për interferencat e

mundshme. Në mostrat fiziologjike zakonisht të pranishme i kemi acidin askorbik dhe acidin urik, por që nuk kanë treguar të jenë ndonjë problem në përcaktim.

1.2 Polifenolet

Polifenolet janë klasë e madhe e komponimeve kimike të cilat gjenden në shumë bimë, këto komponime kanë tërhequr vëmendjen për shkak të mirave shëndetësore që i posedojnë [27]. Janë të njohura më shumë se 8000 komponime të cilat janë izoluar dhe përshkruar [28]. Polifenolet mund të ndahen në tri grupe kryesore, flavonoidet acidet fenolike dhe sibenoidet. Flavonoidet janë prej polifenoleve të cilat janë izoluar më së shumti, ato posedojnë dy ose më shumë unaza aromatike ku secila bartë nga një ose më shumë grupe hidrokasilike dhe në mes vete janë të lidhura përmes një urë oksigjeni. Flavonoidet varësisht nga pozita e unazave aromatike ndahen në disa nën klasa të cilat janë quajtur flavone, izoflavone, antoksinidinë, kalkone dhe dihidrokalkone [29, 30].

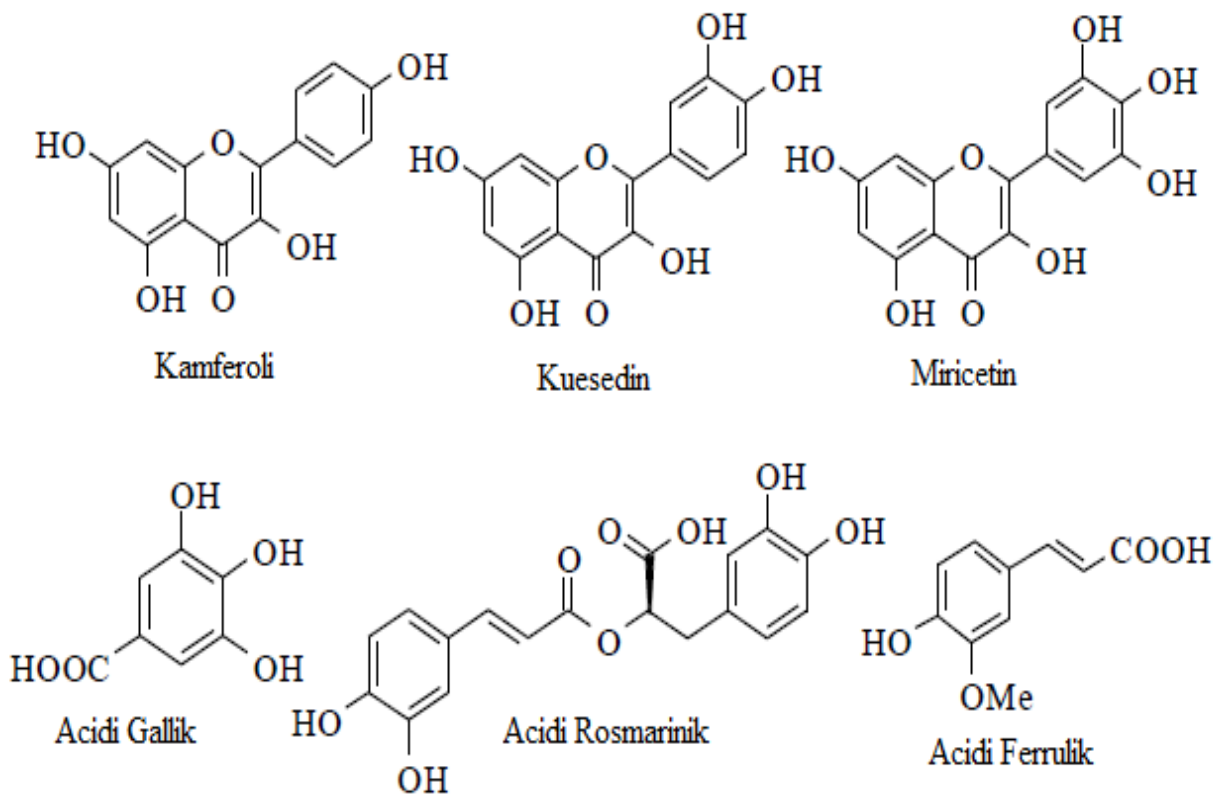


Figura 1.5. Struktura e disa polifenoleve të cilat gjinden në bimën të ndryshme

Acidet fenolike zakonisht ndahen në dy klasa kryesore, nga acidi benzoik që përmban 7 atome të karbonit ose nga acidi cianimik me 9 atome të karbonit [31]. Të gjitha këto komponime janë të hidrosiluara. Të gjitha këto komponime gjenden në bimë të cilat mund të jenë të esterifikuar me glukozë ose karbohidrate tjera. Polifenolet dietike janë të izoluar nga frutat (manaferrat, mollët, agrume, qershi); perime (qepë, selino fasule), barëra, rrënjët, erëza (xhinko, shafran i Indisë); çaj të gjelbër dhe të zi [32]. Dihet se konsumi i ushqimeve të pasura me flavonoide, veçanërisht tek frutat dhe perimet, përkthehet në përfitime për shëndetin e njeriut: Studimet epidemiologjike kanë gjetur se praninë e këtyre komponimeve është e lidhur ngushtë me zvogëlimin e sëmundjeve të zemrës, kancerit, sëmundjeve gastrointestinale dhe neurologjike, alergjitë etj. [28, 31, 33-35].

Polifenolet janë antioksidant potent, ata janë në gjendje të neutralizojnë radikalet e lira. Radikalet e lira janë specie kimike të cilat kanë së paku nga një elektron të pa çiftëzuar dhe në këtë gjendje janë shumë reaktive duke shkaktuar reaksione dytësore në organizëm reaksione të cilat bëjnë çrregullimin e shumë proceseve metabolike. Dëmtimet mund të jenë edhe në qeliza, proteina, etj [29, 36].

Komponimet fenolike kanë demonstruar të jenë antibakteriale, antitoksina, antivirale si dhe gjithashtu të tregojnë aktivitet antifungal. Si përfundim mund të citojmë Halliwell i cili thotë: "Flavonoidet dhe komponimet tjera polifenolike kanë efekt të fuqishëm antioksidativ *in vitro*, por mund të veprojnë si pri-oksiant në disa sisteme tjera. Komponimet fenolike ndihmojnë mbrojtjen e trakti gastrointestinal ndajë dëmtimeve të mundshme nga speciet reaktive që janë prezent në ushqim ose që mund të formohen më vonë në stomak ose zorrë. Përfitimi i përgjithshëm shëndetësor i flavonoids është e pasigurt, dhe konsumimi i sasive të mëdha të tyre në ushqime të pasuruara nuk duhet ende të inkurajohen" [37-41].

Çokolata është një produkt ushqimor nga kakao e cila në përgjithësi klasifikohet në tri grupe: çokolata e zezë, çokolata nga qumështi dhe çokolata e bardhë. [42-44]. Çokolata e zezë përmban zakonisht 50-90% kakao, gjalpë të kakaos sheqer, ndërsa çokolata nga qumështi përmbajnë 10-50 % kakao, gjalpë të kakaos, qumësht në forma të ndryshme dhe sheqer. Çokolata e bardhë nuk përmban sasi të kakaos [44]. Autoritet Çeke të Bujqësisë dhe Ushqimit kanë raportuar se një pjesë e prodhuesve nuk bëjnë deklarin e saktë të sasisë sa kakaos në produktet e çokolatave[45]. Kakao përmban sasi të larta të polifenoleve dhe është e mundur të bëhet përcaktimi i tyre me metoda elektrokimike në kontekstin e analizës së kualitetit të çokolatës dhe kapacitet antioksidues total (TAC)[46-50].

Metodat analitike për përcaktimin e polifenoleve (kapacitetit antioksidues)

Troloksi është një analog sintetik i α -tokoferolit, i njohur si forma më aktive e vitaminës E , i cili përdoret si substancë standarde për krahasimin e aktivitetit antiradikal në ushqim i shprehur si kapaciteti antioksidues ekuivalent me Trolaksin (TEAC) [51]. Tretshmëria e Troloksit në pH neutrale është $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, që është e mjaftueshme për analizat e zakonshme. Për përcaktimin e TEAC disa metoda spektrometrike janë zhvilluar duke u bazuar në vetitë reduktuese nga prezenca e antioksidantëve. Një nga metodat më të shpeshta, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil(DPPH) është e bazuar në radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) [52]. Disa metoda tjera janë përdorur në analizën e frutave, duke përfshirë një radikal oksigjenik me kapacitet absorbues (ORAC) [53], aftësia antioksiduese e reduktimit ferrik (FRAP) [54], dhe bllokimi total radikal i potencialit antioksidues (TRAP) [55]. L-acidi askorbik(AA), i njohur si vitamina C, është i njohur si një komponim kimik jofenolik, i cili gjendet gjithashtu në fruta me kapacitet të lartë antioksidues [56], ku zakonisht gjendet së bashku me polifenolet në gjëra ushqimore. AA ka efekt pengues gjatë matjeve në analizat elektrokimike të polifenoleve për shkak të vetive reduktuese (kinonet reduktohen sërish në polifenole). Efekti interferues i AA në përcaktimin e hidrokinonit (HQ) që ka strukturë të ngjashme me α -tokohidrokinonet [57], i njohur edhe nga studimet paraprake [58].

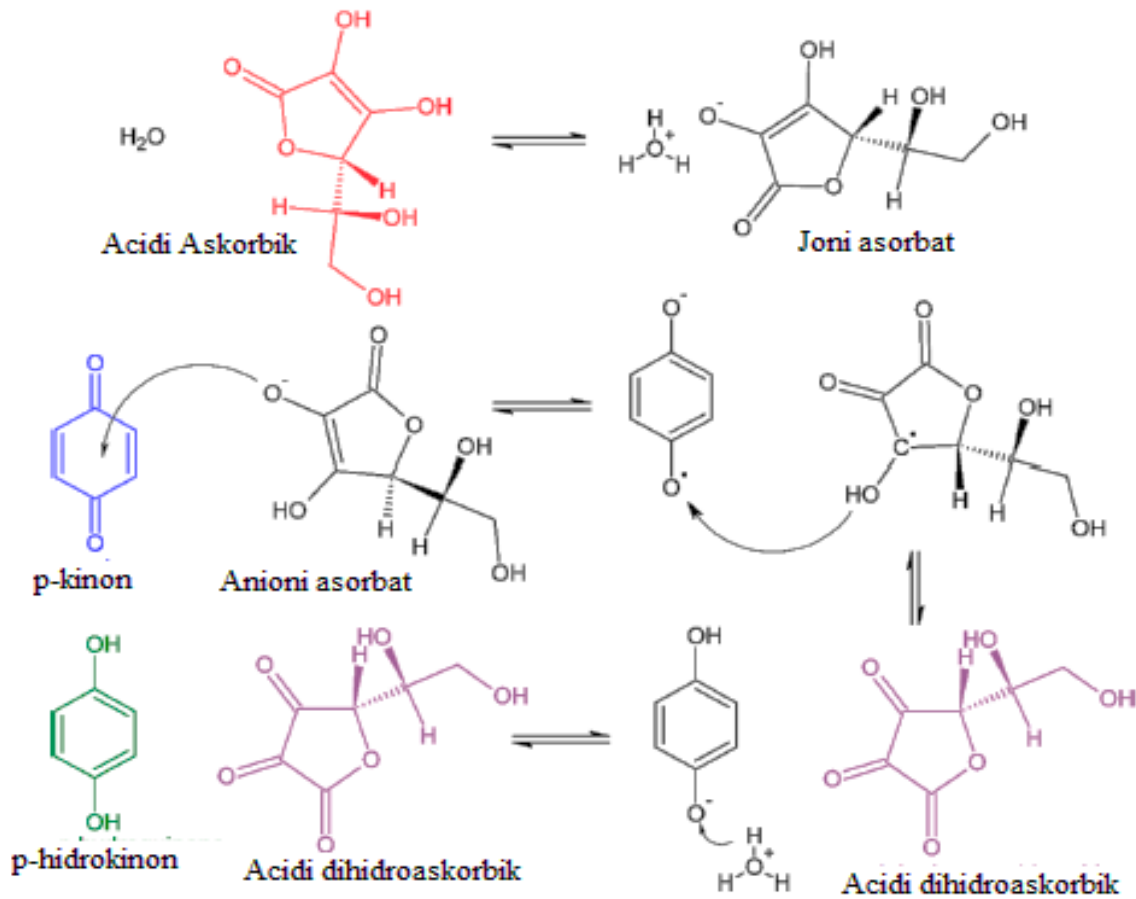


Figura 1.6. Mekanizmi i propozuar i reduktimit të hidrokinonit nga acidi askorbik [49].

Mekanizmi i reduktimit të hidrokinonit nga AA, i propozuar nga ISAACS dhe ELDIC është paraqitur në figurën 1.6 [58], Sidoqoftë më herët është gjetur se prezenca e AA nuk interferon në raportin molar të AA me HQ 1:1, në rastet e biosensorëve amperometrik bazuar në elektrodë pastë karboni modifikuar me tirozinazë (TYR) [59].

1.3 Tirozinaza

Tirozinaza është një glikoprotein cila përmban bakër me masë 75 kD, e njohur si molekula T4. I përket familjes së proteinave që kanë qendër katalitike të formuar nga dy bërthama bakër lloji-3. Kjo enzimë katalizon hidrosilimin e monofenoleve në pozitat orto dhe rrjedhimisht oksidimin e difenoleve në kinone përkatëse[60]. Këto reaksione ndodhinë në prani të oksigjenit i cili reduktohet në ujë. Kinonet si produkte janë prekursor reaktiv për sintezën e melaninës.

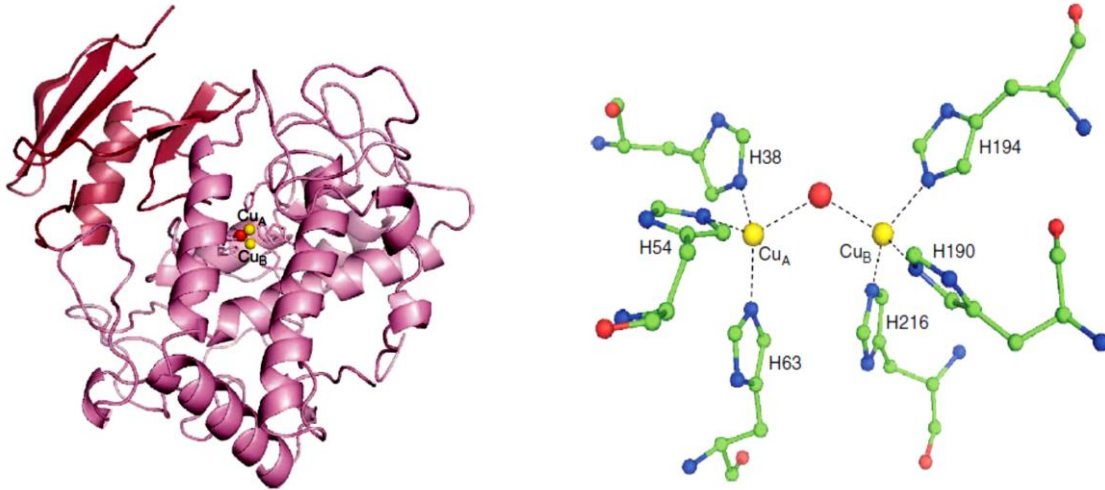


Figura 1.7. Forma strukturore e tirozinazës (majtë) dhe pjesa aktive e saj (djathtë) [62].

Tirozinaza e cila gjendet në perime, fruta dhe kërpudha, është një enzimë e cila ndikon në nxirjen e tyre kur ato ruhen për një kohë të gjatë. Tek gjitarët tirozinaza është përgjegjëse për anomalitë në pigmentimin e lëkurës[61]. Kështu tirozinaza është mjaftë e rëndësishme në fushën e bujqësisë dhe industrisë. Në industrinë kozmetike zhvillimi i inhibitorëve potent të tirozinazës është një interes atraktiv.

Aftësia e tirozinazës për të reaguuar me fenole bënë atë të përdorshme në bioteknologji, për zhvillimin e biosensorëve dhe aplikimet në biokatalizë [63-65].

Në vitin 2003 është realizuar një studim kinetik i oksidimit të APAP nga tirozinaza (EC 1.14.18.1) [66].

Në hapin e parë APAP hidrosilohet duke kaluar në 4-acetamido-1,2-katekoll. Më pas ky produkt inermiediar në hapin e dytë oksidohet në 4-acetamido-o-benzokinon(4-AOBQ) [67, 68]. Produkti i fituar (4-AOBQ) mund të reduktohet në mënyrë elektrokimike me participimin e dy protoneve dhe dy elektroneve [69].

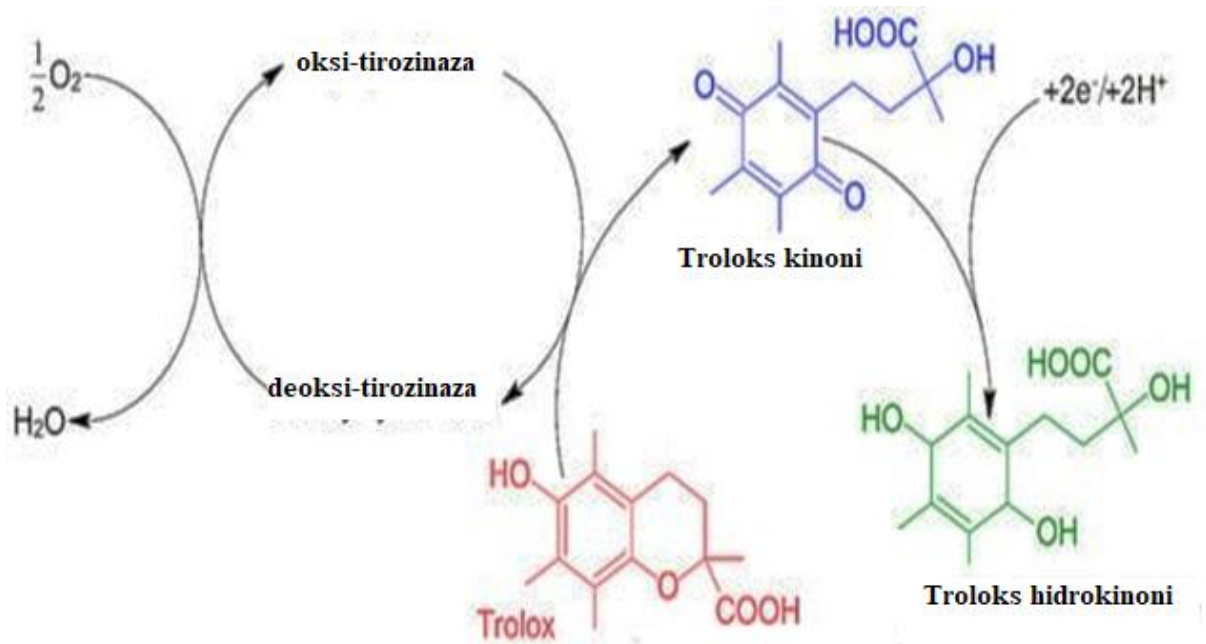


Figura 1.8. Mekanizmi i oksidimit të hidrokinonit nga tirozinaza [59].

Tirozinaza është e aftë të katalizojë edhe oksidimin e troloksit me çka formohet Troloks kinoni [59], i cili ka mundësi të reduktohet elektrokimikisht më pjesëmarrjen e dy elektroneve dhe dy protoneve në Troloks hidrokinone[69]. Këto procese përshkruajnë në mënyrë të thjeshtë principin e sjelljes së biosensorit amperometrik nga tirozinaza.

2. SENSORËT

Termi sensor filloj të përdoret nga vitet 70-ta. Ky zhvillim ishte i shkaktuar nga zbulimet teknologjike që ishin pjesë e revolucionit industrial që vazhdon edhe në ditët e sotme [70]. Sensorët janë pajisje që mundësojnë konvertimin e parametrave të ndryshëm siç janë ata kimik ose fizik në sinjale të matshme dhe të përshtatshme. Rrjedhimisht, sensorët kimik mund të konsiderojmë si gjuhë dhe hundë artificiale. Parimi i sensorëve është i ngjashëm me organet sensitive të organizmave të gjallë [71]. Sensorët sot janë pjesë e pothuajse të gjitha makinerive dhe aparaturave të ndryshme, ata janë sytë dhe veshët e tyre. Ata kanë ndihmuar që aparaturat dhe makineritë të bëhen më “inteligjente” dhe më të pavarura. Me zhvillimin gjithnjë në rritje të teknologjisë dhe automatizimit, njëherësh edhe sensorëve, mund themi se sot sensorët paraqesin organet teknike të ndijimit si: sytë, veshët dhe gjymtyrët e makinerive të automatizuara[70]. Figura 2.1 ilustron ngjashmëritë mes sistemeve biologjike dhe teknike.

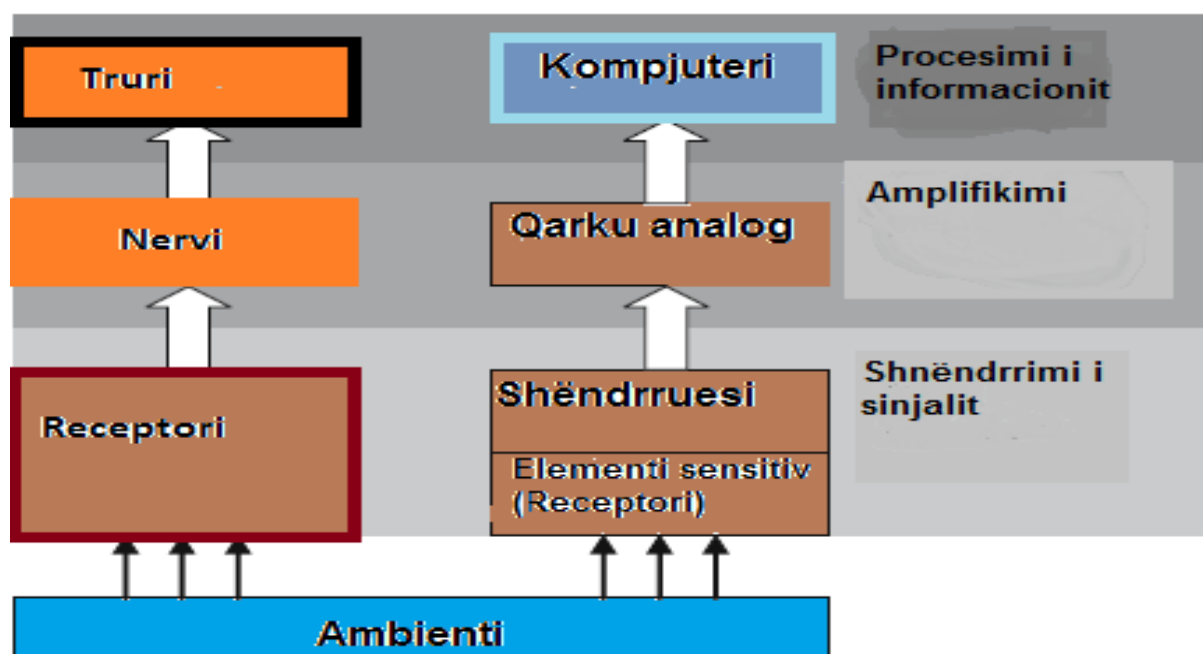


Figure 2.1. Procedimi i sinjalit nga organizmat e gjallë dhe procedimi nga një makinë inteligjente [70].

Karakteristika më e rëndësishme e një sensori ideal është që ai të bëjë të mundur matjen në mënyrë të vazhdueshme pa mostrim dhe pa modifikuar matjen apo analitin. Ky është dallimi kryesor ndërmjet sensorëve kimikë dhe pajisjeve analitike që përdoren në kiminë analitike. [72].

2.1. Sensorët kimikë

Një sensorë kimik është një pajisje e vogël dhe e kompletuar që në një kohë reale e kthen informacionin kimik në një sinjal të përdorshëm analitik. Sipas Bashkimit Ndërkombëtar të Kimisë të Pastër dhe të Aplikuar (IUPAC) sensorët kimikë përkufizohen si pajisje që transformojnë informatat kimike, duke filluar nga përqendrimi i një komponente specifike deri në analizën totale të përbërjes, në sinjal analitik të shfrytëzueshëm. Funksionimi i sensorit kimik bazohet në pjesët përbërëse të tij, si: receptori dhe shndërruesit [73]. Nga informacioni kimik në kuptojmë përqendrimin e një analiti specifik i cili është pjesë e një mostre të caktuar.[74]. Fillimisht kimistët hezituan që të merren me sensorë, por më vonë interesimi i tyre për ta u rrit.

Sensorët nuk përshtaten lehtë me konceptet tradicionale dhe rezultojnë që tu përkasin një fushe të re. Megjithatë nuk ka dyshim se sensorët kimikë përfshijnë një degë të kimisë analitike. Sensorët kimikë janë pajisje të vogla që përmbajnë një element njohës, një element shëndërrues dhe një procesor të sinjalit të aftë që në mënyrë të vazhdueshme dhe të kthyeshme të raportojë për një përqendrim kimik. Sensorët kimikë duhet të jenë të aftë të:

- Transformojnë sasi të kimike në sinjale elektrike
- Të përgjigjen shpejt
- Të ruajnë aktivitetin e tyre për një periudhë të gjatë kohore
- Të jenë të vegjël
- Të jenë të lirë
- Të jenë specifike p.sh. ata duhet t'u përgjigjen vetëm një analiti, ose të paktën të jetë selektiv ndaj një grupi të analitëve [71].

Funksionimi i sensorit kimik bazohet në pjesët përbërëse të tij, si: **receptori** dhe **shëndërruesit**. Receptori i sensorit transformon informatat kimike në formë të energjisë e cila mund të matet nga shëndërruesi [73]. Në shumicën e sensorëve kimikë, receptori reagon me molekulat e analitit. Si rezultat, vetitë fizike të tij ndryshojnë në atë mënyrë që shëndërruesi që është i lidhur mund të fitojë një sinjal elektrik. Në disa raste, objekti i njëjtë sillet si receptor dhe si shëndërrues [70]. Pjesa e receptorit të sensorit kimik mund të bazohet në parime të ndryshme si: fizik, ku nuk zhvillohet reaksion kimik, kimik, në të cilin reaksioni kimik i analitit jep sinjal analitik dhe biokimik, në të cilin procesi biokimik është burim i sinjalit analitik.

Shëndërruesi është pajisje që bën të mundur transformimin e energjisë bartëse të informacionit kimik rreth përmbajtjes së mostrës në sinjal analitik të dobishëm. Shëndërruesi nuk paraqet selektivitet [76].

Klasifikimi i sensorëve realizohet në mënyra të ndryshme. Më i përhapur është klasifikimi që ndjek principet e shëndërruesit të sinjalit.

Grupet e sensorëve rezultojnë:

- Sensorët optikë, që matin absorbancën, reflektimin, luminoshencën, fluoroshencën, indeksin e thyerjes, efektin optotermik dhe shpërhapjen e dritës.
- Sensorët elektrokimikë, në mesin e tyre pajisjet voltametrike dhe potenciometrike, CHEMFET, dhe sensorët potenciometrik për gaze me elektrolitë të ngurtë.
- Sensorët elektrikë duke përfshirë këtu ato okside të metaleve dhe gjysmëpërçuesit organikë si dhe sensorët elektrolitikë të përçueshmërisë.
- Sensorët e ndjeshëm ndaj masës p.sh. pajisjet piezoelektrike dhe ato të bazuara në valët akustike të sipërfaqes
- Sensorët magnetikë (shumica për oksigjen)
- Sensorët termometrikë që bazohen në matjen e efektit të nxehtësisë të një reaksioni specifik kimik ose adsorbimit që përfshin analitin
- Sensorët e tjerë, sidomos ata që bazohen në emisionin ose absorbimin e rrezatimit [70].

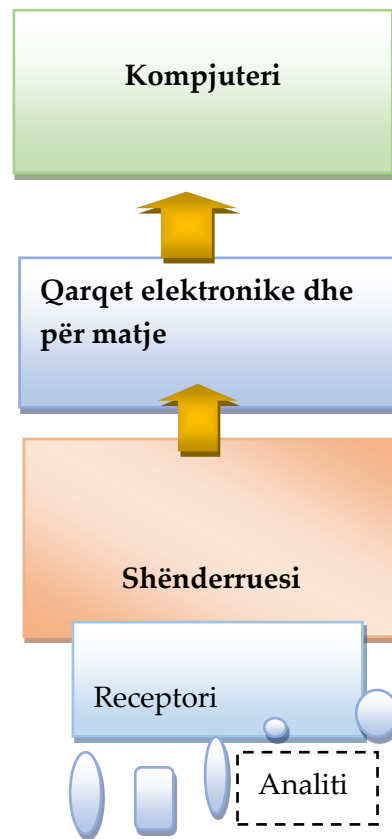


Figura 2.2 Paraqitja skematike e një sensori tipik kimik.

Prej parametrave kryesorë që mund të përdoren për të karakterizuar performancën e sensorit kimik janë: ndjeshmëria (sensitiviteti), kufiri i detektimit, rendi dinamik, selektiviteti, lineariteti, rezolucioni, kohë-reagimi, histereza, qëndrueshmëria (stabiliteti) dhe jetëgjatësia [72].

2.2. Sensorët elektrokimik

Sensorët e bazuar në vetitë e tyre elektrokimike janë një grup i veçantë i pajisjeve analitike të cilët kanë tërhequr një vëmendje të konsiderueshme në kohët e sotme dhe e gjithë kjo nuk është e çuditshme duke u bazuar në faktin që këto lloj pajisjesh luajnë një rol kyç në analizat mjekësore dhe klinike, në kontrollin e ushqimit dhe në monitorimin industrial [77]. Sensorët elektrokimikë paraqesin një nënklasë të rëndësishme të sensorëve kimikë në të cilët si element shndërrues përdoret elektroda. Sensori elektrokimik është celulë elektrokimike, e ndërtuar nga dy apo tri elektroda. Varësisht nga parametri elektrik i matur, sensorët elektrokimikë mund të klasifikohen në tipa (lloje) të ndryshëm [78].

Sensorët elektrokimikë në mënyrë të menjëhershme prodhojnë sinjale elektrike. Kjo është njëra prej përparësive kryesore të tyre dhe është njëra prej arsyeve për lidhjen e ngushtë midis fushës së sensorëve kimikë në njërin anë dhe elektrokimisë duke përfshirë teknikat e eksperimenteve elektrokimike në anën tjetër. Elektrokimistat tradicionalisht janë vetë-ndërtues të instrumenteve elektronike. Për shkak të natyrës së punës së tyre, ata duhet të kuptojnë se si instrumentet elektronike punojnë. [70].

Sensorët potenciometrik bazohen në matjen e potencialit, si sinjal relativ, i matur ndaj potencialit të elektrodës referente, që është proporcional me aktivitetin e joneve të analitit në tretësirë. Potenciali i elektrodës referente është vlerë fikse dhe aktiviteti i tretësirës së brendshme të elektrodës referente është konstant. Sensorët amperometrik e gjenerojnë sinjalin analitik nga matja e rrymës që prodhohet nga reaksioni elektrokimik i zhvilluar në sipërfaqe të elektrodës. Potenciali konstant i ushtruar shërben si forcë shtytëse për reaksionin e transferimit të elektroneve të llojeve (specieve) elektroaktive. Kjo mund të përshkruhet edhe si “shtypje e elektroneve” që i shtynë llojet (speciet) të marrin apo të japin elektrone. Rryma rezultuese është matje direkte e rendit të reaksionit të transferimit të elektroneve. Sensorët konduktometrikë bazohen në matjen e përcjellshmërisë (konduktivitetit) të tretësirës, i cili është proporcional me përqendrimin e analitit. Sensorët amperometrikë krahasuar me sensorët tjerë elektrokimikë kanë disa përparësi si: ndjeshmëri të lartë, selektivitet ndaj specieve elektroaktive, rend linear të gjerë, instrumentim në miniaturë dhe çmim të lirë, aftësi për specie të ndryshme, dhe shumë lloje të elektrodave që mundësojnë analizën në mjedise të ndryshme. Në tabelën 2.1 është paraqitur tabela me llojet senzorit elektrokimik dhe principi i punës që kanë ata [79].

Tabela 2.1: Principet e shndërrimit dhe teknikat e matjes të sensorëve elektrokimike [70].

| Sensori | Principi i shndërruesit | Madhësia që matet |
|-------------------------------|-------------------------|--|
| Potenciometrik | Shndërrimi i energjisë | Potenciali(impedanca e lartë) |
| Amperometrikë dhe Kulometrikë | Rryma kufizuese | Rryma (impedanca e ulët) |
| Konduktometrikë | Resistive | Rezistenca(vlera reciproke e përçueshmërisë) |

2.3 Biosensorët elektrokimikë

Biosensorët janë sensor kimik në të cilët sistemi njohës i tyre bazohet në një reaksion biokimik ose biologjik ku qëllimi kryesor i këtij sistemi njohës është që ti garantoj sensorit një nivel të lartë të përzgjedhshmërisë gjatë matjes së analitit. [80, 81].

Biosensorët janë pajisje të cilat komponentën biologjike të imobilizuar e kanë të lidhur direkt me e sinjalit dhe shndërruesin amplifikatorin elektronik. Funkzioni kryesor i shndërruesit është që t'i konvertojë ndryshimet fiziko-kimike të materialit biologjik gjatë bashkëveprimit me analitin nëpërmjet sinjalit dalës [82].

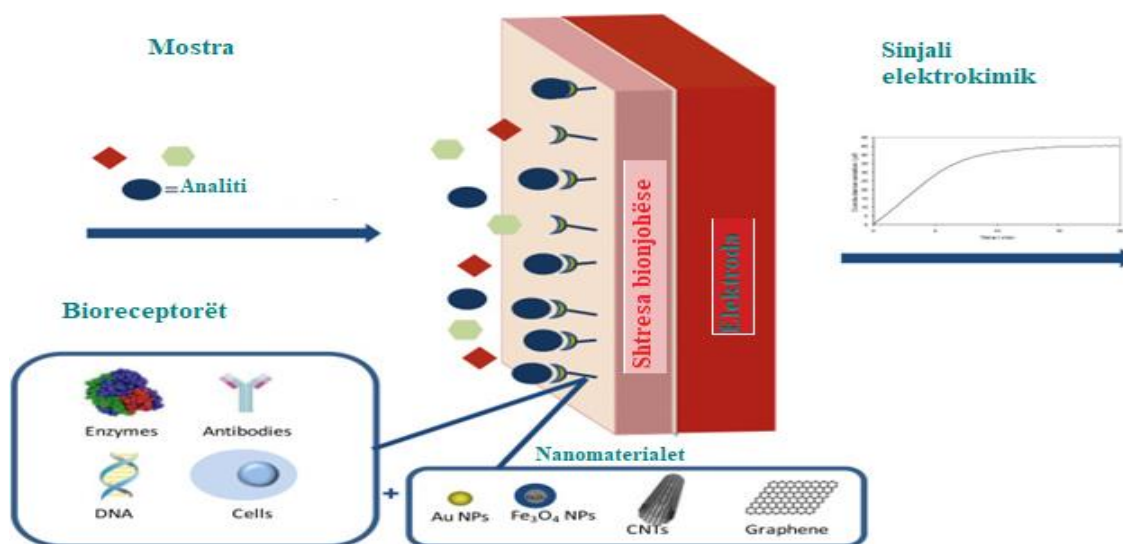


Figura 2.3. Parimi i punës së një biosensori elektrokimik [83].

Njohja Biologjike bazohet në parimin çelës në shumicën e rasteve. Kjo nënkupton se molekulat arrihen të detektohen në bazë të madhësisë së tyre. Selektiviteti i një biosensori është shumë i madh. Substanca bioaktive nganjëherë mund të detektojë analitin në mesin e milionave të tjerë. [70]. Biosensorët sipas Bashkimit Ndërkombëtar të Kimisë të Pastër dhe të Aplikuar (IUPAC) janë sensorë kimikë të cilët si pjesë njohëse përdoret një entitet biologjik si p.sh. enzimë, proteinë, qelizë, ind apo organele[84]. Selektiviteti i lartë i biosensorëve arrihet duke përdorur ndërmjetës selektiv ndaj analitit i cili përmban substancë bioaktive siç janë enzimet, antitruapat apo mikroorganizmat, etj.. Shfrytëzimi i substancave bioaktive të cilat kanë specificitet të lartë për analitin, praktikisht bëjnë që sensorit të jetë i lirë nga interferencat. Në varësi të llojit të shndërruesit të përdorur, biosensorët ndahen në: biosensorë optikë, kalorimetrikë, piezoelektrikë dhe elektrokimikë. [75]. Biosensorët punojnë si sensor biokatalitik ose si sensor me bioafinitet, Në sensorët biokatalitik në shumicën e rasteve enzimët përdoren si komponentë biologjike në sipërfaqen e elektrodës. Tek ata me bioafinitet si grup i dytë zakonisht komplekse shumë stabile me molekulat e mostrës formohen dhe mbahen fuqishëm për sipërfaqe të elektrodës. Në sensorët bioafinitiv në shumicën e rasteve antitruapat ose antigjet vendosen si realizues të reaksionit biokimik. Acidet nukleike gjithashtu mund të klasifikohen si një grup tjetër i biosensorëve [70]. Biosensorët mund të aplikohen në shumë lloje të mostrave duke përfshirë lëngjet trupore, mostrat e ushqimit, mostrat ambientale etj.

Për të konstruktuar një biosensor të suksesshëm duhet plotësuar disa kushte:

1. Substanca biologjike duhet të jetë shume specifike dhe të jetë e qëndrueshme në kushte normale të ruajtjes si dhe në kushtet ku zhvillohet eksperimenti.
2. Reaksioni duhet të zhvillohet sa më i pavarur dhe të mos varet nga kushtet fizike siq është përzierja, vlera e pH dhe temperatura. Kjo do të mundëson që mostra që analizohet të mos i nënshtrohet para trajtimeve.
3. Përgjigjja duhet të jetë e saktë, precize, e riprodhueshme dhe të kemi lineariteti tek koncentriket që neve na interesojnë pa pasur nevojë për hollim ose koncentrik të mostrës.
4. Nëse biosensori përdoret monitorime bioklinike elektroda e punës duhet të jetë efikase dhe e përshtatshme, të mos ketë mundësi të shkaktojë ndonjë pasojë si helmimi ose diçka tjetër.
5. Për mostrat që duhet analizohen shpejtë sensori duhet të jap përgjigje në kohë reale.
6. Si përfundim ndërtimi i sensorit duhet të kushtoj sa më pak të jetë e mundur dhe të mund të përdoret edhe nga personat që nuk janë specialistë të kësaj fushe [85].

2.4. Voltametria dhe amperometria

Metodat elektroanalitike të cilat matet rryma në varshmëri të potencialit të aplikuar quhen metoda voltametrike. Në aspektin historik voltametria është zhvilluar nga polarografia, të cilën e ka zbuluar kimisti çek Heyrovski në vitet e shekullit të XX (1922). Polarografia dallohet nga llojet tjera voltametrike me faktin se elektroda e punës është një elektrodë pikuese e merkurit [86, 87].

Metodat elektroanalitike kanë gjetur aplikim të gjerë përdorim të gjerë për qëllime analitike duke përfshi monitorimin e mjedisit, kontrollin e cilësisë në industri, analiza biomjekësore, etj., si pasojë e thjeshtësisë dhe kostos së ulët, ndjeshmërisë së lartë, mundësin që të automatizohen lehtë dhe ofrojnë një përzgjedhshmëri të kënaqshme. [88].

Termi i përgjithshëm ‘voltmetri’ përfshin në vetvete të gjitha metodat që bazohen në vlerësimin e lakoreve rrymë-potencial. Voltametria është teknikë me kontrollim të potencialit, ku potenciali është i ndryshueshëm krahasuar me amperometrinë të e cila potenciali i ushtruar është konstant. Potenciali i ushtruar kontrollon përqendrimin e specieve redokse në sipërfaqe të elektrodës (C_O^0 dhe C_R^0) dhe rendin e reaksionit (k^0), të përshkruara sipas ekuacionit të Nernst-it ose Butler–Volmerit. Në rastet kur procesi i difuzionit luan rolin kontrollues, rryma rezultuese nga procesi redoks (e njohur si rryma faradeike) është e lidhur me fluksin e materialit drejt ndërfaqes elektrodë-tretësirë dhe është shpjeguar me ligjin e Fikut (Fick).

Për reaksionin elektrokimik reversibël, i cili mund të përshkruhet si $O + ne \rightleftharpoons R$, aplikimi i potencialit E imponon përqendrime përkatëse të O dhe R në sipërfaqe të elektrodës (c_O^0 dhe c_R^0) në përputhje me ekuacionin e Nernst-it:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_R}{c_O} \quad (2.1)$$

ku:

R - është konstantja universale e gazeve ($8.3144 \text{ J mol}^{-1}K^{-1}$), T është temperatura absolute (K),

n - është numri i elektroneve të këmbjera,

F - konstantja e Faradeit (Faradey) ($96,485 \text{ C/mol}$), dhe

E^0 - është potenciali redoks standard për çiftin redoks.

Nëse ndryshon potenciali i ushtruar në elektrodë, raporti c_R/c_O^0 në sipërfaqe gjithashtu do të ndryshojë që të kënaqë ekuacionin (2.1).

Për disa teknika është e mjaftueshme të përdoret raporti që lidh variablat për rrymën, potencialin dhe përqendrimin e njohur si ekuacioni i Butler–Volmerit:

$$\frac{i}{nFA} = k^0 = \{c_O^0 \exp[-\alpha\theta] - c_R^0 \exp[1-\alpha] \theta\} \quad (2.2)$$

ku

$\theta = nF(E - E^0)/RT$,

k^0 rendi i konstantës heterogjene,

α është koeficienti i transferimit dhe

A është sipërfaqja e elektrodës.

Ky raport bën të mundur që të fitohen vlerat për dy parametra analitikë mjaft të rëndësishëm si i dhe k^0 . Përfundimisht, në shumë raste rrjedha e rrymës varet drejtpërdrejtë nga fluksi i materialit në sipërfaqe të elektrodës. Kur O ose R krijohet në sipërfaqe, rritja e përqendrimit siguron shtytje për difuzionin drejt thellësisë së tretësisë. Gjithashtu, kur O ose R zërthehen, zvogëlimi i përqendrimit ndihmon difuzionin e materialit të ri nga brendia e tretësisë. Gradienti rezultues i përqendrimit dhe transporti i masës janë përshkruar përmes ligjit të Fikut, i cili pohon se fluksi i materies (Φ) është në përpjestim të drejtë me gradientin e përqendrimit:

$$\Phi = -AD_0 = \left(\frac{dc_0}{dx} \right) \quad (2.3)$$

ku:

D_0 është koeficienti i difuzionit

O dhe x janë distancat nga sipërfaqja e elektrodës.

Ekuacioni analog mund të shkruhet edhe për R. Fluksi për O ose R në sipërfaqe të elektrodës kontrollon rendin e reaksionit, kështu që rryma faradeike rrjedh nëpër celulë [89].

Një set tipik i pajisjeve për analiza voltametrike përbëhet nga një sistem prej tri elektrodash, të njohura si elektroda e punës, elektroda referente dhe elektroda ndihmëse si dhe një burim i rrymës dhe pajisja për matjen e rrymës dhe tensionit. Në metodat voltametrike si elektrodë pune përdorën elektrodën e ngurta. Për regjistrimin e lakoreve rrymë-potencial, elektroda duhet të jetë e polarizuar, gjë që arrihet me ushtrimin e vlerës së përshtatshme të potencialit mbi sipërfaqen e saj. Kjo bëhet nëpërmjet qarkut elektronik të quajtur potenciostat, duke përdorur celulën elektrokimike me tri elektroda (Fig. 2.4). Elektroda ndihmëse, pas elektrodës së punës, është elektroda e dytë në pajisjet me dy elektroda. Elektroda referuese është elektroda potenciali i të cilës është konstant, si dhe potenciali i të cilës është pikë referimi në pajisjet me tri elektroda. Elektroda e punës është elektrodë, rryma e të cilës është funksion i potencialit të aplikuar dhe përqendrimit të analitit.

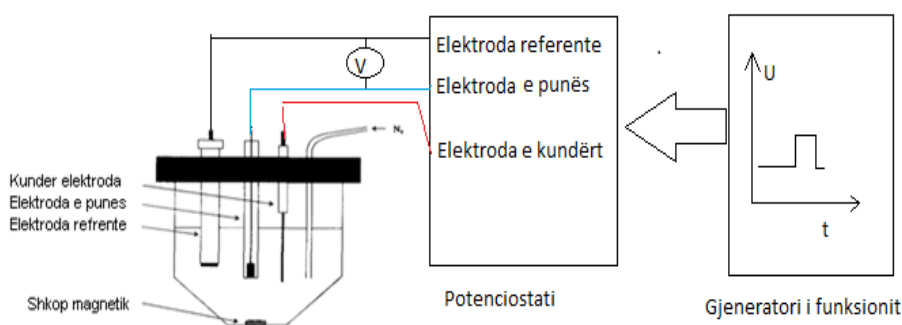


Figura 2.4. Celula elektrokimike me sistemin tri elektroda.

Zgjedhja e materialit të elektrodës varet nga gjerësia e shtrirjes në rendin e potencialit të ushtruar, në vetitë e tretësisë, në kualitetin dhe pastërtinë e materialit. Rendi i potencialit që mund të ushtrohet në elektrodë është i kufizuar nga një apo më shumë faktorë, si dekompozimi i tretësisë, dekompozimi i elektrolitit bazë, oksidimi ose tretja e elektrodës apo formimi i shtresës inerte [70].

2.4.1 Voltametria ciklike

Voltametria ciklike është teknika më efektive dhe më e gjithanshme elektroanalitike që aplikohet për të studiuar mekanizmin e sistemeve redokse. Nëpërmjet përdorimit të kësaj teknike merret informacion i shpejtë për termodinamikën e proceseve redoks, kinetikën e reaksioneve heterogjene që shoqërohen me lëvizje elektronesh, reksionet kimike me mekanizëm si dhe për proceset e adsorbimit. Për këtë arsye çdo studim analitik që bazohet në procese elektronike, fillon zakonisht me eksperimentet e voltametrisë ciklike [90, 91].

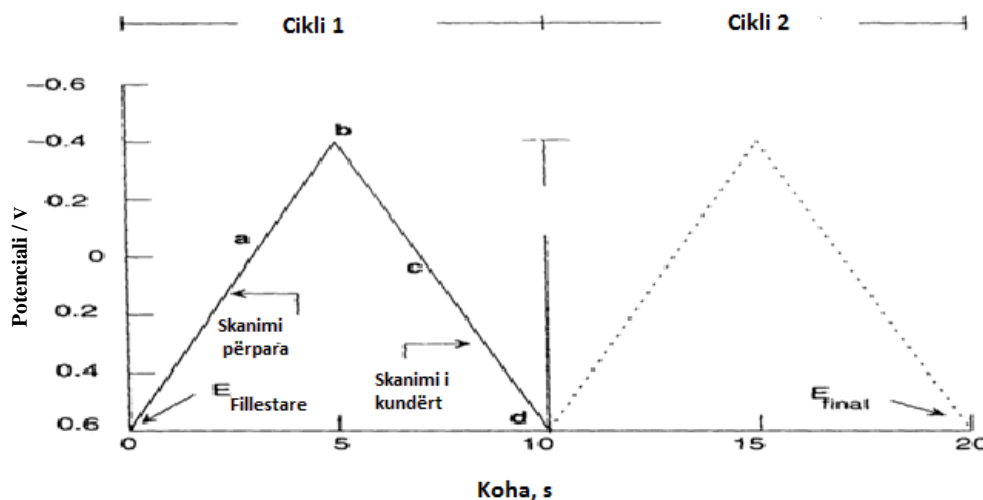


Figura 2.5. Sinjali i ekscitimit potencial-kohë gjatë eksperimentit në voltmetri ciklike [92].

Kjo teknikë bazohet në ndryshimin (varirimin) e potencialit të aplikuar në elektrodën e punës në dy drejtime para dhe pas duke monitoruar rrymën (Fig.2.5). Analiza e rrymave gje gjegjëse ofron informacione të ndryshme për termodinamikën dhe kinetikën e transferit të elektroneve në shtresën elektrodë-elektrolit, për intermedierët e reaksioneve dhe stabilitetin e produkteve të reaksionit. [72].

Diagrami i paraqitur në figurën 2.5. mund të interpretohet në këto mënyra:

- Potenciali negativ paraqet skanimin nga +0.60 deri -0.40 V.
- Drejtimi i skanimit kthehet në potencialin -0.40 V.
- Potenciali pozitiv paraqet skanimin nga -0.40 deri +0.60 V.

Në të shumtën e rasteve skanimi i potencialit përfundon në fund të ciklit të parë (pika d), por mund të vazhdohet me skanimin e një numri më të madh të cikleve, prandaj edhe e quajmë të tillë. Vija me pika (vija e ndërpre) në figurën 2.5. paraqet ciklin e dytë. Një skanim në të cilën potenciali është gjithnjë pozitiv (p.sh. shkon në një drejtim pozitiv) është quajtur një skanim pozitiv. Skanimi në të cilën potenciali shkon duke u bërë gjithnjë e më negativ paraqet një skanim negative edhe pse potenciali aktualisht mund të jetë pozitiv ose gjatë gjithë kohës së skanimit, (siç është rasti në këtë shembull). Nëse koha e nevojshme për ciklin e parë është 10 s, shpejtësia e skanimit është $2V/10s$ ose $0.2 V/s$. Nga voltamogramet ciklik mund të fitohen parametra të rëndësishëm, prej të cilëve, piket e rrymave (i_{pc} , i_{pa}^*) dhe piket e potencialeve (E_{pc} , E_{pa}) janë shumë të rëndësishëm. Një voltamogram ciklik tipik për një çift redoks reversibël gjatë një cikli të potencialit është ilustruar në figurën 2.6. Një çift redoks në të cilët

me shpejtësi bëhet këmbimi i elektroneve me elektrodën e punës është quajtur qift elektrokimikisht i kthyeshëm. Qiftet e tilla mund të identifikohen me anë të regjistrimit të voltamogramit ciklik duke matur ndryshimin e dy pikëve të potencialeve. Ekuacioni 2.4 vlen për një sistem që është elektrokimikisht i kthyeshëm:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{0.058}{n} \quad (2.4)$$

Ku n është numri i elektroneve të shkëmbyera dhe E_{pa} dhe E_{pc} janë potencialet kulmeve anodike dhe katodike, përkatësisht në volt. Vlera $0.058/n$ i ndan kulmet e potencialeve dhe është e pavarur nga shpejtësia e skanimit për një qift redoks, por lehtësisht varet numri i cikleve dhe kërcimeve të potencialeve [92].

Potenciali në mes dy kulmeve të potencialeve është potenciali formal i reduktimit për qiftin përkatës:

$$E^{\circ'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2.5)$$

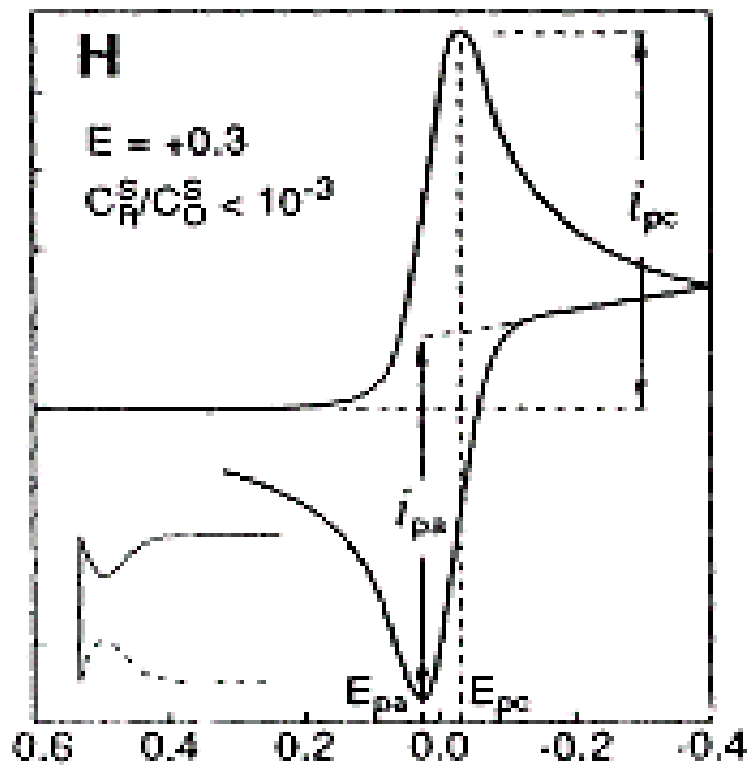


Figura 2.6. Karakteristikat e një voltamogrami ciklik[92]

Në rastin kur reaksioni është plotësisht i kthyeshëm atëherë kemi:

$$E^{\circ'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2.6)$$

Në fund , piku i rrymës jepet me anë të :

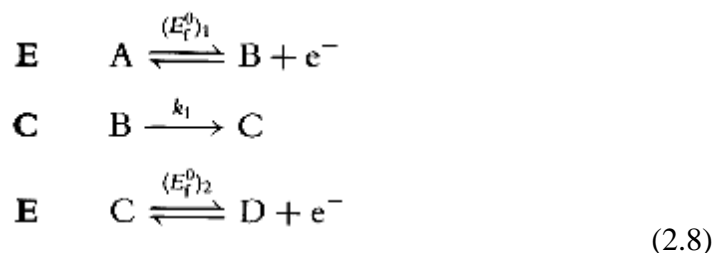
$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.7)$$

ku n është numri i elektroneve, A sipërfaqja e elektrodës, D është koeficienti i difuzionit, C është përqendrimi dhe v shpejtësia e skanimit (e.g V/s) [90].

2.4.2 Amperometria hidrodinamike

Amperometria paraqet një degë të caktuar të metodave voltametrike në të cilën potenciali i ushtruar në elektrodën e punës mbahet konstant, potenciali i tillë mundëson transformimin e plotë elektrokimik të specieve oksido reduktuese. Në parim amperometria mund të aplikohet në tretësira statike (në kushte qetësie të tretësirës - pa përzierje, pa rrjedhje të tretësirës) dhe në tretësira dinamike (tretësira nën përzierje dhe sistemet nën rrjedhje [93]).

Që matjet amperometrike të jenë të shfrytëzueshme në mënyrë efektive është me rëndësi të potencohet se detektimi elektrokimik është teknikë sipërfaqësore, d.m.th. se analiti patjetër duhet bartur në sipërfaqe të elektrodës jo vetëm me anë të difuzionit por edhe me anë të konfeksionit. Metodatat që bazohen në transportin e masës me përzierje të reaktantëve dhe produkteve quhen metoda hidrodinamike, p.sh. teknikat që përfshijnë matjen e rrymave kufitare apo lakoreve rrymë-potencial njihen si voltametri hidrodinamike, ose amperometri



Në voltametri hidrodinamike parametri kohë është i bashkangjitur me rendin e përzierjes dhe është parametër kritik në ekzaminimin e kinetikës heterogjene dhe homogjene të lidhur (të asocuar) me mekanizmin e reaksionit në elektrodë. Kjo marrëdhënie luan rol analog me atë të rendit të skanimit në eksperiment të voltametrisë ciklike. Duke marrë sekuencat e mekanizmit ECE (ekuacioni 2.8), rëndësia e parametrin kohë mund të shihet duke ekzaminuar numrin efektiv të elektroneve të transferuara [72].

2.4.3. Amperometria te sistemet në rrjedhje FIA (Flow Injection Analysis)

Sistemi me analizë në rrjedhje kryesisht bazohet në injektimin e mostrës në një rrjedh të vazhdueshme në të cilën ndodhet bartësi i caktuar dhe i cili bartë mostrën deri tek detektori.

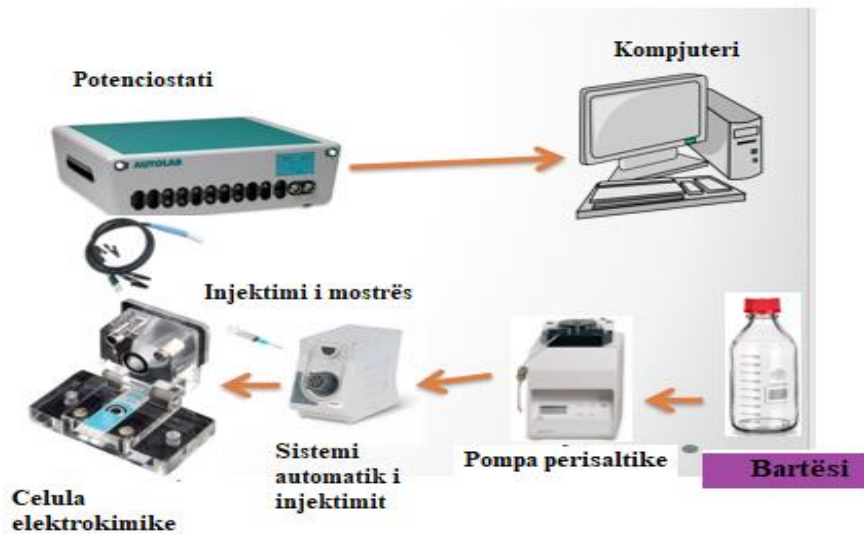


Figura 2.7. Skema e përgjithshme dhe pajisjet e sistemit të analizës me injektim në rrjedhje për detektim amperometrik.

Bartësi arrin të lëviz me anë të një pompe të caktuar, ndërsa detektori mund të jetë i natyrës së ndryshme (optike, elektrokimike etj.) në varësi se cila teknikë analitike përdoret. Sistemin me analizë në rrjedhje për herë të parë e kanë propozuar Ruzicka dhe Hansen në vitin 1947 dhe në formën më të thjeshtë të saj përbëhet nga një pompë, injektori dhe detektori. Në këtë lloj sistemi sinjali është paraqitur në formë të pikëve të mprehta me rritje të shpejtë dhe rënie të sinjalit të rrymës, duke reflektuar kalimin e shpejtë të analitit nëpër sipërfaqen e elektrodës së punës, Fig. 2.8 [93, 94].

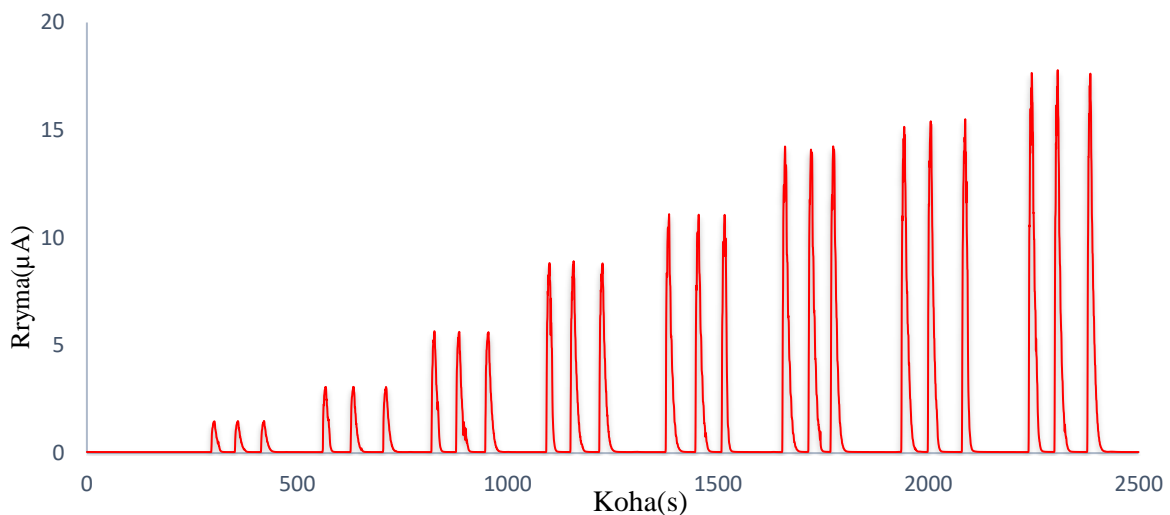


Figura 2.8. Një shembull i një amperogrami hidrodinamik i fituar gjatë analizës me injektim në rrjedhje. FIA është një metodë e duhur për përcaktime të shpejta dhe për numër të madh mostrash për kohë të shpejtë; është një metodë ideale për testimin dhe optimizimin e kushteve analitike, automatizim i trajtimit të mostrave, kosto e ulët e analizës, dhe shumë shpesh po përdoret për hulumtime në biosensor [95].

2.2.4. Elektrodat

Elektrodat e ngurta në formë disku janë më të zakonshmet në voltametri, por gjithashtu mund të jenë edhe të formave të tjera (mund të jetë edhe një tel i thjeshtë) Figura 2.9, si materiale që përdoren për të ndërtuar elektrodat janë platini, ari, argjendi dhe lloje të ndryshme të karbonit si dhe amalgamë të ndryshme.

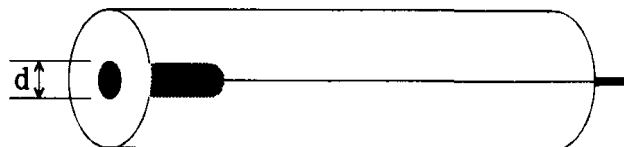


Figura 2.9 Disk elektroda e punës [92].

Elektrodat e karbonit janë shumë të gjithanshëm ngase me modifikimin e tyre mund të zgjerohen fushat e detektimit, elektrodat e merkurit zakonisht përdoren në potenciale shumë negative duke theksuar mbi potencialin shumë të lartë ndaj hidrogjenit, që elektrodat tjera nuk e kanë, në këtë mënyrë në elektrodë reduktohet specia që analizohet e jo hidrogjeni duke qar analizën në dështim. Megjithatë në tretësirat jo ujore dhe në potenciale pozitive preferohen elektrodat e ngurta në formë disku. Elektroda e punës duhet që në mënyrë sa më të lehtë të bëjë shkëmbimin e elektroneve me speciet elektroaktive. Elektroda duhet punuar në mënyrë sa më të mirë që të kemi rezultate të dëshiruara, kështu sipërfaqja të jetë sa më e lëmuar, të mos dëmtohet gjatë punës, kështu arrihet të kemi performancë më të mirë.

Elektroda shumë lehtë ndodh që të ndotët dhe shpeshherë duhet bërë lustrimi i sipërfaqes së saj. Efekteve të dëmshme të tilla si rënie IR (omike) dhe koha e ngarkesës në masë të madhe mund të reduktohen duke e zvogëluar sipërfaqen (radiusin) e elektrodës. Rezultate shumë të mira mund të arrihen duke përdorur ultra-mikroelektroda (radiusi $< 100\mu\text{m}$). Radiusi që përdoret më së shumti është rreth 0.2 cm [92].

Elektrodat nga karboni dhe modifikimi i tyre

Struktura sp^2 e karbonit është treguar të jetë shumë më e komplikuar se e metaleve fisnike si Pt, në këtë mënyrë nga kjo strukturë pritët të kemi sjellje më të ndryshme. Si pasojë e hibridizimit sp^2 karboni dallon shumë nga elementët tjerë si në përçueshmëri që e ka shumë të lartë, stabilitet, porozitet, dhe në qëndrueshmëri mekanike (është material i butë në formë pluhuri), etj. Duhet pasur kujdes llojin e materialit nga karboni dhe përgatitjen e tij për aplikime elektrokimike [92].



Figura 2.10. Procesi i përgatitjes së pastës së karbonit dhe vendosja e saj në piston

Përderisa kemi forma dhe modifikime alotropike të ndryshme të karbonit, kemi edhe elektroda të llojeve të caktuara nga ky material që dallojnë në dizajnë, sjellje elektrokimike, performancë analitike etj. Prej elektrodave më të përdorshme nga karboni i kemi elektrodën pastë karboni (CPE), elektrodën e printuar të karbonit në shtresë të hollë (SCPE), elektrodën nga karboni qelqor (GC) dhe elektrodën e diamantit e dopuar me bor (BDDE). Këto elektroda janë përdorur si sensorë elektrokimik dhe biosensorë për shkak të mundësisë së përdorimit të tyre në forma të ndryshme, për shkak të çmimit të ulët, intervalit mjaft të gjerë të vlerave të potencialit në të cilin mund të funksionojnë këto elektroda duke ofruar mundësi studimi më të gjerë, për shkak të rrymës bazë të ulët gjë që i bën më të përshtatshëm për matje. Gjithashtu ato janë kimikisht inerte dhe lehtësisht mund të modifikohen kimikisht. [92-93, 96]

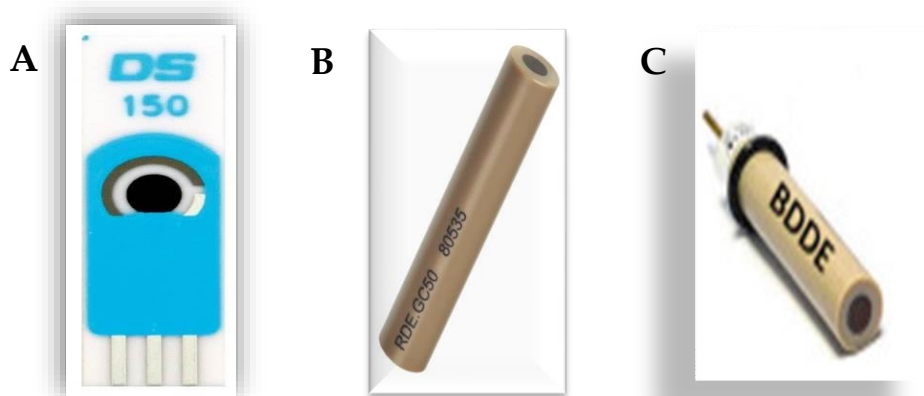


Figura 2.11. Elektrodën të ndryshme nga karboni: A) Elektrodën e printuar në shtresë të hollë, B) Elektrodën nga karboni qelqor, C) Elektrodën e diamantit e dopuar me bor

Ideja fillestare për përgatitjen e elektrodave të pastës së karbonit është dhënë nga Adams në vitin 1958 i cili provonte për ta zëvendësuar elektrodën pikuese të merkurit me elektrodën pikuese të karbonit duke përdorur një raport të lartë të pjesës së lëngshme ndaj pjesës së ngurtë në mënyrë që materiali i karbonit të përngjaj merkurit pikues gjë e cila doli e papërshtatshme për një elektrodë hidrodinamike [97]. Në rendin e vlerave pozitive të potencialit elektrodën

mund të polarizohen deri në +1.4 V (vs. SCE), mirëpo me rritjen e pH te elektrolitit mbështetës, kjo do të ndikojë në kufirin e polarizimit. Gjithashtu edhe kufiri negativ varet nga pH e mjedisit të elektrolitit mbështetës, duke u radhitur nga -1.0 V në mjedis neutral deri në -1.5 në tretësira alkaline. Ky polarizim shkaktohet nga disa efekte, siç është adsorbimi dhe tretja e oksigjenit në pastën e karbonit, ose përmbajtja e grupeve të oksigjenit në sipërfaqen e elektrodës nga grimcat e karbonit.

Elektrodat pastë karboni (CPE) janë të përbëra nga pluhuri i grafitit dhe një lidhës i caktuar i cili mund të jetë vaj silikon ose parafine. Grafiti së bashku me materialin lidhës formojnë pastën e karbonit e cila lehtë mund të vendoset në një piston të caktuar (pipetë, piston nga lapsi kimik, ose piston i veçantë komercial i dedikuar enkas për këtë qëllim, etj.), në këtë mënyrë formohen elektrodat pastë karboni. Janë shumë praktike ngase ndërtohen lehtë, ekziston mundësia që ato të modifohen në brendi dhe sipërfaqe, janë përdorshme në metodat voltametrike, potenciometrike e kulonometrike.

Elektrodat e printuar të karbonit në shtresë të hollë (SCPE) mund të zhvillohet duke aplikuar materialin nga karboni në një pllakë të hollë me gjatësi disa cm e përbërë nga materiali inert (qeramikë, PVC, etj.). Zakonisht tash elektrodat e printuar të karbonit gjenden të gatshme në treg që lehtëson dhe shpejton punën hulumtuese në këtë drejtim. Kjo teknikë ka përparësitë e veta si: fleksibiliteti në dizajnim, automatizim të procesit, riprodhueshmëri të mirë, zgjedhje të materialeve të ndryshme dhe reduktim të shpenzimeve. E njëjta edhe parashihet si një metodë alternative për prodhim të sensorëve me kosto të ulët dhe sasi të madhe.

Elektrodat nga karboni qelqor mu d të përgatiten vete ose të blihen të gatshme. Këto elektroda karakterizohen me fortësi të lartë, duke ndikuar që absorbimi në sipërfaqe të elektrodës të jetë minimal e sidomos kur e krahasojmë me elektrodat pastë karboni. Me fortësi të lartë karakterizohet edhe elektroda e diamantit e dopuar me bor, por shumë herë më të lartë se elektroda paraprake. Kjo elektrodë mund të përdoret në potenciale shumë pozitive dhe gjithashtu edhe tek ato negative, absorbimi në sipërfaqen saj është jashtëzakonisht i vogël, ofron stabilitet të lartë (riprodhueshmëri të lartë) etj.

Në shumë raste elektrodat e pastra të karbonit nuk janë të aftë të prodhojnë sinjale specifike dhe selektive, sidomos për mostrat fiziologjike ke kemi prezencë të shumë substancave kimike të cilat interferojnë në matjet kimike. Për këtë arsye është e nevojshme që elektrodat në përgjithësi të modifikohen. Elektrodat e karbonit mund të modifikohen në brendi ose në sipërfaqe ndërsa natyra e modifikueseve mund të jetë inorganike ose organike, mund të përdoren edhe komponente biologjike në modifikimin e elektrodave duke prodhuar në këtë rast biosensorë. Si komponente të mundshme biologjike mund të jenë proteinat ose enzimat, polisaharidet ose acidet nukleike, organelet qelizore ose mund të jetë edhe e gjithë qeliza (mikroorganizmat) dhe indet e frutave etj. Procesi i modifikimit mund të jetë fizik ose kimik. Procesi fizik mund të realizohet diku e përzier në mënyrë të thjeshtë materialin nga karboni (pastën) me modifikues dhe më pas duke e homogjenizuar masën, procesi fizik mund të realizohet edhe në sipërfaqe të elektrodës me anë të absorbimit. Procesi elektrokimik realizohet në atë mënyrë që në elektrodën e punës ushtrohet potencial i caktuar i cili ndikon që sipërfaqja e elektrodës të mëveshët me shtresa të caktuara të modifikuesit ose të formohen grupe tjera të caktuara kimike.

Modifikuesit duhet të jenë të patretshëm në tretësirën të cilës i ekspozohen, apo të paktë ata duhet të jenë fuqishëm të absorbueshëm në thërmijat e karbonit, përndryshe mund të ketë rrjedhje nga struktura e pastës apo ngjyrës, duke dhënë rezultate të dobëta të riprodhueshmërisë.

Modifikimi do të jetë më i suksesshëm në përmirësimin e sinjalit sa më lipofilike që të jenë molekulat e modifikuesit. Modifikuesi nuk duhet të jetë elektroaktiv në zonën e potencialit të punës, përveçse nëse kërkohet të shfrytëzohen efektet e tij elektrokatalitike, ngase rrymat e larta të sfondit e përkeqësojnë apo dhe e dëmtojnë përgjigjen elektrokimike të sensorit. Modifikuesi mund të ketë efekt elektrokatalitik, ku përveç efektit të para përqendrimit, ai luan rol ndërmjetësues në procesin e shkëmbimit të elektroneve në mes të molekulave apo joneve me substratin [93].

2.2.5. Nanomaterialet nga karboni

Procedurat në elektroanalizë varen fuqishëm nga aspektet e materialit siç janë vetitë kimike dhe fizike të sipërfaqes së elektrodës, efekti i potencialit operues, adsorbimi dhe aplikimi i veshjeve në sipërfaqen e elektrodës për të rritur sinjalin analitik. Materialet nga karboni janë të përdorura gjerësisht në fushën e elektroanalitikës, për shkak të inertësisë kimike, puna në një potencial të gjerë operues, rrymë bazike të ulët dhe stabilitet të lartë për në analiza të ndryshme [98].

Grafeni është nga nanomaterialet të karbonit më të përdorshme në ditët e sotme i cili u zbulua në vitin 2004 nga K. S. Novoselov dhe A. K. Geim për çka në vitin 2010 morën çmimin Nobel. Zbulimi i grafenit ka pasur një ndikim të madh në fushën e shkencës dhe teknologjisë për shkak të vetive të tij interesante fizike dhe kimike. Grafeni posedon sipërfaqe të madhe specifike, fortësi të lartë, përçueshmëri të shkëlqyeshme elektrike dhe termike, veti të jashtëzakonshme elektronike dhe aftësi të bartjes së elektronit, jo përshkueshmëri dhe përkulshmëri të pashembullt [99]. Në aspektin e strukturës grafeni përbëhet nga një shtresë e vetme planare - dy dimensionale me trashësinë e një atomi, e cila përfshin një strukturë të karbonit me hibridizim sp^2 me kënd të lidhjeve 120° , të përbërë nga një numër i madh i strukturave policiklike, me cilësi jashtëzakonisht të larta elektronike dhe kristalore [100 101].

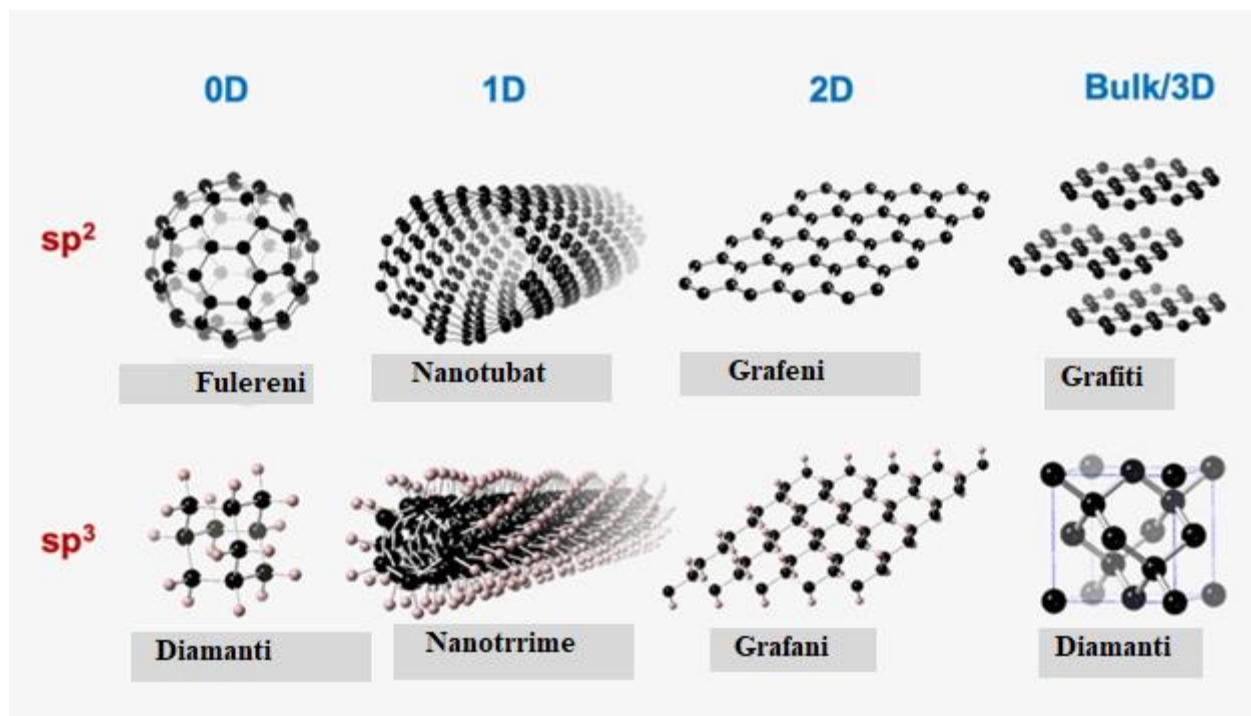


Figura 2.12. Disa materiale dhe nanomateriale nga karboni [102]

Interesi në nanotuba të karbonit (CNTs) vjen për shkak të stabilitetit kimik, dallimit në vetitë mekanike dhe elektronike. Këto përparësi janë produkt i strukturës kimike të tyre në krahasim me fibrat nga karboni tradicional dhe grafiti. CNTs posedojnë një strukturë cilindrike, e derivuar nga zbrazëtirat heksagonale.

CNTs konsistojnë në dy forma strukturore, nanotubat e karbonit një shtresor (SWCNTs) dhe nanotubat e karbonit shumë shtresor (MWCNTs)[103], [104]. SWCNTs janë të ndërtuara nga “gypa” të grafitit me diametër 1-2 nm nga një shtresë individuale e grafitit në formë cilindrike, ndërsa MWNTs përbëhen nga shumë shtresa individuale të grafitit me diameter nga 2-100 nm, ku hapësira është në mes “gypave” sillet rreth 25 nm [105].

Për më tepër, kur CNTs përdoren si material për elektroda gjatë matjeve elektrokimike, ofrojnë aftësi të transferojnë elektronet shpejtë [106], posedojnë potencial të lartë si biosensor për shkak të mundësisë për ti mobilizuar lehtë proteinat e caktuar [107], [108].

PJESA EKSPERIMENTALE

3. MATERIALI DHE METODAT

3.1 Reagentët kimik

Acetaminofen, N,N-dimetil formamidë(DMF), metanol $\geq 99.9\%$ gradë të HPLC, 25% glutaraldehyd (GTA), 5% Nafion[®] në 55% etanol, acid hialaronik kripë e natriumit (30-50 kDa nga *Streptococcus equi*, qitosan, (~50 kDa) dhe pluhur të kërpudhave (*Agricus bisporus*) tirozinazë (EC 1.14.18.1) (119.5 kDa duke përdorur elektroforezën blerë nga Sigma-Aldrich (Pragë, Republika Çeke). Grafen i pafunksionalizuar një shtresorë (NFG) (me rezistencë $\leq 0.30 \Omega \text{ cm}$; sipërfaqe specifike $400\text{-}1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) marr nga CS Material, LLC (Medford, USA). Nanotuba shumë shtresor të karbonit (MWCNTs) me diametër 10-30 nm, gjatësi 5-15 μm , sipërfaqe specifike $10\text{-}300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, dhe nanotuba një shtresor (SWCNTs) me diametër $< 10 \text{ nm}$, gjatësi 5-15 μm , sipërfaqe specifike $> 400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, marr nga Shenzen Nanotech Port Co., Ltd. (Shenzen Kinë). Grafit spektroskopik (diametër mesatar të gramcave prej 2 μm) nga Graphite Tyn s. O., Tyn nad Vltavou, Rep. Çeke, vaj parafine për spektroskopi nga Merck, Darmstadt, Gjermani. Standarde në garadë analitike të L-acid askorbik, acid kafeik, kofeinë, trans-acid cinamik, (-)-epikatekinë, (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik acid (Troloks), 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil radikal, acid klorogjenik, acid gallik, kamferol, hidrat i katekinës, naringinë, sinapik acid, theobrominë dhe vanilinë, të gjitha nga Sigma Aldrich (Pragë, Republika Çeke). Ujë i distiluar (rezistenca $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) përgatitur nga sistemi i pastrimit Milli-Q nga Merck Millipore (Burlington, SHBA). Kemikatet për përgatitjen e pufirit fosfat (PB) janë marr nga Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Republika Çeke).

3.2 Llojet e elektrodave të përdorura

Kryesisht janë përdorur elektroda me bazë karboni, si grafit, grafen, diamant, dhe karbon qelqor. Elektrodat me pastë karboni (grafiti) janë përgatitur vetë, ku fillimisht janë marr 0.500g grafit pluhur dhe 0.125 g vaj parafine. Më pas kjo masë është homogjenizuar në një havan porcelani për 30 min. Pas homogjenizimit pasta ka qëndruar për 24h dhe më pas është bërë e gatshme për përdorim. Në fund pasta vendoset në piston të caktuar dhe në fund bëhet rrafshimi i sipërfaqes ku zakonisht realizohet duke ushtruar presion në formë rrethore mbi një letër filtruese me diametër 3 mm [19]. Matja e rezistencës omike të elektrodës së përgatitur ka qenë 20Ω maksimum, që korrespondon edhe vlerat tjera të publikuara [20].

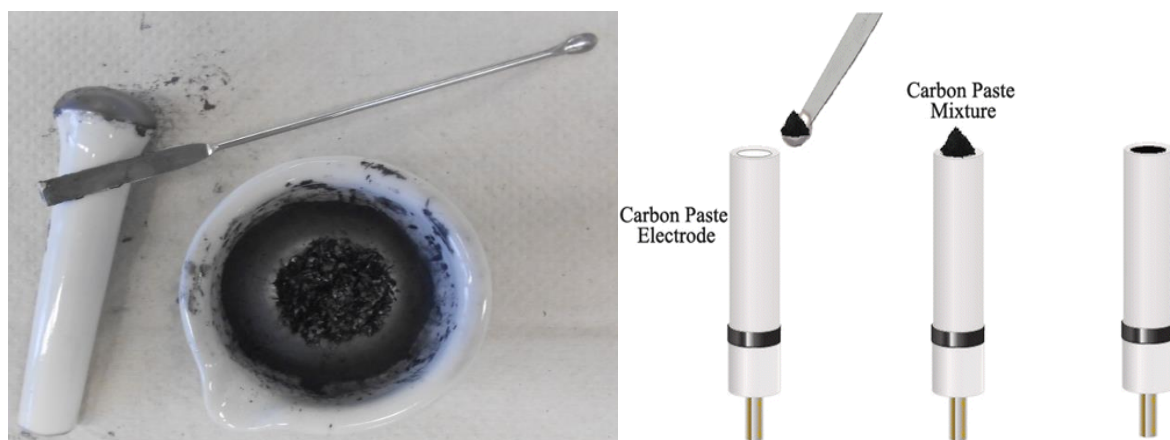


Figura 3.1 A) Pasta e karbonit e përgatitur dhe B) Procesi i vendosjes së pastës në piston

Elektrodat e printuara me të cilat është zhvilluar pjesë kryesore e hulumtimit janë përdorur zakonisht të freskëta dhe nuk ka pasur nevojë për ndonjë trajtim paraprak. Këto elektroda kanë

qenë të llojit DropSens (DS 150) nga prodhuesi Metrohm e që në vetvete përmbajnë të inkuadruara tri llojet e elektrodave, atë të punës (grafit), referente (argjend) dhe elektrodën ndihmëse (platin), ku gjithashtu nevojitet lidhëse veçantë me potenciostat.

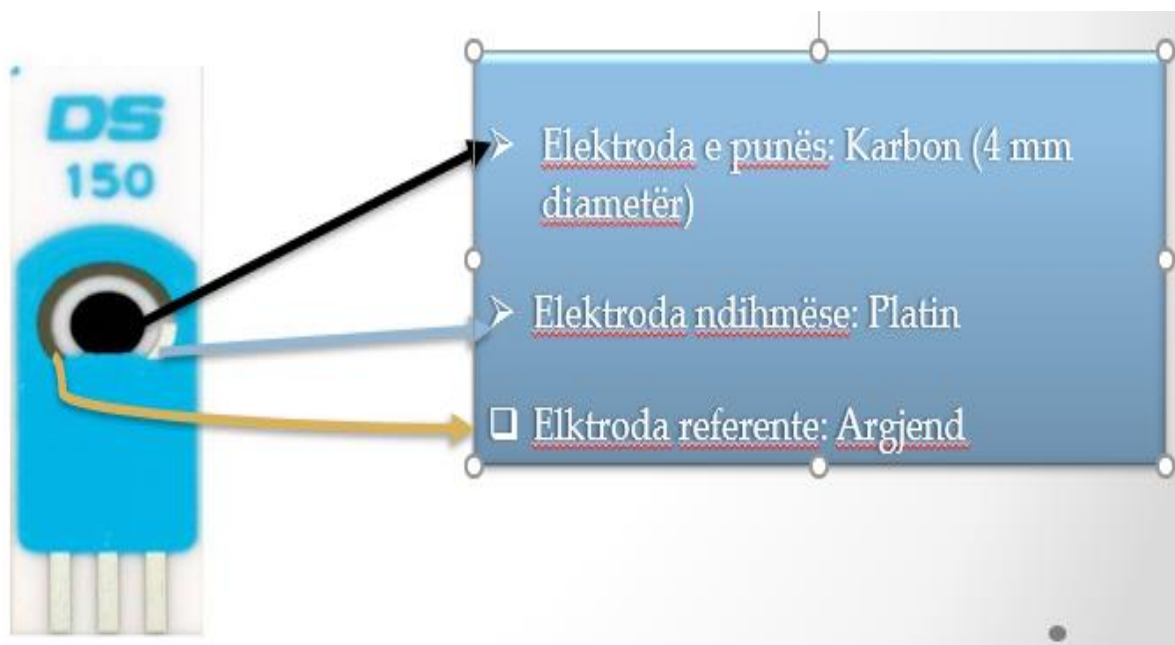


Figura 3.2 Elektroda e komerciale e printuar e llojit DS-150

Janë përdorur edhe elektrodën e gatshme të cilat kanë sipërfaqe të forta siç është elektroda e diamantit dhe ajo e karbonit qelqor. Këto elektrodë para përdorimit i nënshtrohen polirimit mbi suspensionin e grimcave të oksidës së aluminit dhe më pas shpërlahen me ujë të distiluar dhe acetone.

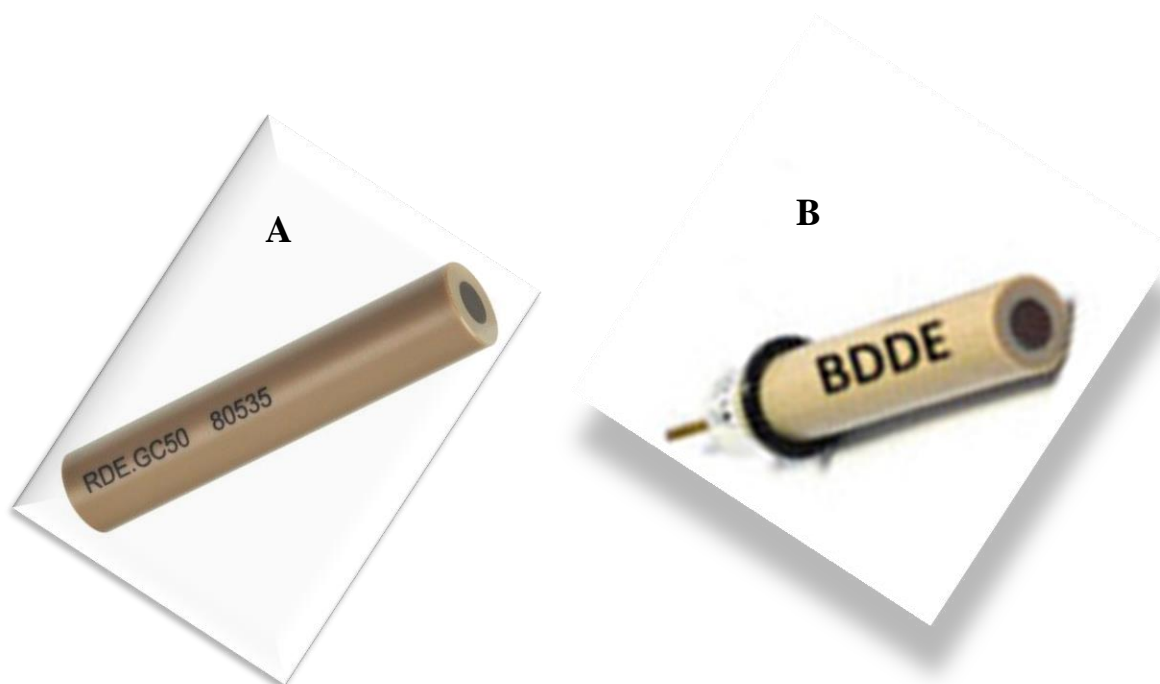


Figura 3.3 Elektroda nga karboni qelqor (A), dhe elektroda e diamantit e dopuar me bor (B)

Si elektrodë referente në rastin e përdorimit të biosensorit elektrokimik nga elektroda pastë karboni ka qenë elektroda $\text{Ag}/\text{AgCl}/ 3.0 \text{ M KCl}$ ndërsa teli i platinës ka shërbyer si elektrodë ndihmëse. Mini elektroda referente $\text{Ag}/\text{AgCl}/ 3.0\text{M NaCl}$ është përdorur në rastin e analizës së ekstrakteve të çokollatës së dhe gjithashtu elektrodë ndihmëse ka qenë teli i platinës. Matjet kinetike që kanë konsistuar përdorimin e komplekseve të bakrit për parë mundësin nëse mund të bëhet zëvendësimi i enzimës, janë realizuar duke e përdorur elektrodën referente të kalomelit $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/ \text{KCl}$ i ngopur, duke përdorur urën elektrolitike të LiClO_4 0.1M në metanol absolut. Edhe elektroda nga platini ka shërbyer si elektrodë ndihmëse.

3.3 Përgatitja e biosensorëve elektrokimik

Për përgatitjen e biosensorëve elektrokimik janë përdorur dy lloje të elektrodave, ato të printuara të tipi DS-150 dhe elektrodave të karbonit. Modifikimi i këtyre elektrodave është shumë i ngjashëm ngase dallimi i vetëm pothuajse është përdorimi i nanomaterialeve të ndryshme nga karboni.

Elektrodave të llojit DS-150 janë modifikuar duke përdorur disa faza. Në fazën e parë elektrodave janë modifikuar me materiale të karbonit si grafen duke aplikuar 20µL grafen ose nanotubave të karbonit në sipërfaqen e elektrodës të disperguara në N,N-dimetil formamidë (DMF) me përqendrim 2 mg mL⁻¹ ku paraprakisht janë vendosur në banjo ultrasonike për 20min. Pas aplikimit të grafenit ose nanotubave të karbonit elektroda ka qëndruar 24h në mënyrë që të bëhet tharja e plotë në kusht laboratorike. Aplikimi i enzimës në sipërfaqe të elektrodës është realizuar në tri faza. Fillimisht janë shtuar 5µL enzimë në formë të tretësirës me përqendrim 2 mg mL⁻¹ në puffer fosfat dhe më pas ka qëndruar për 30 min për tu thar në kushte laboratorike.

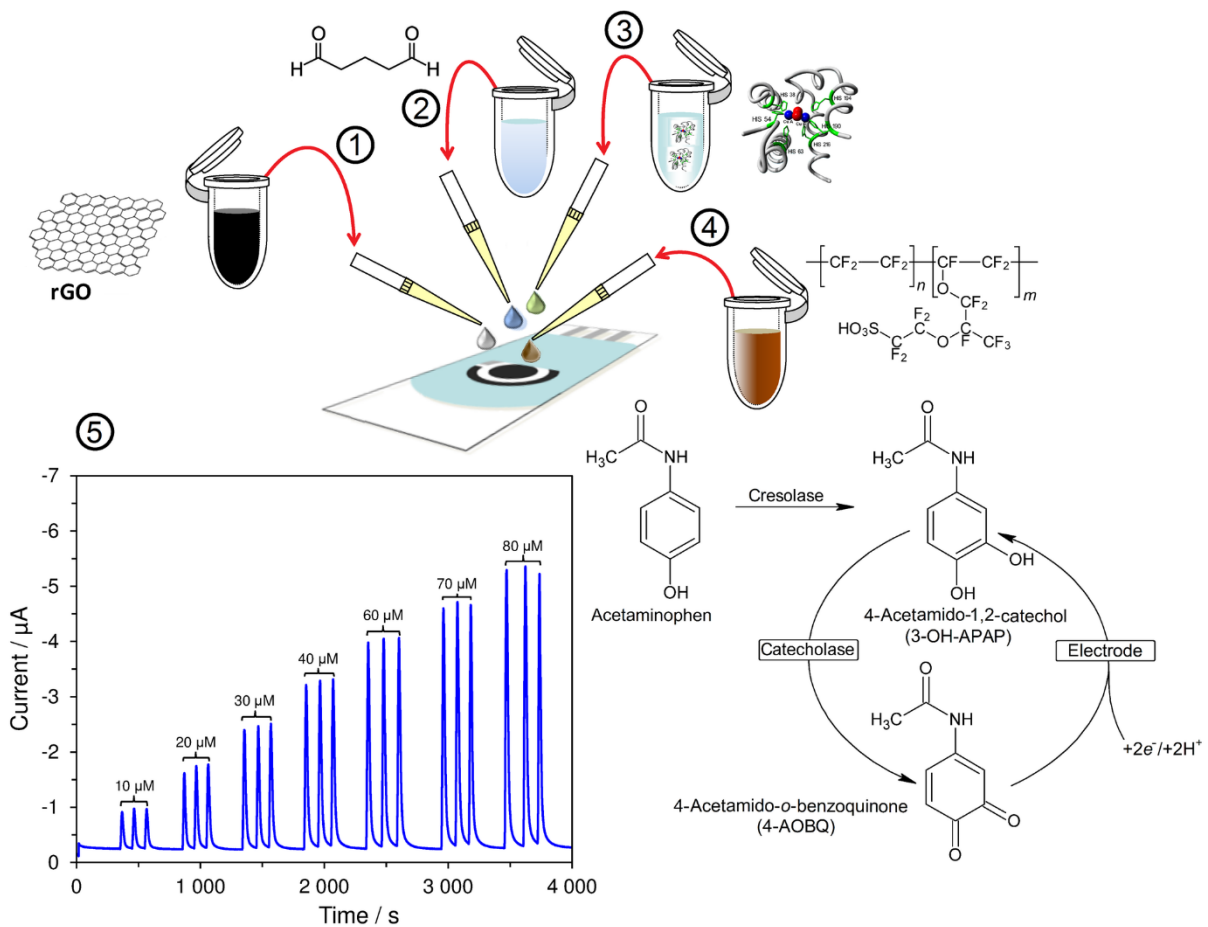


Figura 3.4 Procesi i modifikimit të elektrodës së punës të tipit DS-150

Pasi që është bërë adsorbimi i enzimës në shtresën e hollë të grafenit, është bërë lidhja e molekulave të enzimës mes vete duke përdorur glutaraldehyd 1% në sasi prej 3 µL, koha për tharje të kësaj faze ka qenë 20 min. Në fund fare janë shtuar 10 µL Nafion i cili është një polimer duke luajtur rolin e një rrjete në mënyrë që mos të largohen molekulat e enzimës nga elektroda [30].

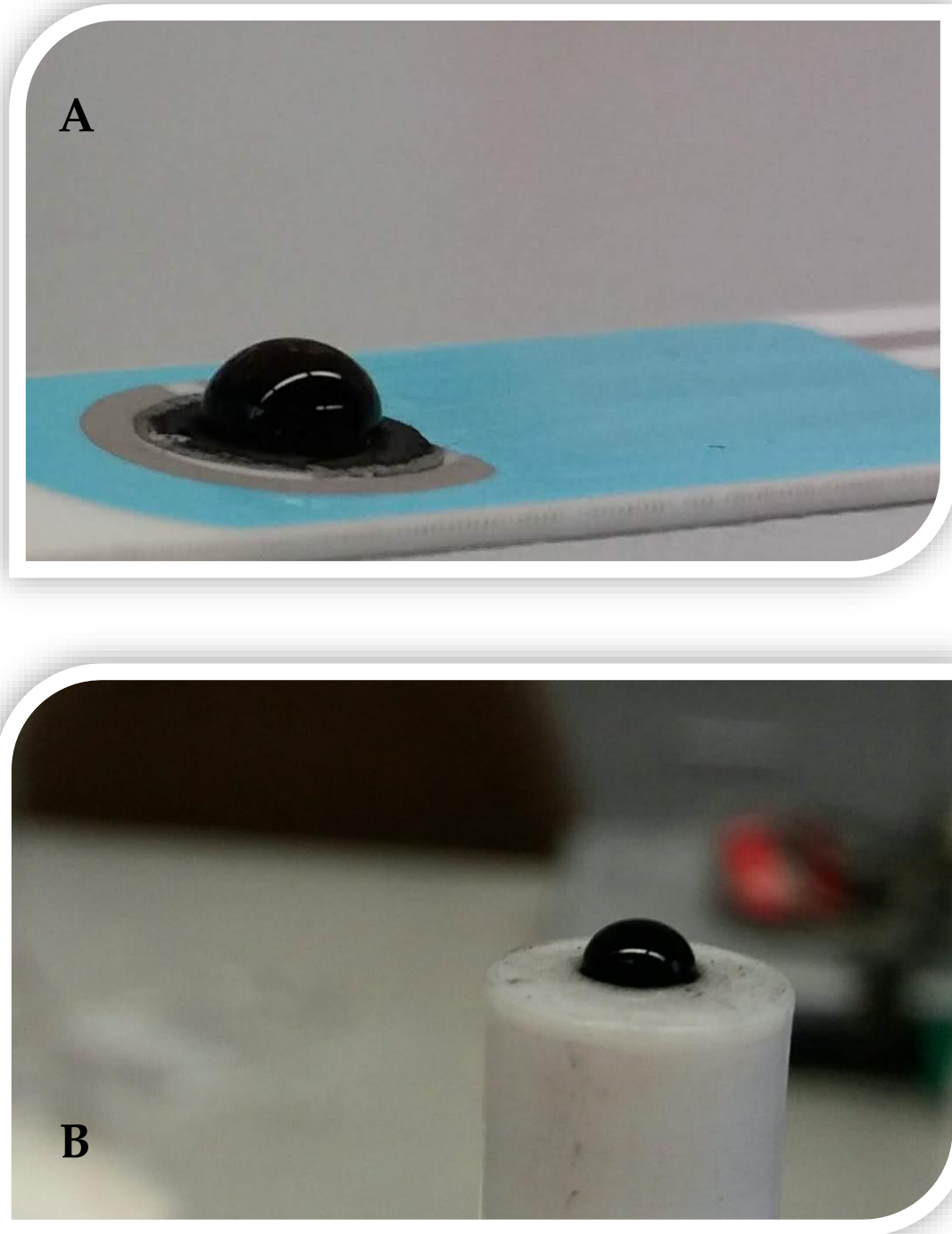


Figura 3.5. Pamja e elektrodave të punës gjatë procesit të modifikimit. A) elektroda e printuar, B) elektroda pastë karboni

Në rastin e elektrodave pastë karboni procedura e modifikimit pak ka dalluar. Edhe këtu fillimisht është bërë modifikimi i elektrodës me nanomateriale të karbonit (nanotuba të karbonit shumë shtresor) duke aplikuar në sipërfaqe të elektrodës $20 \mu\text{L}$ me përqendrim 2 mg mL^{-1} . Dallimi kryesor qëndron në formën se i është vendosur enzima tek kjo elektrodë. Fillimisht është përgatitur një përzierje që ka përmbajtur $40 \mu\text{L}$ Nafion, $60 \mu\text{L}$ ujë i ridistiluar dhe $150 \mu\text{L}$ tretësirë të enzimes me përqendrim $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Sasi prej $10 \mu\text{L}$ nga tretësira e përgatitur është vendosur në sipërfaqen e elektrodës pastë karboni në të cilën paraprakisht është vendosur

shtresa e nanotubave të karbonit. Në fund sipërfaqja e elektrodës është tharë në kushte laboratorike. Nëse nuk është përdorur është vendosur në frigorifer në temperaturë prej 5°C [21].

3.4 Aparatuara e përdorur

Matjet elektrokimike janë realizuar duke përdorur potenciostatin/galvanostatin AUTOLAB i llojit PGSTAT 101 operuar me softuer NOVA 1.11 nga Metrohm (Pragë, Rep. Çeke), (Fig. 3.6) dhe potenciostatin EmStat (PalmSens, Holandë) i kontrolluar përmes softuerit PStace 5.8. Sistemi me analizë në rrjedhje ka përbajtur pompën perisaltike shumë kanalësh MINIPLUS 3 nga Gilson(Middleton, SHBA), sistem automatik i injektimit me valvula gjashtë pozicionale nga INDEX Health & Science (Wertheim; Gjermani).



Figura 3.6 . Potenciostati/galvanostatin AUTOLAB medel PGSTAT 101

Matjet në sistemin me analizë në rrjedhje janë përdorur dy loje të celulave elektrokimike, e para e nga DropSens (Llanera, Spanjë), figura 3.7 A, tipike për përdorimin e elektrodave DS-150, dhe celula e cila bënë të mundur inkuadrimin e elektrodave më të mëdha siç është ajo e diamantit nga Inventek Sp. z o.o. (Varshavë, Poloni) figura 3.7 B. Tharës (Memmert, Schwabach, Gjermani) Helios Delta UV-VIS spektrofotometër (Thermo Ficher Scientific, Waltham, MA, SHBA). Fotografitë e sipërfaqeve të elektrodave janë fituar duke përdorura mikroskopin me skanim elektronik (SEM) JEOL JSM7500F (Tokio, Japoni). Aparaturë kromatografike me presion të lartë me sistem LC-20ADXR, sistem i degazimit DGU-20, SPD-M30A DAD, SIL-20 AC XR auto injektues (të gjitha Shimadzu, Kyoto, Japoni) dhe kolon kromatografike 102 LCO (Ecom, Pragë).

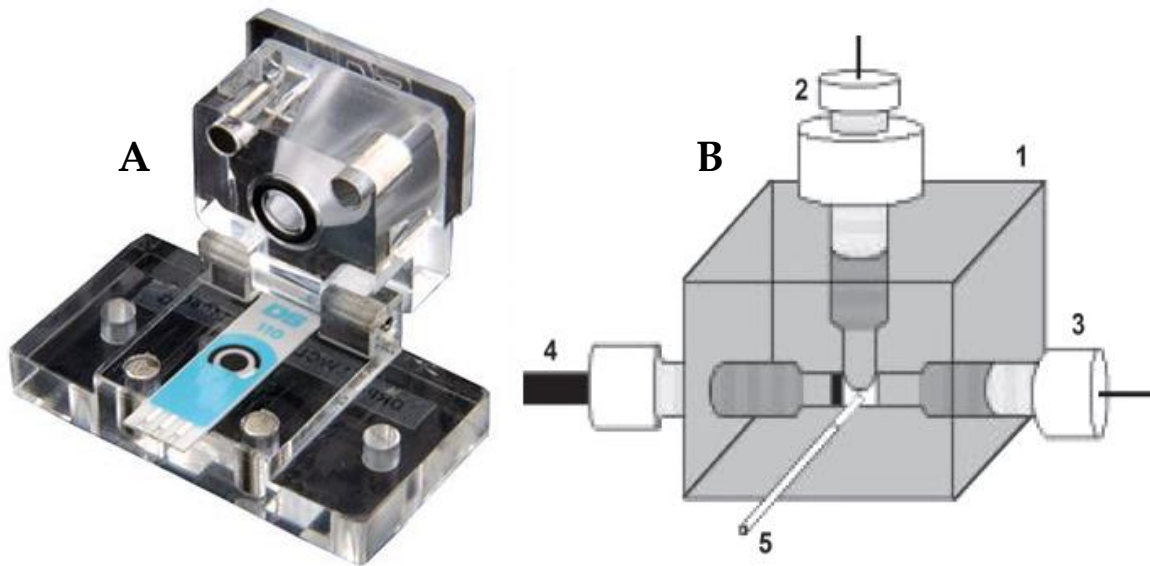


Figura 3.7 . (A) Celula elektrokimike nga DropSens, dhe (B) celula elektrokimike Inventek Sp. z o.o

Gjatë punës laboratorike janë përdorur edhe pajisje të rregullta si kompjuteri, peshore analitike, pH metër, centrifugë, banjo ultrasonike, mikropipeta automatike, përzierës, etj.



Figura 3.8 Mikroskopin me skanim elektronik (SEM) JEOL JSM7500F

3.5 Përgatitja e mostrave për analizë

Sensorët dhe biosensorët elektrokimik janë testuar duke përdorur 3 mostra, secila për sensorin e caktuar. Biosensori elektrokimik i cili është zhvilluar duke përdorur elektrodën e printuara DS-150 është testuar duke përdorur urinë dhe tableta të ndryshme farmaceutike. Biosensori elektrokimik nga pasta e karbonit është testuar duke përdorur fruta mali të ndryshme dhe sensorin elektrokimik nga elektroda e diamantit e dopuar me bor është testuar për të analizuar sasinë totale të polifenoleve në çokolata të ndryshme.

Tabletat Paralen[®] 500 dhe Telex[®] 750 të marra nga barnatoret në Rep. Çeke janë tretur në enë normale prej 250 mL duke përdorur puferin fosfat në rastin kur është bërë analiza amperometrike ose 80% metanol kur është bërë analiza referente me kromatografi të lëngët me presion të lartë (HPLC). Më pas tretësirat janë filtruar përdorur shiringë filter nga politetrafluoretileni me madhësi të poreve prej 0.45 µm, në fund është holluar për 20 herë duke përdorur ujin e ridistiluar.

Urinë normale e njeriut komerciale (50 mL) është blerë nga Inovative Research, Inc. (Novi, USA) shpërndarë nga Dvbio Science Europe (Ulvenhout, Holandë). Gjithashtu mostër e urinës është marrë nga një vullnetar i shëndetshëm i cili ka nënshkruar marrëveshjen e pëlqimit. Te dyja mostrat e urinës janë pasuruar në mënyrë artificiale me sasi të njohur të analitit (paracetamol) dhe kanë shërbyer si matriks kompleks. Të gjitha analizat e mostrave të urinës janë bërë sipas WMA Deklaratës së Helsinkit, Qershor 1964.

Vëllim prej 250 µL nga tretësira standarde e paracetamolit me përqendrim 0.01 M është pipetuar në enë normale prej 50 mL dhe me Pas është mbushur me urinë deri në shenjë. Në varësi të personit sa i përket statusit acido-bazik, vlera e pH e urinës sillet nga 4.5 – 8. Si rezultat vlerave të ndryshme të pH dhe sasia e lartë e kripshmërisë, mostra e urinës e përgatitur në këtë mënyrë është dashur të hollohet 5 herë duke përdorur pufer fosfat dhe më pas duke e filtruar përmes filtrit me diametër 0.45 µm i cili është përshkruar më lartë.

Për analizë me HPLC mostra e urinës së cilës iu është shtuar sasi e njohur e paracetamolit është përgatitur sipas procedurave të raportuara [27, 28] me një ndryshim shumë të vogël, ngase gjatë optimizimit është gjetur që acetonirila mundet plotësisht të zëvendësohet me metanol. Mostra me urinë të njeriut (0.5 mL) me 4 mL metanol të pastërt është vendosur në enë normale prej 10 mL. Për të arritur vlera pH 8 janë shtuar disa pika NaOH 1 M dhe më pas ena është nivelizuar deri në 10 mL duke përdorur ujin ultra të pastërtë. Kjo përzierje është centrifiguar në 5000 rpm për 3 min, filtruar dhe më pas është injektuar në kolonën kromatografike.

Biosensori elektrokimik bazuar në elektrodën e pastë karboni modifikuar me tirozinazë është testuar në përcaktimin e kapacitetit antioksidues në fruta mali të ndryshme duke përfshirë 5 lloje të tyre: manaferra *Rubus fruticosus*, boronicë *Vaccinium corymbosum*, boronicë e kuqe *Vaccinium erythrocarpum*, mjedër *Rubus idaeus* dhe dredhëza *Flagaria magna* marrë në marketet lokale. Përafërsisht 40 g të secilës frutë janë marrë dhe janë tharë fillimisht deri në peshë konstante, ku më pas janë imtësuar në havan porcelani për 20 min. Temperatura optimale e tharjes është sjellë nga 40 °C deri në 60 °C nga 3 deri në 5 ditë [22]. Nga 2 g fruta të imtësuar janë transferuar në një enë normale prej 50 mL dhe është mbushur deri në shenjë me tretësirë të etanolit 50% ku më pas është vendosur në banjo ultrasonike prej 60 min. Në fund mostrat janë filtruar me letra të thjeshta filtri, duhet theksuar faktin se tek dredhëzat është dashur të përdoret filtrimi me vakum për shkak të përmbajtjes së sasive të larta të patretshme që ka shkaktuar mbylljen e poreve të filtrit.



Figura 3.9. Ekstrakte e frutave pas procesit të filtrimit

Elektroda e diamantit e dopuar me bor është e fundit që është testuar në analizimin e mostrave reale dhe atë të çokolatës për të përcaktuar sasi të totale antioksiduese ekuivalent me troloksin. Si burim potencial i antioksidantëve janë marr disa çokollata me sasisë nga 0 deri në 80% (ë/ë) të kakaos të blera në marketet lokale në Prishtinë, Kosovë. 5 gram të këtij produkti janë ekstraktuar me 50 mL tretësirë e cila përmban ujë të distiluar aceton dhe acid acetik (70+29.8+0.2, v/v/v). Ekstraktimi është zhvilluar në banjo ultrasonike për 30 min. në temperaturë 30 °C . Acetoni është avulluar gjithashtu duke e përdorur banjone ultrasonike për 20 min. në temperaturë 40 °C. Pas ekstraktimit përbërja është neutralizuar me NaOH 0.1M deri në pH = 5.0 dhe më pas është bartur në enë normale prej 100mL duke e nivelizuar me pufër fosfat në 30 % (v/v) metanol. Në fund është bërë procesi i centrifugimit në 1000 rpm për 4 min dhe filtrati është centrifuguar dhe më pas supernatanti është filtruar ku diametri i vrimave të filtri ka qenë 1 µm. Filtrati nga ekstrakti i çokollatave është holluar për 5 herë për të reduktuar agjentët reduktues. Sasi e injektimit në sistemin me analizë në rrjedhje ka qenë 100 µL.

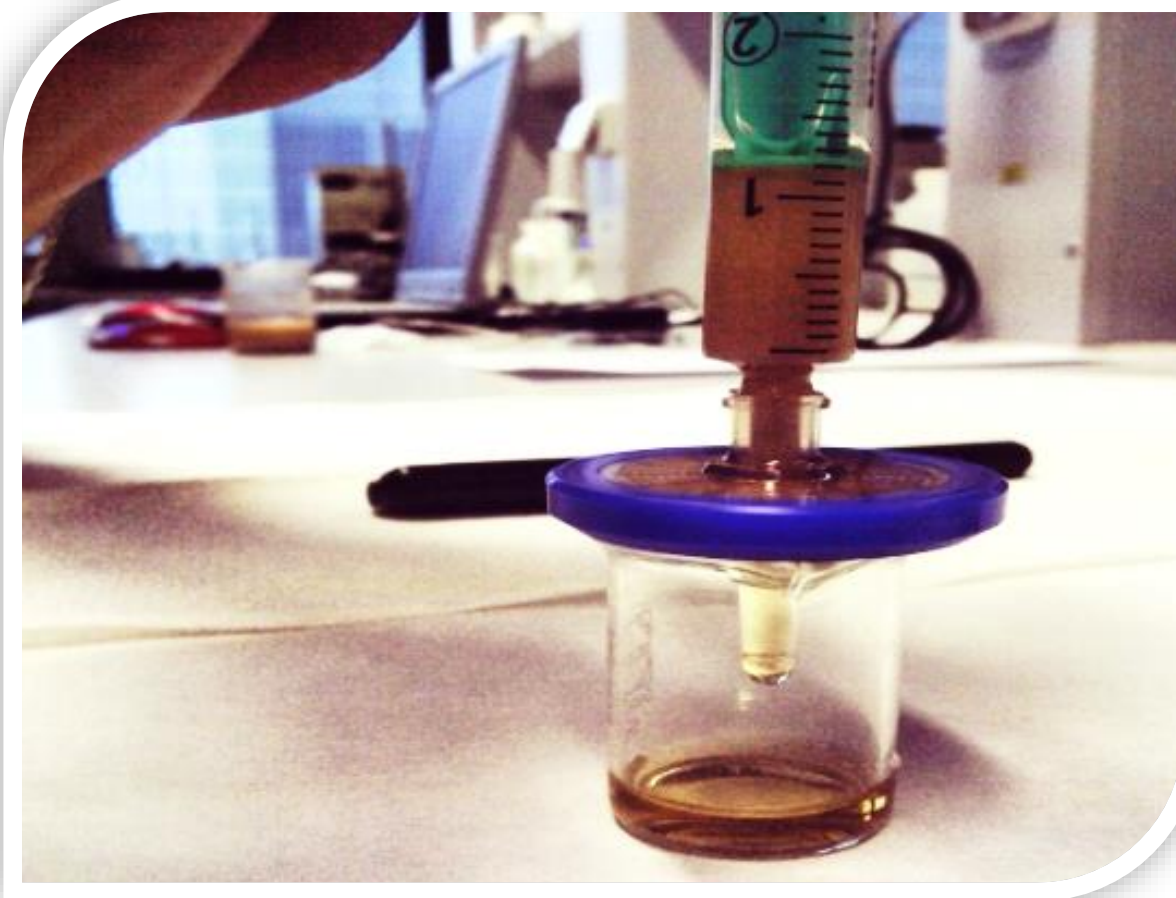


Figura 3.10. Procesi i filtrimit për tretësirën e çokollatës

Të gjitha analizat e përzgjedhura janë përsëritura 5 herë dhe rezultatet finale janë prezantuar në intervale të besueshmërisë $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}$, ku \bar{x} është mesatarja aritmetike, s devijimi standard dhe $t_{1-\alpha}$ vlerat kritike të shpërndarjes së Studentit t (2.015) për numrin e dhënë të përcaktimeve në shkallë të besueshmërisë α prej 0.05 (95% të probabilitetit).

3.6 Procedura e punës dhe metodat e studimit

Tek të gjitha matjet eksperimentale metoda fillestare e studimit ka qenë voltametria ciklike me anë të së cilës janë analizuar efektet e modifikimit të sipërfaqeve të elektrodave, sjellja elektrokimike e analitëve etj. Amperometria hidrodinamike ka mundësuar të përcaktohen parametrat të cilat e diktojnë performancën e sensorit si potenciali operues, sasia e modifikuesit, shpejtësia e përzierjes, shpejtësia e rrjedhjes në rastin kur përdorim analizën me injektim në rrjedhje, rendin linear, kufirin e detektimit, informacione kinetike etj.

Gjatë matjeve eksperimentale me paracetamol është përdorur puferi fosfat 0.1M me pH prej 7.0 për shkak të efektit optimal katalitik për tirozinazën. Karakterizimi i biosensorit të zhvilluar më pas është bërë duke përdorur voltametrinë ciklike me përqendrim të paracetomolit 500 μM , shpejtësi të skanimit 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, potencial të skanimit nga -0.2 V deri +0.8 V, potencial fillestar 0 V, kërcimi i potencialit 5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Matjet amperometrike në sistemin me analizë në rrjedhje janë zhvilluar në potencial 0 V, shpejtësi të skanimit 0.6 mL min^{-1} . Puferi fosfat 0.01 M, pH

7.0 është përdorur edhe gjatë analizimit të sasive totale antioksiduese me elektrodën e llojit pastë karboni si biosensor elektrokimik. Studimet me voltometri ciklike janë zhvilluar duke përdorur potencial të skanimit fillestar 0 V nga -0.5 V deri në +1.3 V, kërcimi i potencialit $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, shpejtësi të skanimit $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Amperometria hidrodinamike është aplikuar duke përdorur potencial -0.25 V, shpejtësi të përzierjes 400 rpm. Testimet eksperimentale me elektrodën e diamantit janë zhvilluar në vëllim prej 10 mL në pufer fosfat $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH = 7.00, voltamogrami ciklik është skanuar duke filluar nga potenciali -0.4 V deri në potencialin +1.6 V, potenciali fillestar 0 V, kërcimi i potencialit 2.5 mV/ s , degazimi i tretësirës është bërë duke gurgulluar azot në tretësirë. Shpejtësia e skanimit ka qenë 50 mV/ s . Në amperometrinë hidrodinamike studimi është bërë duke imponuar potencial konstant tek elektroda e punës ndaj elektrodës referente. Potencialet në të cilat është bërë studimi kanë qenë nga +0.6 -+1.5 V. Pas matjeve janë ndërtuar lakoret e kalibrimit dhe është përzgjedhur rendi dinamik i përqendrimit ndaj sinjalit analitik. Gjithashtu me metodën e amperometrisë hidrodinamike është bërë edhe analiza e mostrave reale. Amperometria hidrodinamike është aplikuar duke sistemin me injektim në rrjedhje (FIA). Përndryshe për çdo ndryshim rreth kushteve të punës është përshkruar në secilën figurë të legjenda përkatëse.

3.6.1 Metodat referente për analizimin e mostrave reale

Për analizimin e mostrave reale janë përdorur edhe metoda analitike tjera referente në mënyrë që të sigurohet se performancë e sensorëve dhe biosensorëve është në rregull. Kromatografia e lëngët me presion të lartë është përzgjedhur si metodë referente për analizimin e paracetomolit. Performancë maksimale duke përdorur këtë metodë është arritur me anë të përdorimit të kolonës Ascentis Express C18 (150 mm x 3.0 mm, $2.7 \mu\text{m}$). Gjatësia valore e detektimit ka qenë 243 nm. Ndarja është realizuar duke përdorur fazën mobile e përbërë nga 0.3% acid formik në ujë (A) dhe metanol (B) me program të gradientit nga 20% deri në 40% B për 10 min në temperaturë konstante 30°C . Shpejtësia e rrjedhjes ka qenë 0.5 mL min^{-1} , vëllimi i injektimit $5 \mu\text{L}$. Për analizimin e polifenoleve në fruta është përdorur metoda shumë e popullarizuar e njohur si 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH). Analizë e mostrave të frutave me këtë metodë është realizuar duke transferuar $100 \mu\text{L}$ të ekstrakteve alkoolike të frutave në 5.0 mL DPPH me përqendrim $25 \mu\text{g/mL}$, dhe më pas është matur absorbancë në 515 nm. Kuptohet që paraprakisht janë përgatitur standardet duke përdorur troloksin. Tek analiza çokollatave nuk kemi përdorur metodë referente ngase jemi shërbyer me vlerat e deklaruara të kakaos në çokollata ku më pas është bërë krahasimi nëse vlerat i korrespondojnë sasive të deklaruara.

4. REZULTATET DHE DISKUTIMET

4.1. Karakterizimi elektrokimik dhe performanca analitike e biosensorit elektrokimik bazuar në elektrodën e printuar për përcaktimin e paracetamolit

Objekti kryesor i këtij studimi ka qenë zhvillimi i një sensori me selektivitet dhe sensitivitet të lartë i cili mund të përdoret në mënyrë universale në analiza të ndryshme farmaceutike dhe klinike. Në përgjithësi, disa kushte duhet të plotësohen. Biosensori duhet të jetë i aftë të përcaktojë përmbajtje shumë të ulët të analitit dhe të ofrojë përgjigje stabile për një kohë shumë të gjatë(i). Substancat tjera jashtë analitit nuk duhet të pengojnë sa më pak tek sinjali analitik (ii). Nëse është e mundur, ata duhet të prodhohen me kosto sa më të ulët(iii). Për sensorët amperometrik, është e nevojshme që elementi bionjohës (tirozinaza) të jetë më aftër shëndërruesit elektrokimik(elektrodës) që zakonisht është i modifikuar me substanca me sipërfaqe të madhe specifike dhe me përmbajtje katalitike. Siç u përmend më lartë, sipërfaqja e elektrodës duhet të jetë sa më e madhe [109, 110].

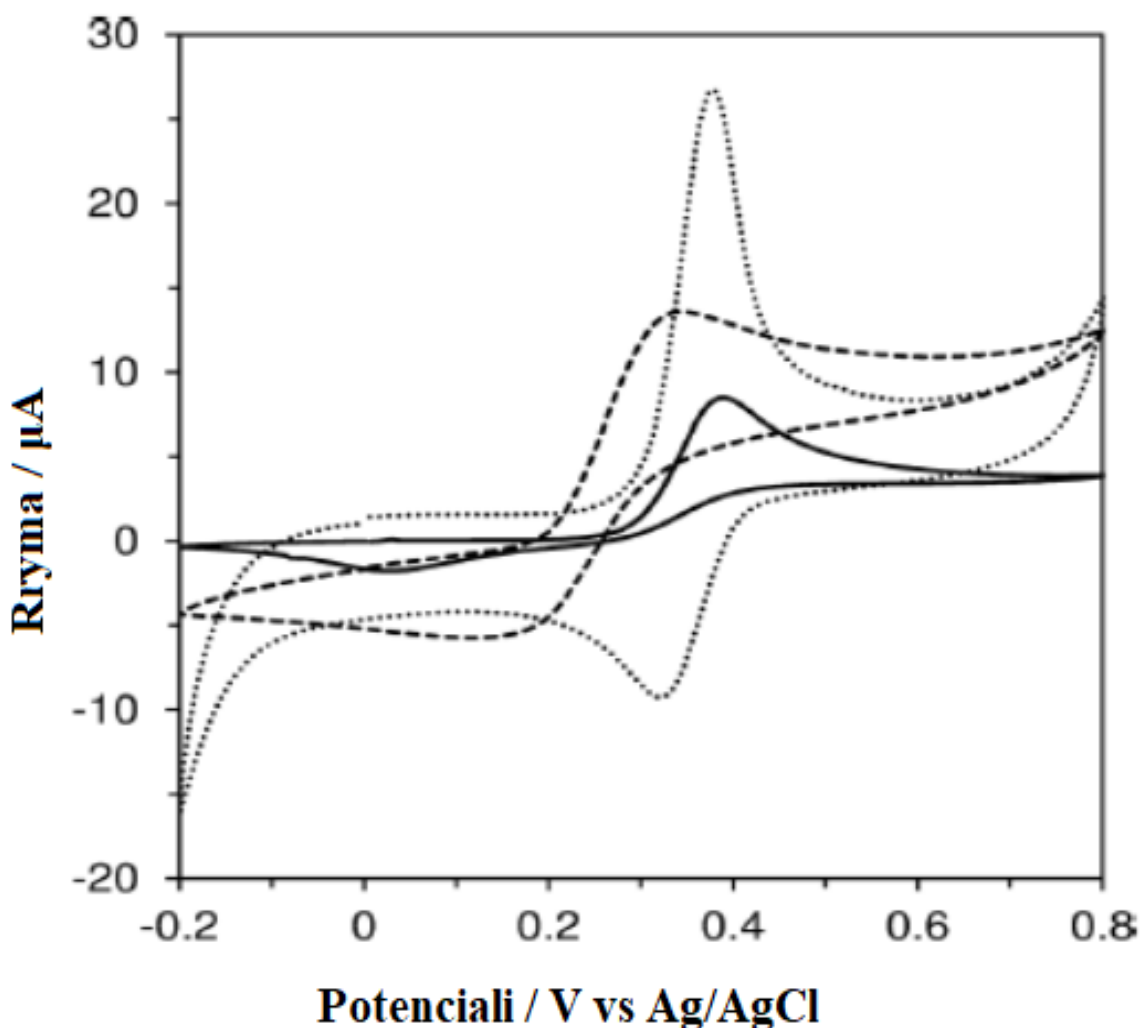


Figura 4.1 Voltamogrami ciklik i APAP me përqendrim $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ të elektroda e pamodifikuar SPCE(vija plotë), SPCE/MWCNT (vija e ndërprerë), dhe SPCE/NFG(vija me pika) realizuar në puferin fosfat $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.0, shpejtësi të skanimimit $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabela 4.1. Sjellja elektrokimike e paracetamolit në shëndërrues të ndryshëm amperometrik

| Sensori | E_p^a (mV) | E_{pc} (mV) | I_p^a (μ A) | I_p^c (μ A) | $\Delta E_p(E_p^a - E_p^c)$ | $ I_p^a/I_p^c $ |
|--------------------|--------------|---------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------|
| SPCE | 0.384 | 0.021 | 8.447 | 1.760 | 0.363 | 4.801 |
| SCOE/NFG | 0.378 | 0.323 | 24.742 | 6.380 | 0.055 | 3.878 |
| SPCE/SWCNTs | 0.338 | 0.152 | 13.584 | 5.642 | 0.186 | 2.408 |
| SPCE/MWCNTs | 0.339 | 0.151 | 13.571 | 5.613 | 0.187 | 2.418 |

Rezultatet me anë të voltametrisë ciklike për APAP me përqendrim 0.5 mmol L^{-1} në puferin fosfat $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.0, shpejtësi të skanimit $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Sipërfaqja e SPCEs është modifikuar me lloje të ndryshme të nanomaterialve të pa funksionalizuara të karbonit (CNs) për të fituar shëndërruesin amperometrik më idealin. Voltametria ciklike ka treguar që APAP ofron sjellje shumë më të mirë tek elektroda e llojit SPCE/NFG se sa në rastin e përdorimit të nanotubave të karbonit (CNTs), Figura 4.1.

Një sqarim për këtë ndryshim mund gjendet duke i krahasuar homogjenitetin e secilës sipërfaqe të këtyre nanomaterialve që varet nga rregullimi i CNs të përdorura. Vendosja e CNTs formon forma të parregullta me madhësi të ndryshme dhe janë ndërlidhura së bashku ku në një far mënyre e bllokojnë sipërfaqet aktive. Për këtë arsye sipërfaqja komplete aktive nuk mundet komplet të shfrytëzohet si në rastin e NFG që formojnë një strukturë pëlhure të trashë, sigurisht për shkak të bashkëveprimit të shtresave planare të grafenit [111, 112]. Në përgjithësi sipërfaqja është e karakterizuar me homogjenitet më të lartë se në rastin e CNTs. Për vendosje më efektive të enzimës (tirozinazës), janë testuar tre materiale polimerike të zakonshme: kitosani, acidi hialuronik në formë të kripës së natriumit dhe Nafioni®. Prezenca e kitosanit dhe acidit Hialuronik ka shkaktuar që të rritet për shumë herë rryma bazike se në rastin e përdorimit të nafionit. Për këtë arsye Nafioni® është përzgjedhur si materiali më i mirë polimerik për ta inkorporuar enzimën në sipërfaqe të elektrodës. Glutaraldehidi është përdorur për lidhur mes vete enzimës [113], dhe është parë që me shtimin e më shumë se $3 \mu\text{L}$ të tretësirës 1% shkakton rritje të shpejtë të rrymës bazike dhe zbret sinjali analitik në formë të rrymës elektrike.

Në mënyrë për ta parë elektrodën më të përshtatshme të punës, sjelljen elektrokimike të paracetamolit, studimi është bërë duke e përdorur voltametrinë ciklike. Nuk është vërtetuar ndonjë ndryshim i madh në mes të MCNTs dhe SWCNTs, Tabela 6.1. Figura 4.2 paraqet voltamogramet ciklike të fituara në rastet kur është përdorur SPCE, SPCE/NFG, dhe biosensori.

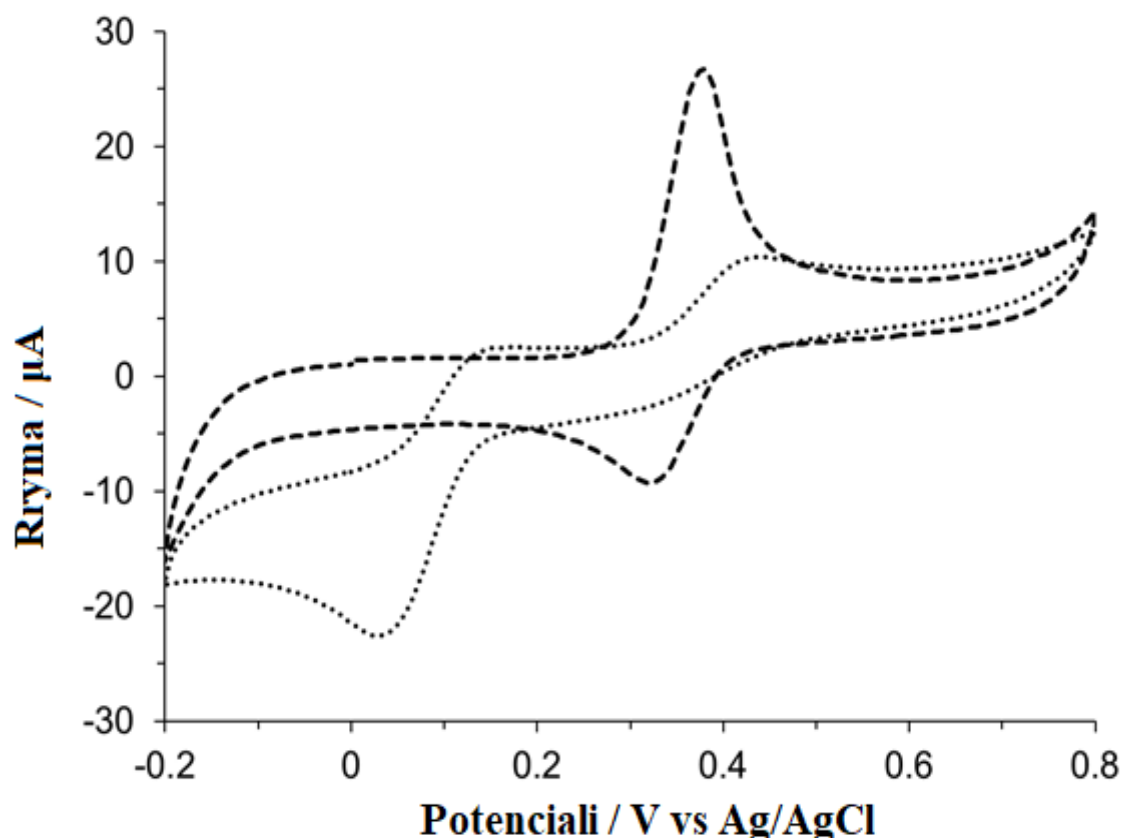


Figura 4.2. Voltamogrami ciklik i APAP me përqendrim $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ të elektroda e modifikuar me grafen (vija e ndërprerë), dhe elektroda e modifikuar me grafen dhe tirozinazë (vija me pika) realizuar në puferin fosfat $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0, shpejtësi të skanimit $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Paracetamoli i nënshtrohet reaksioneve të hidrosilimit në pozitën e lirë orto ku formohet produkti oksidues i mëvonshëm 4-acetamido-o-benzokinon (4-AOBQ) [13]. Kjo është rruga tipike e oksidimit elektrokimik të zëvendësuesve para të fenolëve kur përdoren elektrodën pastë karboni [14]. Reaksioni i sipërpërmendur i hidrosilimit dhe oksidimi i mëvonshëm i 4-acetamido-1,2-katekolit (3-OH-APAP) është dominues në prani të enzimës tirozinazë (EC 1.14.18.1) nga kërpudha *Agaricus bisporus* e cila katalizon këto procese oksidimi nga oksigjeni i tretur për shkak të aktivitetit të kresolazës dhe katekolazës (Fig. 4.3), ku produktet përfundimtare janë 4-AOBQ dhe uji. Për shkak të selektivitetit të biosensorit, ka qenë e rëndësishme që rryma katodike e reduktimit të 4-AOBQ të fillojë në potencial të lartë (+0.146 V) me sinjal maksimal të rrymës elektrike në potencialin (+0.04 V) ndaj pseudo-elektrodës referente Ag/AgCl (figura 4.1). Rrjedhimisht, përcaktimi amperometrik në potencialin konstant operues 0 V mund të përzgjidhet për përcaktimin e 4-AOBQ.

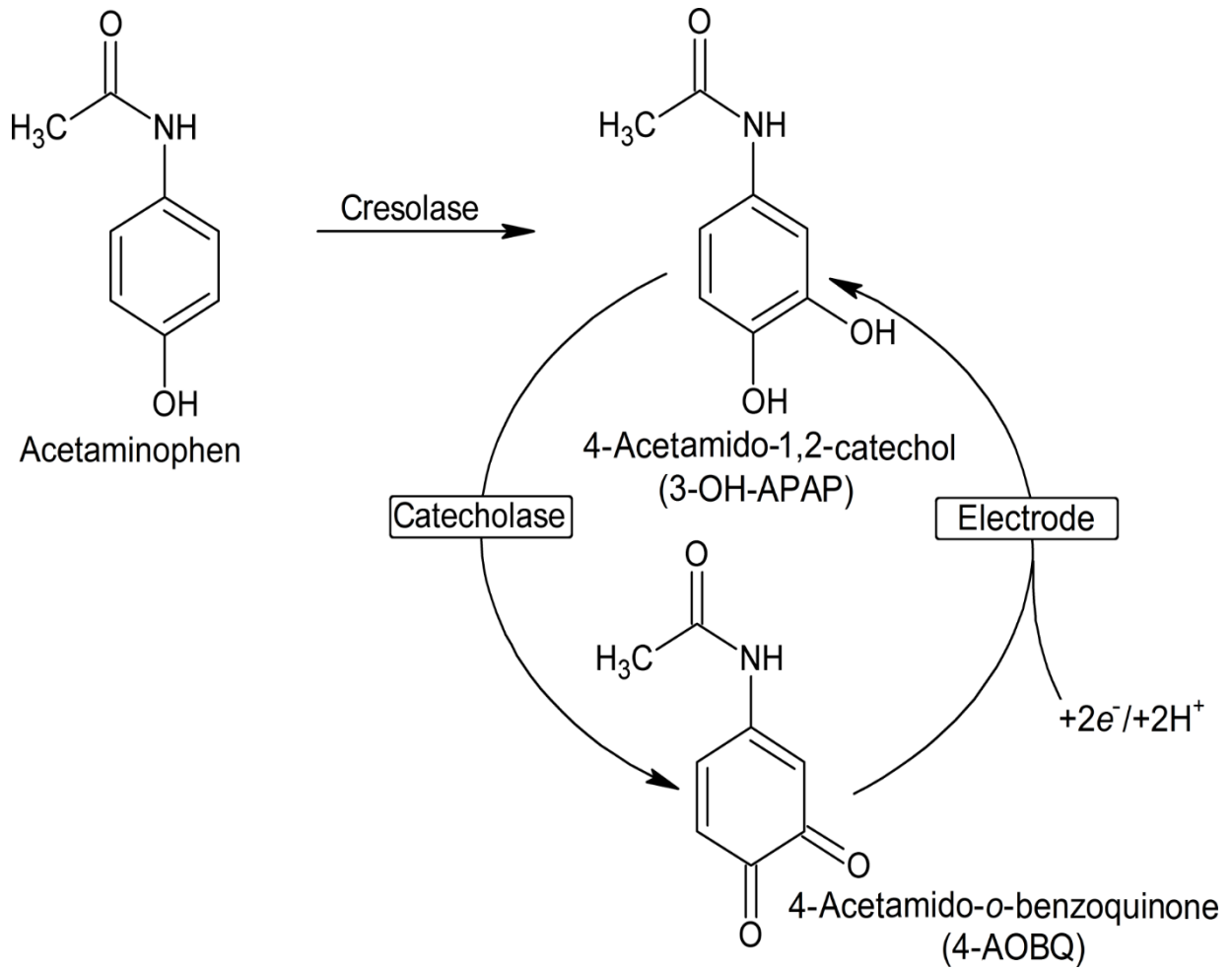


Figura 4.3 Efekti katalitik dhe oksidimi i paracetamolit nga tirozinaza.

4.1.1 Efekti i shpejtësisë së rrjedhjes në sistemin me analizë në rrjedhje

Shpejtësia e rrjedhjes parqet një prej faktorëve të rëndësishëm në sistemin me analizë në rrjedhje (FIA), ngase definon kohën për të cilën APAP qëndron në celulë në të cilën ndodh reaksioni kimik. Matjet janë realizuar në potencial $-0.1V$, shpejtësia e rrjedhjes është studiuar nga 0.2 deri $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ me përqendrim të APAP $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Gjetjet kanë treguar që shpejtësia e rrjedhjes deri në $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sinjali ka shkuar duke u rritur dhe më pas ka rënë gradualisht. Rrjedhimisht shpejtësia e rrjedhjes $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ është zgjedhur si optimale (Figura 4.4)

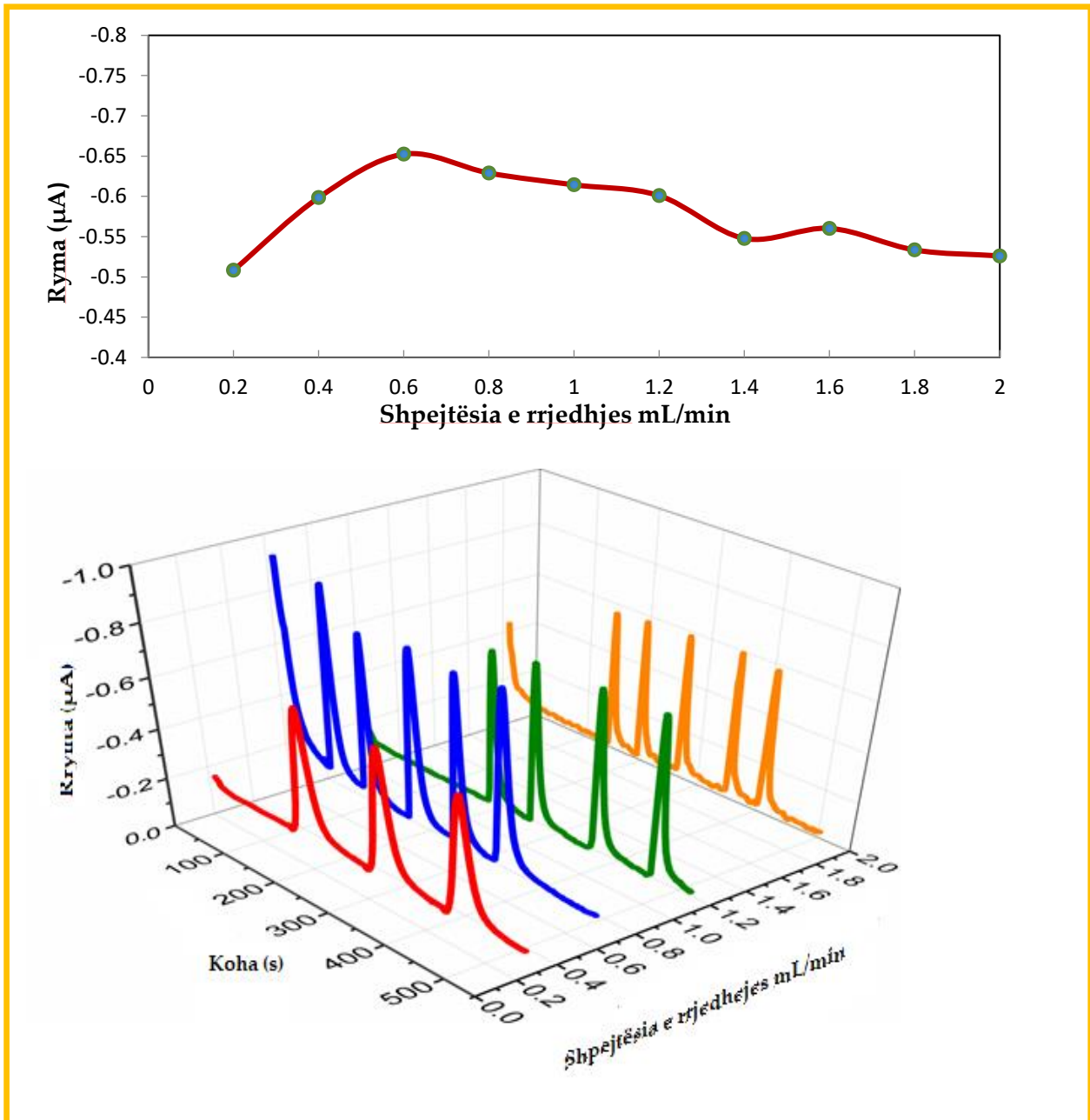


Figura 4.4. Efekti i shpejtësisë së rrjedhjes

4.1.2 Efekti i potencialit operues

Meqenëse potenciali operues duhet të mbahet konstant gjatë analizës, paraqet rolin kryesor në aplikimin amperometrik tek biosensorët [114]. Ky parametër thembësor ndikon në selektivitetin dhe sensitivitetin e metodës [115]. Efekti i aplikimit të potencialeve në vlera nga 0 deri në -0.3 V është studiuar në rast.

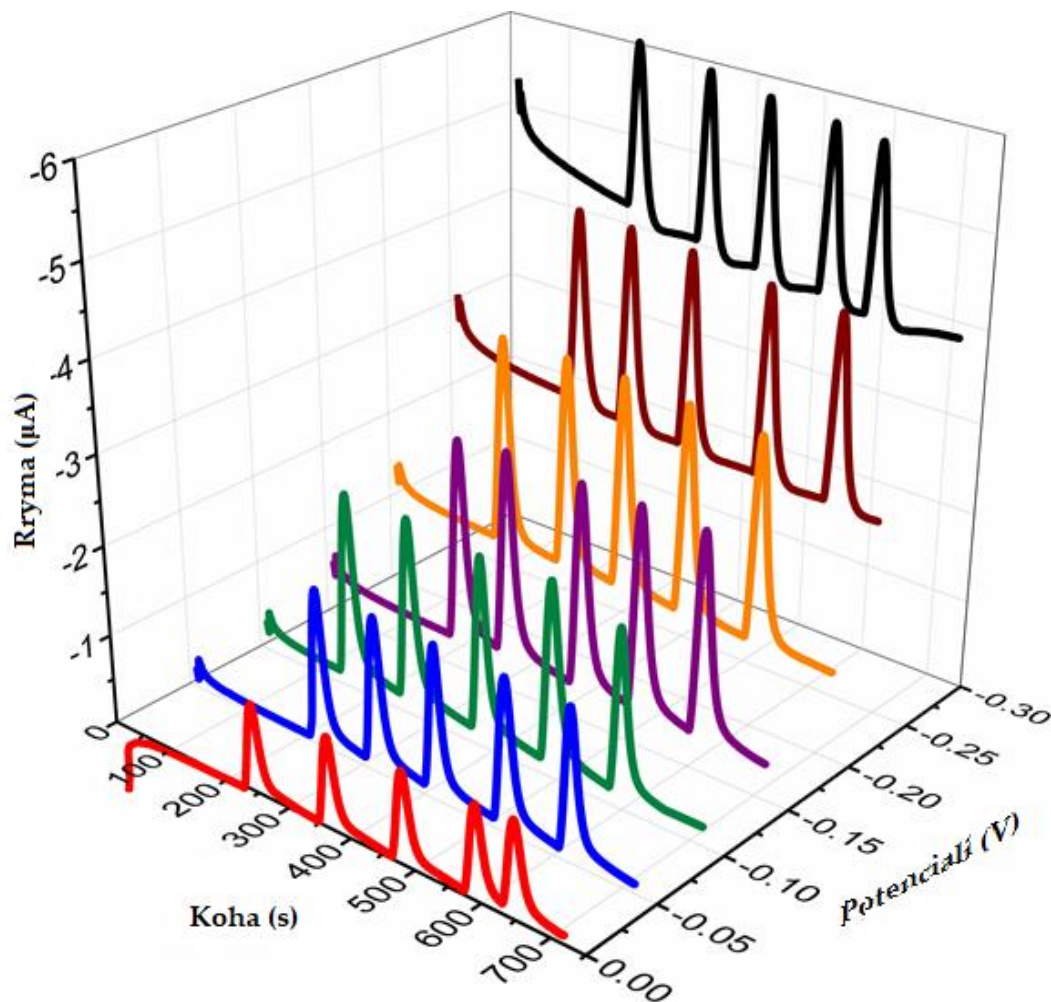


Figura 4.5 Efekti i potencialit operues. Elektroliti mbështetës puferi fosfat 0.1, pH = 7.0, vëllimi i injektimit 100 µL, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min⁻¹ dhe temperatura: 25°C.

Figura 4.5 tregon se në potencialet më të ulëta se -0.15 V nuk kemi ndonjë ngritje statistikisht të rëndësishme të sinjalit analitik. Për më tepër, është gjetur se rryma bazike rritet dukshëm në vlerat e potencialeve më të ulëta se -0.2 V. Prandaj mund të përfundohet se vlera -0.15 V është potenciali operues optimal. Kjo vlerë e potencialit mund të përdoret për përcaktimin e APAP në formulime farmaceutike, ngase këto formulim nuk përmbajnë substanca që interferojnë

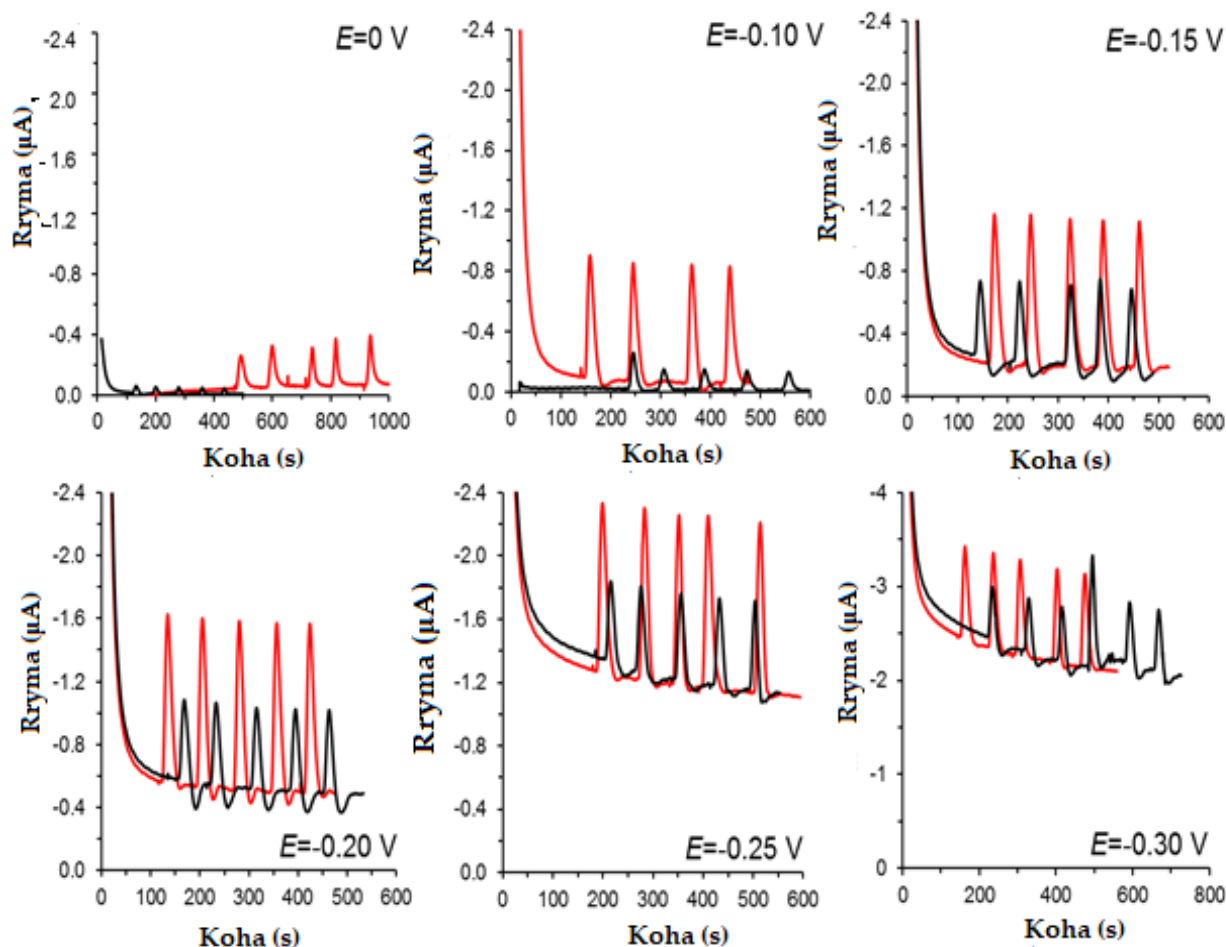


Figura 4.6 Amperogramet e fituara në systemin FIA gjatë pesë injektiveve të tretësirës së holluar të urines(zi) dhe tretësirës cila përmban $50 \mu \text{ mol L}^{-1}$ APAP (kuq), në potencialle të ndryshme të punës. Elektroliti mbështetës puferi fosfat 0.1, pH = 7.0, vëllimi i injektimit $100 \mu \text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

dukshëm në matjet analitike siç janë amidoni, acidi stearik, Povidone K-30 (polivinilpirrolidon, PVP), kroskarmelozë e natriumit.. Megjithatë ky potencial operues nuk mund të aplikohet për mostrat e urinës ngase në këto mostra kemi matriks shumë kompleks.

Për ta përcaktuar potencialin operues optimal për analizimin e mostrave të urinës është marruar mostër e tillë dhe është shtuar paracetamol me përqendrim $50 \mu \text{ mol L}^{-1}$ (vija e kuqe).

Ky përqendrim nuk është përzgjedhur rastësisht ngase marrim APAP nga tabletat 500 mg, duke llogaritur se 2% e kësaj mase nuk ndryshon në gjatë qëndrimit në organizëm mund të pritët që kjo masë në urinë të ketë përqendrim $\sim 50 \mu \text{ mol}$ për litër [116]. Vetë urina ofron sinjal të rrem për shkak të reduktimit elektrokimik të metabolitëve elektroaktiv ne urinë (vija e zezë). Ky lloj sinjali rritet duke e me rritjen e potencialit operues në vlera negative siç paraqitur në Fig. 4.7. Vetën në potencial 0 V përgjigjja e rrymës në urinën e pastër nuk ka qenë me e lartë se sa devijimi standard i pesë matjeve të përsëritura të urinës me shtesë të paracetamolit (Fig. 4.7). Për këtë arsye potenciali operues 0 V është përzgjedhur si optimali për ta përcaktuar paracetamolnë në mostër të urinës.

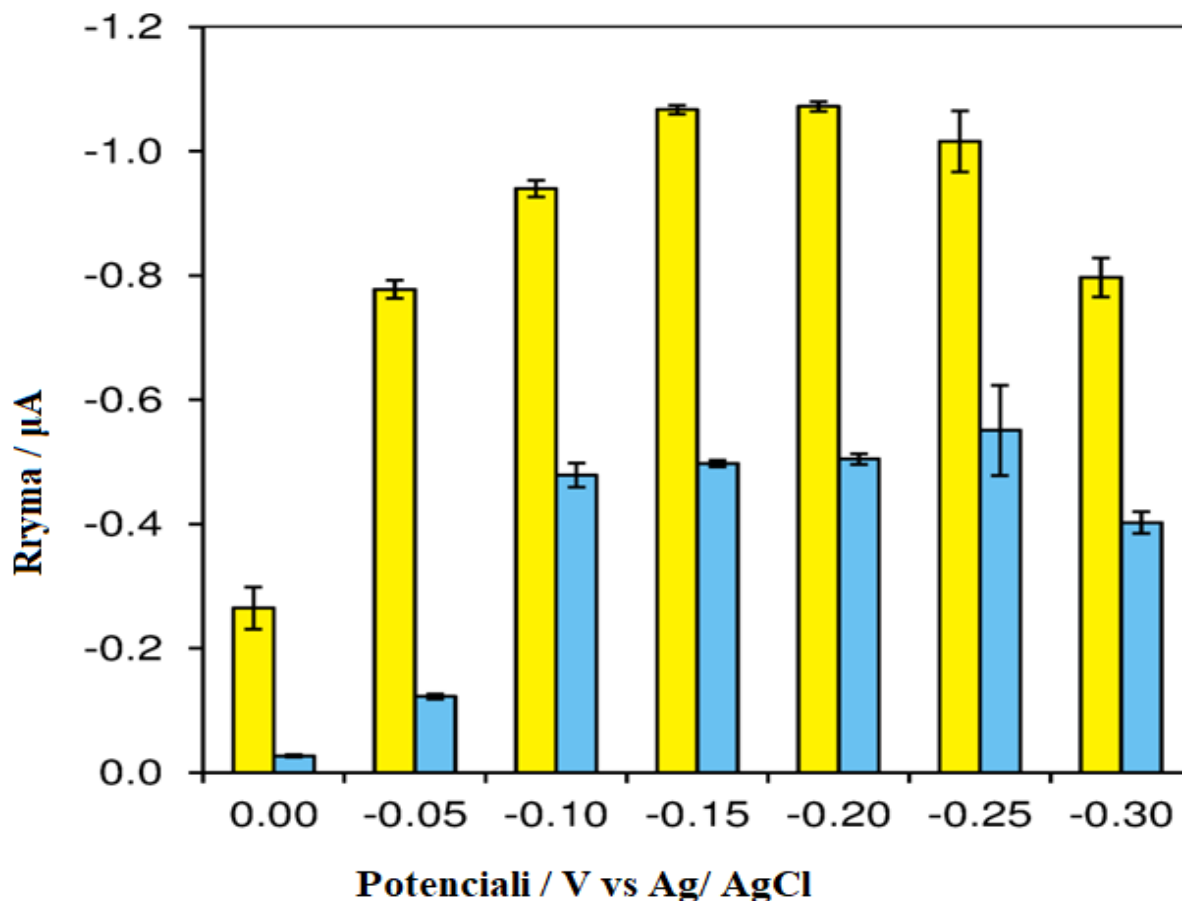


Figura 4.7 Sinjali amperometrik për urinën e pastër (kaltër) dhe urinën me $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ paracetamol (verdhtë). Elektroliti mbështetës puferi fosfat 0.1M , $\text{pH} = 7.0$, vëllimi i injektimit $100 \mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

6.1.3 Efekti i vlerës pH

Ndikimi i pH është studiuar në vlera nga 6 deri në 8. Ky interval është përdorur ngase këtu kemi efektin më të madh katalitik të enzimës. Rezultatet kanë treguar që efekti më i lartë katalitik është arritur në $\text{pH} 7.0$, që është në korrelacion me studimet paraprake [117, 118].

6.1.4 Përformanca e sistemit

Përformanca e sistemit të propozuar është studiuar në potencialin operues optimal. Limiti i detektimit (LOD) dhe ai i kuantifikimit (LOQ) janë llogaritur sipas ekuacionit $LOD = 3 s/k$ dhe $LOQ = 10s/k$, respektivisht, s paraqet devijimin standard për pesë përsëritje ($n = 5$) në përqendrimet të paracetamolit $5 \mu\text{M}$ dhe k paraqet pjerrtësinë e drejtëzës kalibruese. Një amperogram tipin i fituar në sistemin (FIA) është paraqitur në Fig. 4.8, ku është aplikuar potenciali operues -0.15 V . Rendi linear në përqendrime nga $4.0 - 130 \mu\text{mol L}^{-1}$ është paraqitur si më i miri në këto kushte, kufi të detektimit $LOD = 1.1 \mu\text{mol L}^{-1}$, tek potenciali operues 0 V , $3.0 - 90 \mu\text{mol L}^{-1}$ me $LOD = 0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ në potencial operues -0.1 V , dhe $1.5 - 70 \mu\text{mol L}^{-1}$ me $LOD = 0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ në potencial operues -0.15 V .

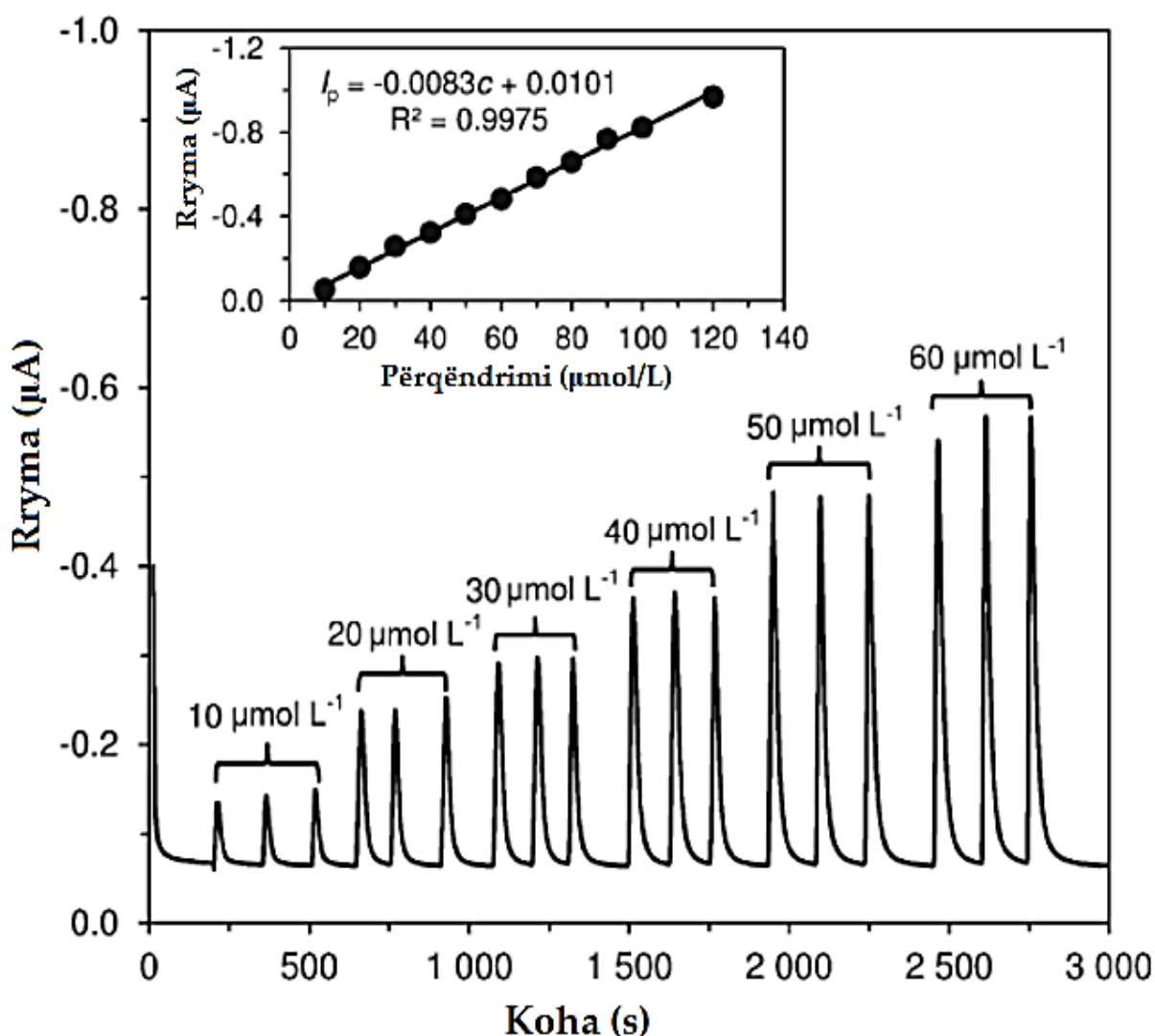


Figura 4.8 Sinjali amperometrik gjatë shtimit të paracetamolit në përqendrimet të ndryshme, në potencial operues 0 V . Elektroliti mbështetës puferi fosfat 0.1 , $\text{pH} = 7.0$, vëllimi i injektimit $100 \mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C .

Ekuacioni i parë i përshkruar ka vlerat $I_p = -0.0083c + 0.0101$ me koeficient të korrelacionit $r = 0.9987$ është përdorur për ta përcaktuar APAP në mostrat model, dy llojet e tabletave dhe në urinën e njeriut (Fig. 4.9).

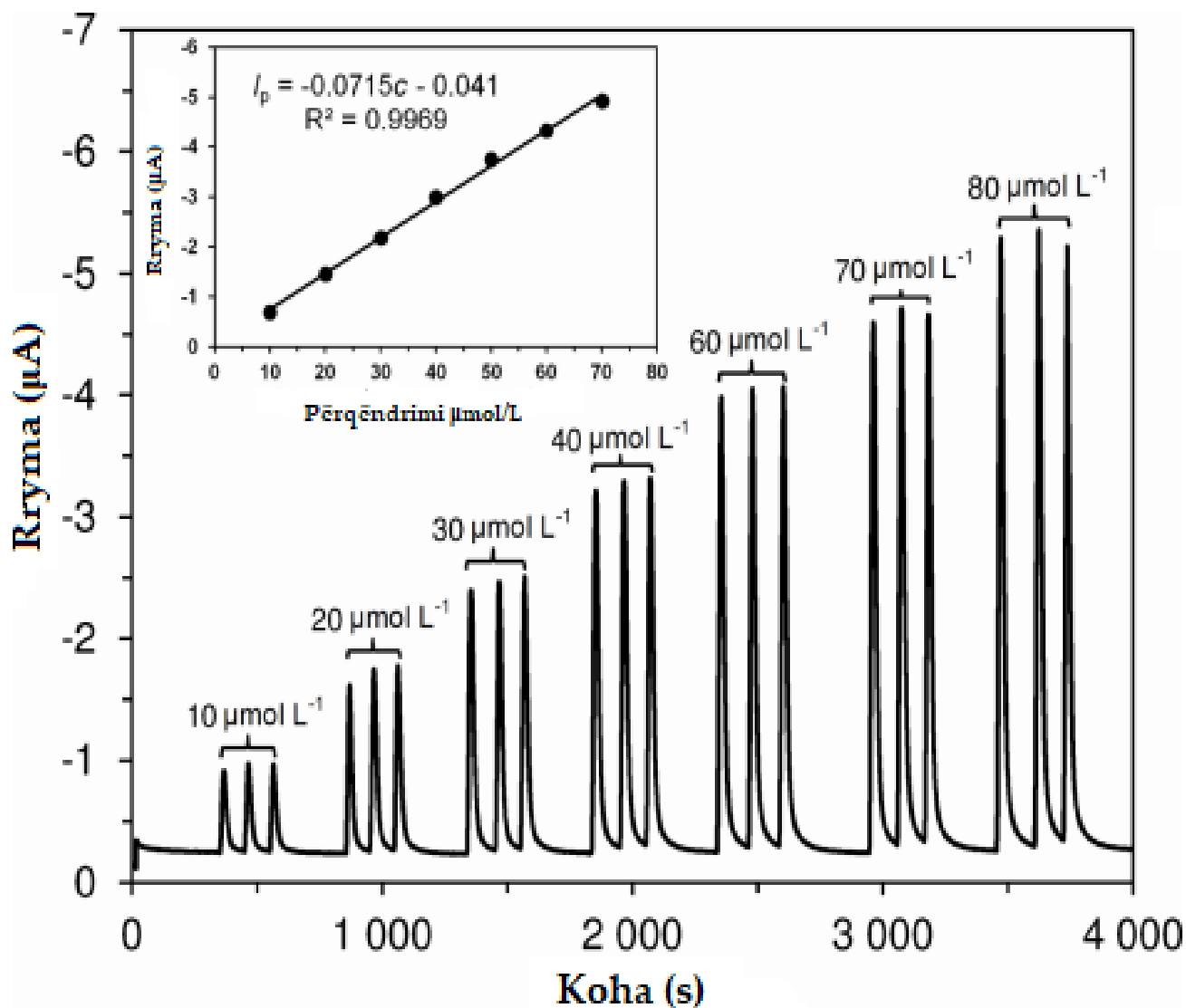


Figura 4.9 Sinjali amperometrik gjatë shtimit të paracetamolit në përqendrime të ndryshme, në potencial operues -0.15 V. Elektroliti mbështetës pufër fosfat 0.1 mol ·L⁻¹, pH = 7.0, vëllimi i injektimit 100 µL, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min⁻¹ dhe temperatura: 25°C.

Në krahasim me biosensorët tjerë të zhvilluar (Tabela 4.2), duhet theksuar se progres thelbësor në ndjeshmëri është arritur në potencialin operues - 0.15 V.

Tabela 4.2. Prezantimi dhe krahasimi i disa biosensorëve elektrokimik për përcaktimin e paracetamolit.

| Lloji i sensorit | Material i biologjik | Limiti i detektimit (LOD) (μM) | Rendi linear (μM) | R^2 | Referenca |
|---|----------------------|---|--------------------------------|--------|-----------|
| CPE/avokado-PPO | Fruta dhe perime | ----- | 120–5800 | 0.9927 | [17] |
| CPE/patëllgjanin e zi-PPO | | 5 | 20-200 | ---- | [18] |
| CPE/bananë-PPO/hidrogjel | | 1.6 | 10–250 | 0.995 | [19] |
| CPE/juruba-PPO | | 3 | 5-245 | 0.9994 | [20] |
| CPE/kungulleshë-PPO | | 69 | 120-2500 | 0.9965 | [21] |
| SPCE/aril-acilamidazë | Enzima | -- | 0–2800 | 0.999 | [22] |
| ACeO ₂ @GNR/IJPCNT | | 0.18 | 1-100 | 0.9987 | [23] |
| CPE/TiO ₂ /LAC | | 1 | 8-120 | 0.997 | [24] |
| GC/MWCNT/LAC | | 7 | 10-320 | 0.994 | [25] |
| Au/PANI-cMWCNT/Bacillus sp./GA | Bakterie | 2.9 | 5-630 | 0.995 | [26] |
| SPE-CoPC/tyrosinase | Enzimë | 0.5 | 1.6-40 | --- | [27] |
| Elektroda e diamantit e dopuar me bor(BDDE) | /// | 7.1 | 20-400 | 0.999 | [28] |
| Au/cistinë/ADN | Acid nukleik | 7.8 | 65-730 | 0.997 | [29] |

CPE – Elektroda pastë karboni, PPO-Polifenol oksidazë, MWCNT – Nanotuba të karbonit shumë shtresor, SPCE- electrode e prontuar nga e karbonit, PANI – Polianilina, CoPC – Kobalt ftalocianinë, SPE – electrode e printuar, ACe-amidazë cerium, O₂@GNR – dioksid grafeni, IJPCNT- nanotuba të printuar, LAC-lakaza, GC-karboni qelqor.

Biosensorët ekzistues të bazuar në enzima të ndryshme nuk sigurojnë një përzgjedhje të tillë për t'u përdorur në analizën e urinës njerëzore. Biosensorët enzimatikë të raportuar më parë janë përdorur në përcaktimin e APAP vetëm në formulimet farmaceutike [119-120].

Tabela 4.3. Stabilizimi i sinjalit tek biosensori i ri.

| Sensori | Koha [min] | Sensitiviteti relativ [%] | RSD [%] |
|-----------|---------------|---------------------------|---------|
| Biosensor | 0(sensori ri) | 100 | 9.64 |
| Biosensor | 15 | 90.65 | 6.78 |
| Biosensor | 28 | 68.94 | 6.45 |
| Biosensor | 38 | 66.26 | 1.93 |
| Biosensor | 45 | 66.53 | 2.01 |
| Biosensor | 50 | 66.43 | 1.95 |

Biosensori i sapo përgatitur ka treguar sjellje të paqëndrueshme për shkak të enzimës, e cila nuk është inkorporuar plotësisht në sipërfaqen e elektrodës. Pas gjysmë ore janë fituar pike konstante të rrymë elektrike me devijim standard relativ (RSD) më pak se 2% pasi që është bërë shpëlarja e enzimës së pa inkorporuar (Tabela 4.3). Pas kësaj kohe nuk është vërejtur zbritje e ndjeshme e sinjalit amperometrik.

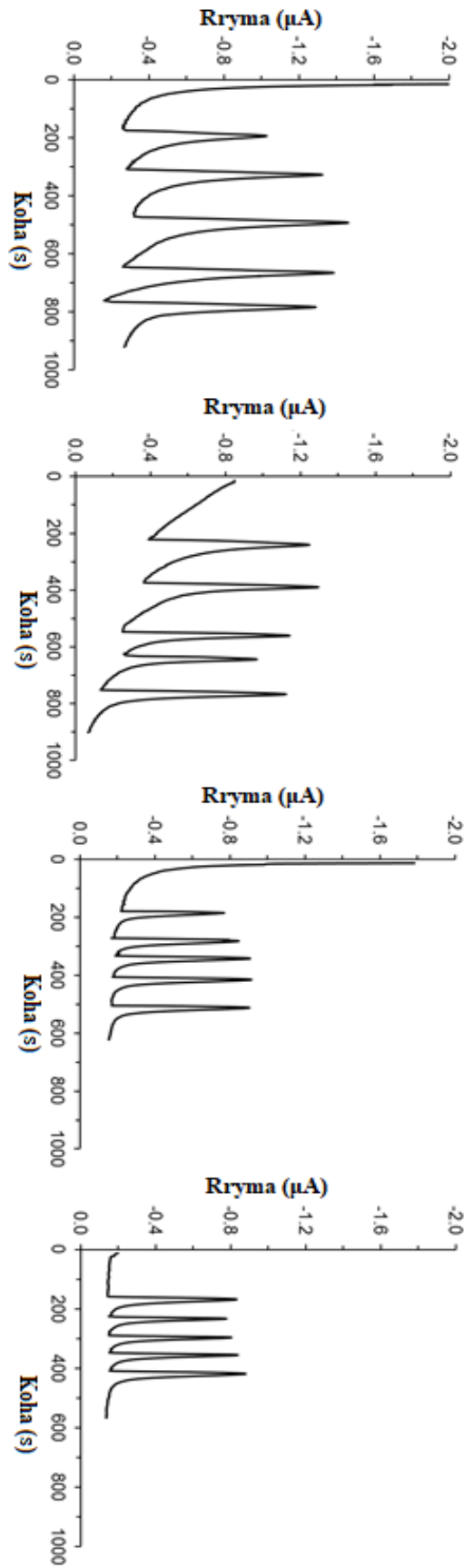


Figura 4.10. Procesi i stabilizimit të elektrodës gjatë largimit të enzimës së pa inkorporuar.

Në Figurën 4.10 mund të vërehet qartë stabiliteti e sinjalit, ndërsa riprodhueshmëria ka qenë e mjaftë e mirë me vlera të RSD = 1.9%.

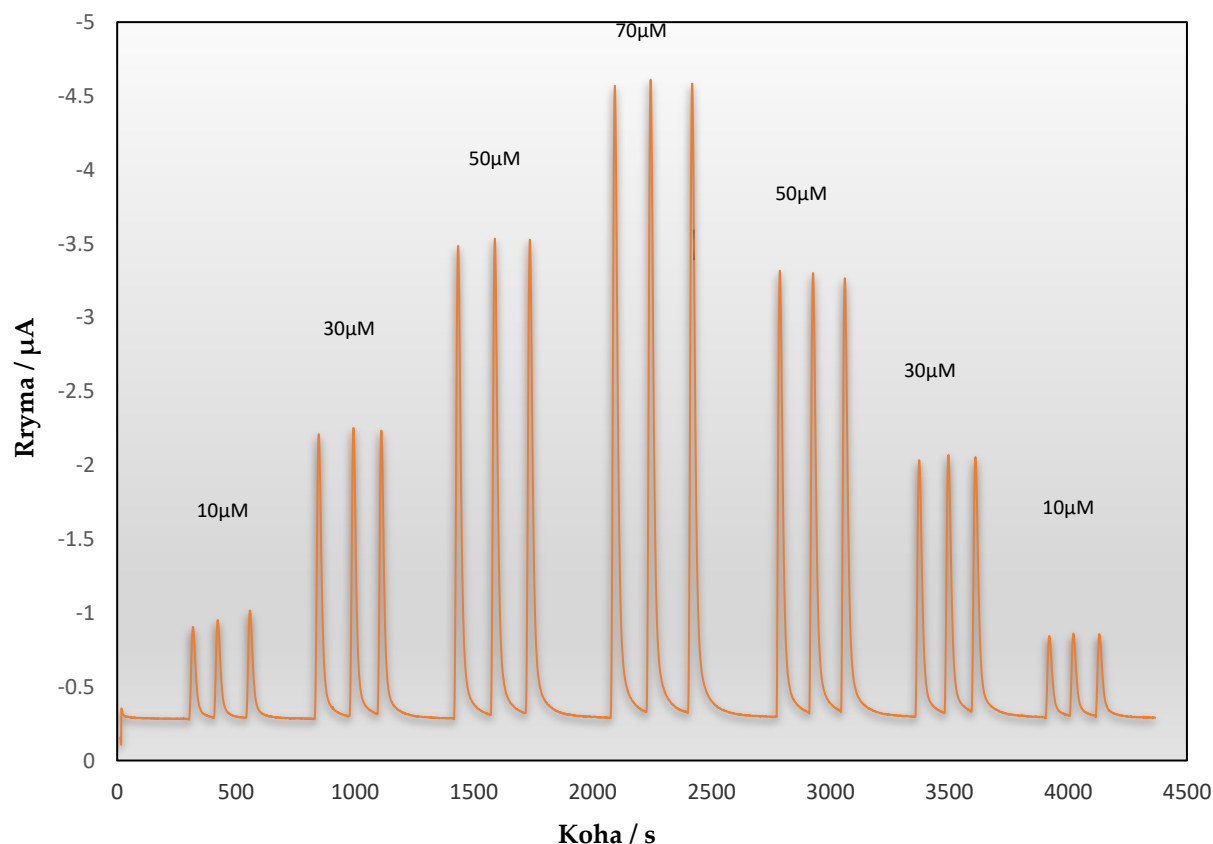


Figura 4.11 Amperogram i fituar në sistemin FIA si rezultat i injektimit të tretësirës së paracetamolit me përqendrim të ndryshme në potencial -0.15 V. Elektroliti mbështetës puferi fosfat $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$, vëllimi i injektimit $100 \text{ } \mu\text{L}$, shpejtësia e rrjedhjes: 0.6 mL min^{-1} dhe temperatura: 25°C

Një parametër tjetër i rëndësishëm është koha e përgjigjes që zakonisht në celulën thjeshtë elektrokimike është me shpejtë se sa në sistemin FIA. Koha e përgjigjes varet nga distanca e injektorit nga celula elektrokimike dhe shpejtësia e rrjedhjes. Duke i ditur këta dy faktor mund të llogaritet edhe ky parametër që në këtë rast ka qenë më pak se 5 s.

Karakteristike për biosensorët nga tirozinaza është jetëgjatësia e shkurt e tyre [69, 121]. Prandaj, një studim bazë për jetëgjatësinë e biosensorit është realizuar për të gjetur nëse biosensori i zhvilluar mund të përdoret në analizat rutinë farmaceutike dhe klinike. Në përgjithësi, mund të thuhet se një biosensor i sapo përgatitur mund të përdoret për analiza gjatë një dite të tërë. Problemi kryesor mbetet ruajtja e biosensorit. Kjo çon në një rënie të ndjeshme të ndjeshmërisë. Stabiliteti i sistemit është vlerësuar duke injektuar çdo ditë $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP ($n = 5$). Gjatë 6 ditëve të para, sinjali amperometrik i produktit enzimatik është ulur ndjeshëm, duke vazhduar edhe me tej të ulet dhe më në fund në ditën e 12 -të është bërë i qëndrueshëm (Fig. 4.12). Duhet të jetë e qartë se ndjeshmëria zvogëlohet ndjeshëm me “plakjen” e biosensorit. Nga pikëpamja praktike, nuk ka asnjë problem për të përdorur një elektrodë tashmë të përgatitur, dhe para çdo analize të vendoset enzimë e freskët e tirozinazës. Për më tepër, duhet të përmendet se

komercialisht janë të disponueshme elektrodën e printuara me grafen që e bënë me të lehtë përgatitjen e biosensorit dhe për më tepër e zbeh problemin e jetëgjatësisë së tij.

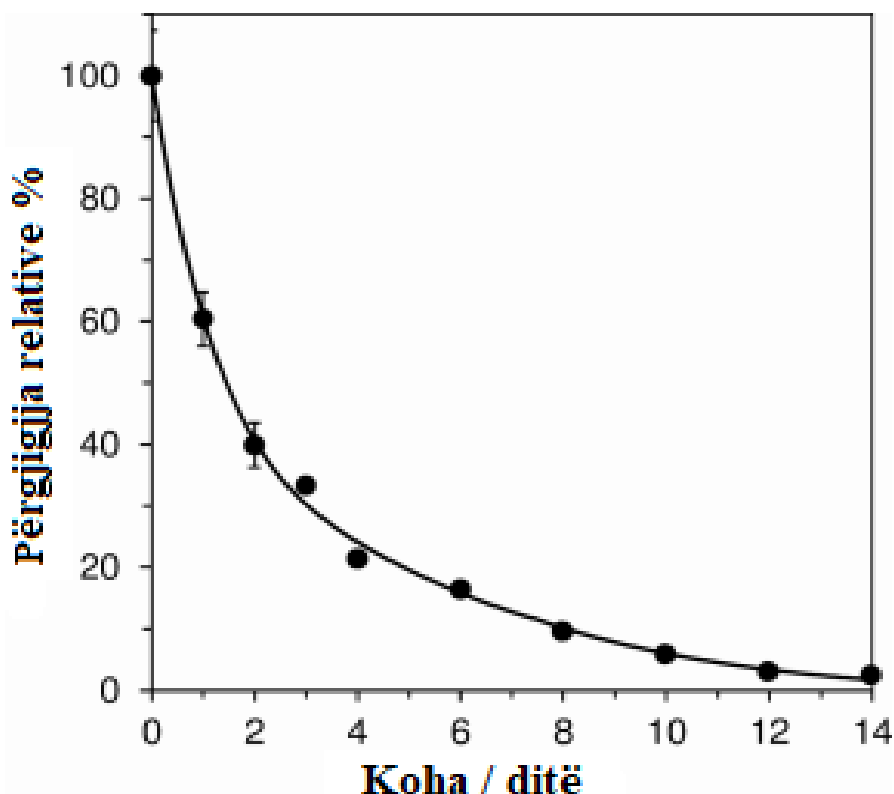


Figura 4.12 Jetëgjatësia e biosensorit

Në përmbajtjet e tabletave farmaceutike zakonisht kemi niseshte misri, PVP, natriumi kroskarmelozë dhe acid stearik. Këto komponime nuk mund të klasifikohen si pengesa gjatë matjeve sepse nuk i nënshtrohen asnjë reaksioni elektrokimik në potencialet e aplikuara të punës. Kështu, janë zhvilluar metoda të shumta të drejtpërdrejta voltametrike për përcaktimin e APAP në formulimet farmaceutike [122-124]. Në rastin e urinës situata është pak më e komplikuar, por për faktin se biosensori është o aftë të punojë në potencialin 0 V ku mundësi e reduktimit ose oksidimit të një substance tjetër është shumë e vogël ka bërë që dhe këtu interferencat mos të paraqesin pengesë. Kjo edhe mund të argumentohet ngase vlera e sinjalit amperometrik në rastin e testimit të urinës së pastër ka qenë më e ulët se devijimi standard ($n = 5$) i APAP me përqendrim $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ si shtesë në mostrën e urinës.

6.1.5 Analiza e tabletave farmaceutike dhe urinës

Para analizës së mostrave reale, ka qenë e nevojshme të përcaktohej saktësia e sistemit të propozuar. Saktësia paraqet përputhjen midis përqendrimit real të analitit dhe atij të gjetur nga një metodë analitike e përdorur. Ky parametër analitik shpesh verifikohet duke përdorur analizën e një mostre modeli (“recovery”), sasinë e deklaruar, ose duke e krahasuar me një metodë referimi të bazuar në një parim tjetër fiziko - kimik. Të dyja qasjet e përmendura janë përdorur për vërtetimin e saktësisë. Një rikuperim me vlera prej 3.8% të RSD është arritur të fitohet nga pesë përsëritje për FIA të një mostre model, që përmbante $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP. Para analizës, mostra e model duhej të holllohej dhjetëfish duke përdorur PB. Edhe pse kjo punë

i kushtohet analizës së urinës njerëzore, ishte e udhës që së pari të testohet biosensori në analizën e preparateve farmaceutike, veçanërisht të tabletave.

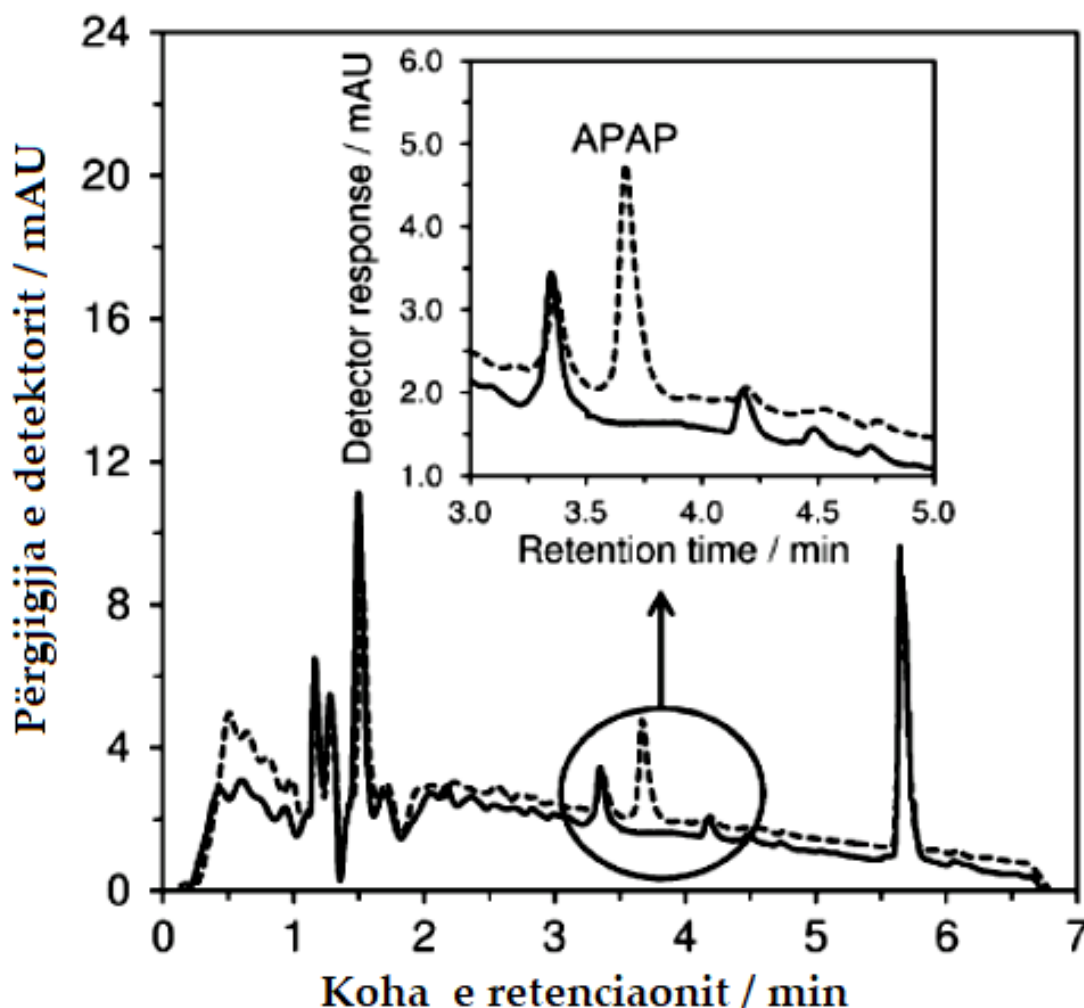


Figura 4.13. Kromatogrami i fituar gjatë analizës së mostrës së urinës së pastër me HPLC (vija e plotë) dhe urinës që përmban $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ paracetamol (vija e ndërpresë). Është përdorur kolona Ascentis Express C18 (150 mm x 3.0 mm, $2.7 \mu\text{m}$). Gjatësia valore e detektimit ka qenë 243 nm. Ndarja është realizuar duke përdorur fazën mobile e përbërë nga 0.3% acid formik në ujë (A) dhe metanol (B) me program të gradientit nga 20% deri në 40% B për 10 min në temperaturë konstante 30°C . Shpejtësia e rrjedhjes ka qenë 0.5 mL min^{-1} , vëllimi i injektimit $5 \mu\text{L}$.

Një protokoll i përshkruar më parë për analizën e urinës duke përdorur HPLC është modifikuar pak duke ndryshuar parametrat e eluimit me gradient për të parandaluar shpëlarjen e substancave shoqëruese që ekzistojnë në matricën e mostrës në të njëjtën kohë me analitin (Fig. 4.14). Tretësirat standarde ($3.0\text{--}50 \text{ mg L}^{-1}$) për kalibrim janë përgatitur duke e holluar APAP në metanol. Drejtëza kalibruese është përshkruar me këtë ekuacion: $A [\text{mAU}] = 17,610.82 + 35,118.84c [\text{mg L}^{-1}]$ me korrelacion $r = 0.9993$. Siç shihet në tabelën 6.4 biosensori i zhvilluar ka rezultate të krahasueshme me metodat referente të zgjedhura me vlera të “recovery” 97.4% ($n = 5$).

Tabela 4.4 Krahasimi i rezultateve të FIA-s me ato të HPLC për mostrat farmaceutike dhe atë të urinës

| Mostra | FIA | HPLC | Deklaruar |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Model | $242 \pm 19 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $244 \pm 9 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ |
| Paralen® 500 | $490 \pm \text{mg}$ për tabletë | $491 \pm 16 \text{mg}$ për tabletë | 500 mg për tabletë |
| Tylox® 750 | $725 \pm \text{mg}$ për tabletë | $745 \pm \text{mg}$ për tabletë | 750 mg për tabletë |
| Urinë ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ APAP) | $52 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $51 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ |

Të gjitha analizat e përzgjedhura janë përsëritura 5 herë dhe rezultatet finale janë prezantuar në intervale të besueshmërisë $\bar{x} \pm st1-\alpha$, ku \bar{x} është mesatarja aritmetike, s devijimi standard dhe $t1-\alpha$ vlerat kritike të shpërndarjes së Studentit t (2.015) për numrin e dhënë të përcaktimeve në shkallë të besueshmërisë α prej 0.05 (95% të probabilitetit).

4.2. Karakterizimi elektrokimik dhe performanca analitike e biosensorit elektrokimik bazuar në elektrodën e pastër karboni për përcaktimin e polifenoleve

Në mënyrë që të bëhet analiza e frutave për përmbajtjen e polifenoleve dhe duke u mbështetur edhe në artikujt paraprak [125, 126], është dashur të bëhen dhe disa optimizime të kushteve të punës siç është shpejtësia e përzierjes, potenciali operues, vlera pH e elektrolitit mbështetës në etj. Për më tepër disa karakteristika tjera lidhur me elektrodën janë shtuar. Nga studimi paraprak [126] është vërtetuar se elektroda pastër karboni e modifikuar me nanotuba shumë shtresor tregon të ketë sensitivitet më të lartë se elektroda e pastër për shkak se elektroda e modifikuar ka sipërfaqe specifike më të lartë, elektronet transferohen më shpejtë. Gjithashtu përzierja e enzimës me nafion ka treguar stabilitet të lartë në sipërfaqen CNTs për shkak të strukturës fibroze të polimerit duke depërtuar në tufën e nanotubave të karbonit. Karakteristika e sipërfaqes së elektrodës së modifikuar me nanotuba të karbonit dhe atë të pa modifikuar është analizuar duke përdorur SEM (Fig. 4.14).

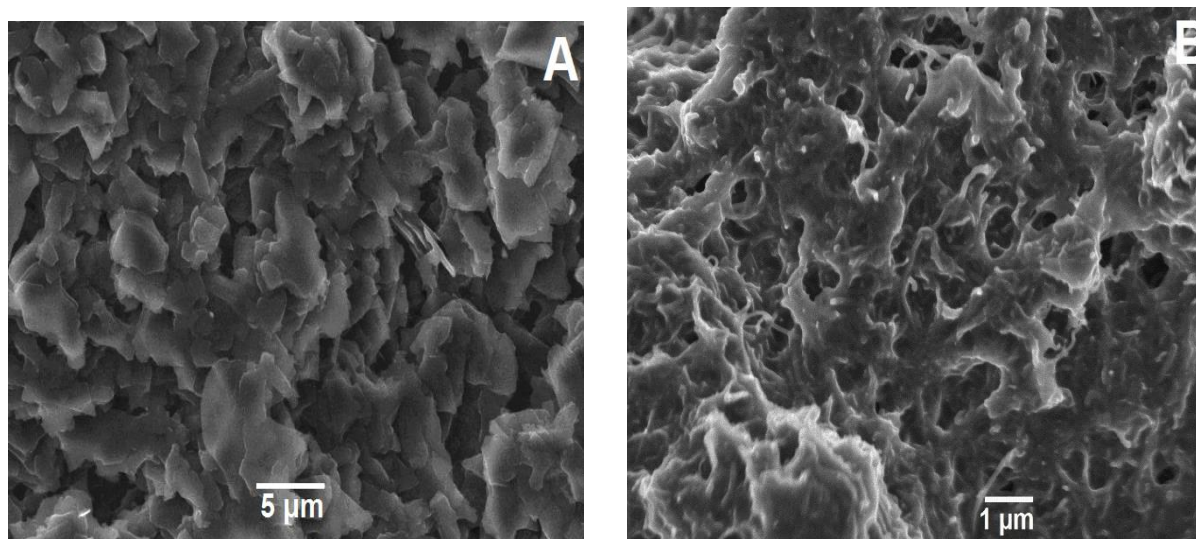


Figura 4.14 Fotografitë e fituara nga SEM për elektrodën e pastër (A) dhe elektrodën e modifikuar me nanotuba të karbonit (B)

4.2.1 Konstruktimi i biosensorit

Efektet katalitik të tirozinazës kundrejt Troloksit në krahasim me 1,2-dihidroksibenzenet është shumë më i ulët dhe për këtë arsye nuk mund të ndërtohet biosensor i thjeshtë [59]. Kjo tregon që sasia e produktit të oksiduar të Troloksit në sipërfaqen e elektrodës për është i vogël, dhe për ta konstruktuar një biosensor të tillë duhet një sipërfaqe specifike më e madhe në mënyrë që të rritet sinjali analitik. Kjo mund të arrihet duke përdorur nanomaterialë të karbonit siç janë nanotubat e karbonit shumë shtresor të cilat jo vetëm që e rritin sipërfaqen aktive por edhe transferimi i elektroneve është më i shpejtë.

Gjashtë përqendrime të ndryshme (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, dhe 3.0 mg mL⁻¹) të MWCNT në DMF janë përgatitur dhe vëllimi prej 20 µL është aplikuar për imobilizimin e MWCNT në sipërfaqen e CPEs. Elektrodën CPE/MWCNT janë krahasuar më pas duke përdorur voltmetri ciklike ku përqendrimi Troloksit ka qenë 500 mol L⁻¹. Siç tregohet në Figurën 6.15, në përqendrimin 2 mg mL⁻¹ kemi sinjalin maksimal dhe ky përqendrim është përzgjedhur i optimi për matjet e tjera.

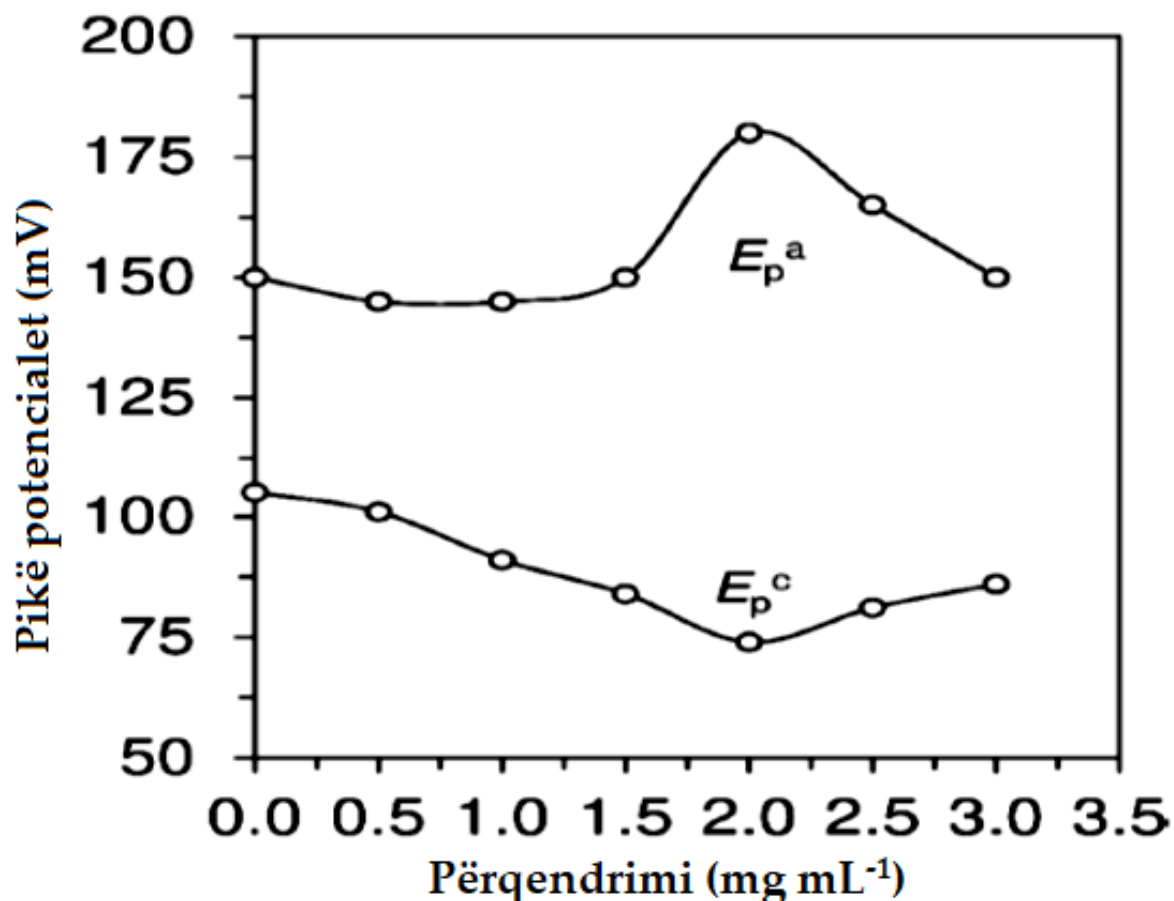


Figura 4.15 Efekti i sasisë së natotubave të karbonit të disperguara në DMF në piket e rrymave anodike (E_p^a) dhe atyre katodike (E_p^c) në përqendrimin e Troloksit 5×10^{-4} mol L⁻¹ tek elektroda pastë karboni, elektroliti mbështetës puferi fosfat 0.1 mol L⁻¹ (pH 7.0), shpejtësia e skanimit 0.05 V s⁻¹.

Më pas vëllime prej 5, 10, 15, 20, 25, dhe 30 μ L me përqendrim konstant 2.0 mg mL⁻¹ të MWCNTs janë aplikuar në sipërfaqen e elektrodës pastë karboni për ta gjetur sasinë optimale të nanotubave të karbonit në aspektin vëllimor. Rezultatet kanë treguar në vëllimet nga 15-25 μ L ka pasur rritje të dukshme në rrymat katodike. Vëllimet më të mëdha se 25 μ L me gjasë e kanë bllokuar sipërfaqen e elektrodës duke mos dhënë sinjale më të mirë. Vëllimi prej 20 μ L është përzgjedhur si optimali. Edhe sasia e enzimës në këtë rast është optimizuar. Duke e rritur sasinë e saj është vërejtur rritje të rrymat katodike dhe ngritje tek rrymat anodike kundrejt Troloksit. Sasi më e lart e enzimës se 3.0 μ g nuk ka treguar ndonjë ngritje të dukshme të sinjalit analitik dhe si e tillë është përzgjedhur si optimale.

4.2.3 Karakteristikat e biosensorit

Sjellja elektrokimike e Troloksit është hulumtuar në tri llojet e elektrodave; atë CPE, CPE/MWCNTs, dhe CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® për ta gjetur efektin e secilës komponent. Troloksi ka prodhuar reaksion tipik reversibil ($\Delta E_p = 65$ mV) në elektrodën e pastër, duke iu atribuar oksidimit një elektronik në një kation radikal e duke transferuar një proton më vonë për të formuar një fenoksi radikal dhe menjëherë duke u oksiduar në feniksi kation, njëjtë sikurse tek α -tokoferolet [70]. Pas përsëritjeve të cikleve në voltametri, është vërejtur edhe një çift redoks ($\Delta E_p = 280$ mV). Mund të thuhet se pas formimit të kationit fenoksonium, një adicione nukleofilik i ujit fillon duke shoqëruar formimin e Troloks kinoneve përmes hemiketalve intermediate. Troloks kinonet me pas reduktohen në hidroktoni përkatëse, e që

mund të oksidohen në kinone në skanimin pas në potenciale pozitive [57, 70]. Rritja e sinjalit për qiftin redoks sekondar për secilin cikël është shkaktuar nga grumbullimi gradual i Troloks kinoneve nga oksidimi i substancës origjinale (Fig. 4.16A).

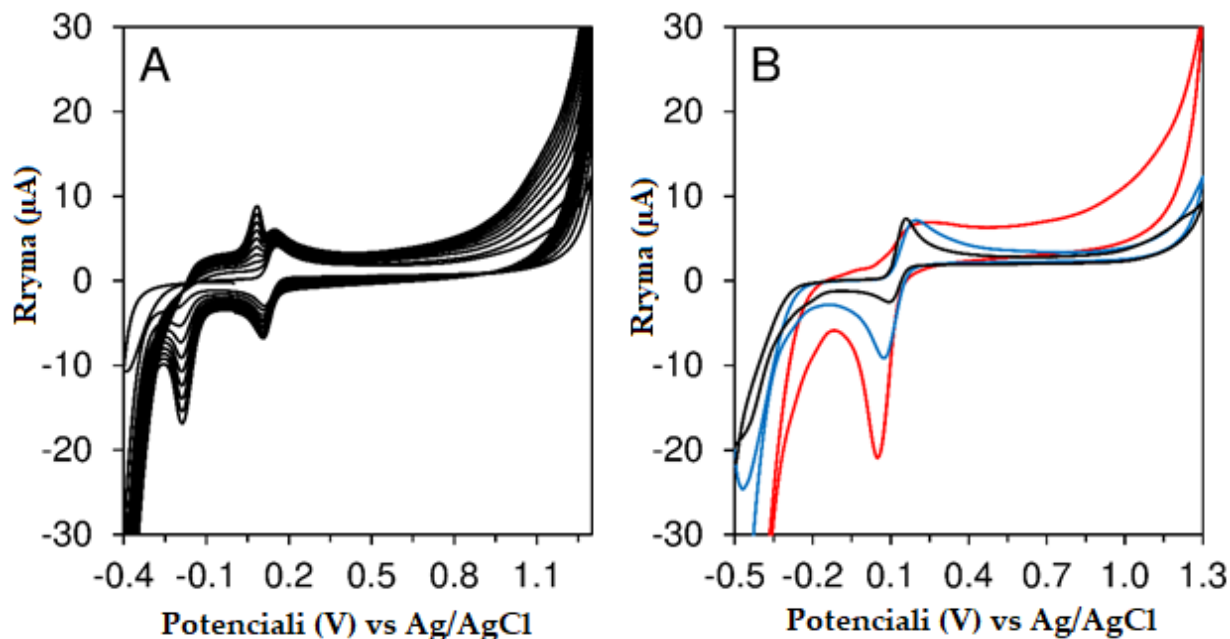


Figura 4.16 Voltamogramet ciklike ($n = 10$) të përsërituar në përqendrimet e Troloksit $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ të fituara në elektrodën e pastër (A) dhe voltamogramet ciklike për Troloksin me përqendrim $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ në elektrodën e pa modifikuar CPE (vija e zezë), CPE/MWCNTs (vija e kaltërt) dhe CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® (vija e kuqe) (B), në pufurin fosfat $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$, $E_{\text{fillstare}} = 0 \text{ V}$, $E_{\text{vertex1}} = -0.5 \text{ V}$, $E_{\text{vertex2}} = +1.3 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Raporti i intensitetit të rrymave elektrike ($I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$) ka qenë i barabartë me 1.544 tek elektroda e pamodifikuar, ndërsa 0.615 dhe 0.320 tek CPE/MWCNTs respektivisht CPE/MWCNTs/TYR/Nafion®. Shumë herë më i lartë është shfaqur piku reduktues në rastin e përdorimit të CPE/MWCNTs/TYR/Nafion®, në potencialin (E_{pc}) $+0.049 \text{ V}$ (krahasuar me vlerat $+0.079$ dhe $+0.099 \text{ V}$ për CPE/MWCNTs dhe CPE respektivisht), ku piku i oksidimit është zbritur për shkak të efektit katalitik të enzimës (Fig. 4.16B) kundrejt Troloksit. Duke ju referuar këtyre gjetjeve, potenciali operues me vlera më të ulëta se $+0.050 \text{ V}$ duket të hulumtohet për përcaktimet amperometrike. Gjithashtu bazuar në të dhënat eksperimentale të fituara, principi i këtij biosensori amperometrik për përcaktimin e sasive totale antioksiduese është realizuar, që mundëson përcaktimin elektrokimik të Troloksit në potenciale të ulëta me sensitivitet të shtuar.

6.2.4 Aktiviteti i tirozinazës kundrejt Troloksit

Më herët me anë të voltametrisë ciklike është parë që tirozinaza mund të katalizojë oksidimin e Troloksit në kinone përkatëse. Por kjo duhej të konfirmohej me eksperimente shtesë. Troloksi ka absorbancë maksimale në 291 nm (vija e kuqe në Fig. 4.17). Në prani të tirozinazës një tjetër mbi mbulim me absorbancë maksimale në gjatësi valore 278 nm paraqitet. Gjerësia e shiritit absorbues të ri rritet me kohën e pranisë së enzimës, siç tregohet në Fig. 4.18. Ky fenomen mund të konsiderohet si informacion shtesë që Troloksi nuk e inhibon efektin katalitik të enzimës por paraqet një substrat. Sidoqoftë, një reaksion polimerik i Troloksit i katalizuar nga enzima nuk mund të përjashtohet.

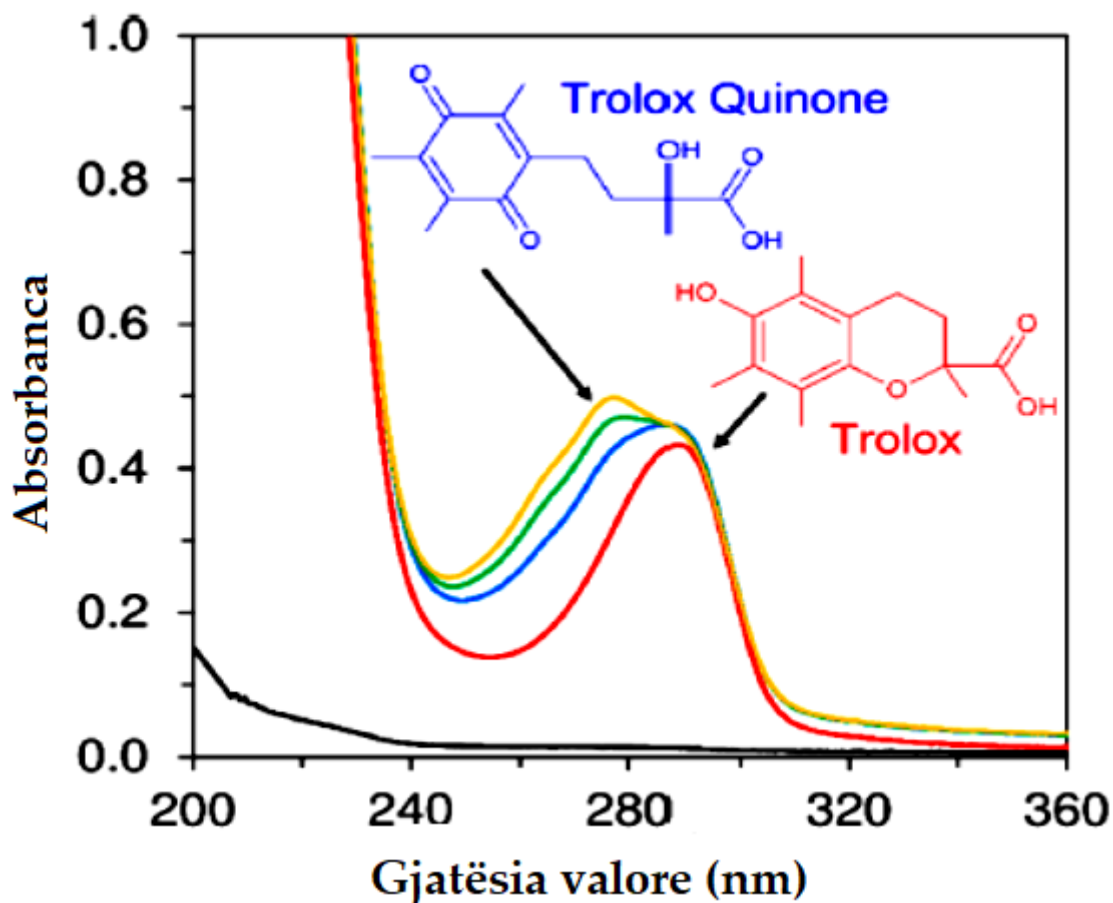


Figura 4.17 Spektri ultraviolet i tirozinazës me përqendrim $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (lakorja e zezë) dhe $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ duke përdorur puferin fosfat $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.0 për 0 (lakorja e kuqe), 10 (lakorja kaltër), 20 (lakorja e gjelbër), dhe 30 min (lakorja e verdh).

4.2.4 Efekti i shpejtësisë së përzierjes dhe vlerës pH

Në përcaktimet amperometrike shpejtësia e përzierjes paraqet një faktor të rëndësishëm që mundëson rrugëtimin e analitëve deri tek sipërfaqja e elektrodës në mënyrë sa më efikase duke mundësuar që gjatë gjithë kohës së analizës sipërfaqja e elektrodës të furnizohet me molekula të analitit ose analitëve. Për të hulumtuar këtë parametër janë përzgjedhur shpejtësitë e përzierjes nga 100 deri në 500 rpm. Deri në shpejtësinë 400 rpm sinjali është ngritur dukshëm, shpejtësi më të larta se 400 rpm nuk kanë pasur ndonjë efekt të theksuar dhe për këtë arsye shpejtësia e përzierjes 400 rpm është zgjedhur si më e mira.

Tirozinaza ka efekte katalitike të dobëta në mjedis acidike dhe bazike ndërsa efekte maksimale në vlera neutrale efekte maksimale [127,128]. Matjet eksperimentale edhe kanë dëshmuar këtë duke dhënë sinjal analitik maksimal në pH = 7.0.

4.2.5 Efekti i potencialit operues

Nëse detektimi elektrokimik i produktit nga reaksioni enzimatik ndodhë në vlera konstante të potencialit, atëherë madhësia e potencialit luan rolin kryesor në përcaktimin amperometrik. Varësia e lartësisë së rrymës reduktuese ndaj potencialit operues mund të shihet në Fig. 4.18. Potenciali operues -0.25 V ka gjeneruar sinjal më të lartë dhe për këtë arsye është përzgjedhur e që korrespondon me të dhënat paraprake në përcaktimin e (reduktimin) p-kinoneve [125]. Për më tepër potencialet më të ulëta se -0.3 V kanë ndikuar që të kemi rrymë bazike jo stabile për shkak të ndikimit të oksigjenit.

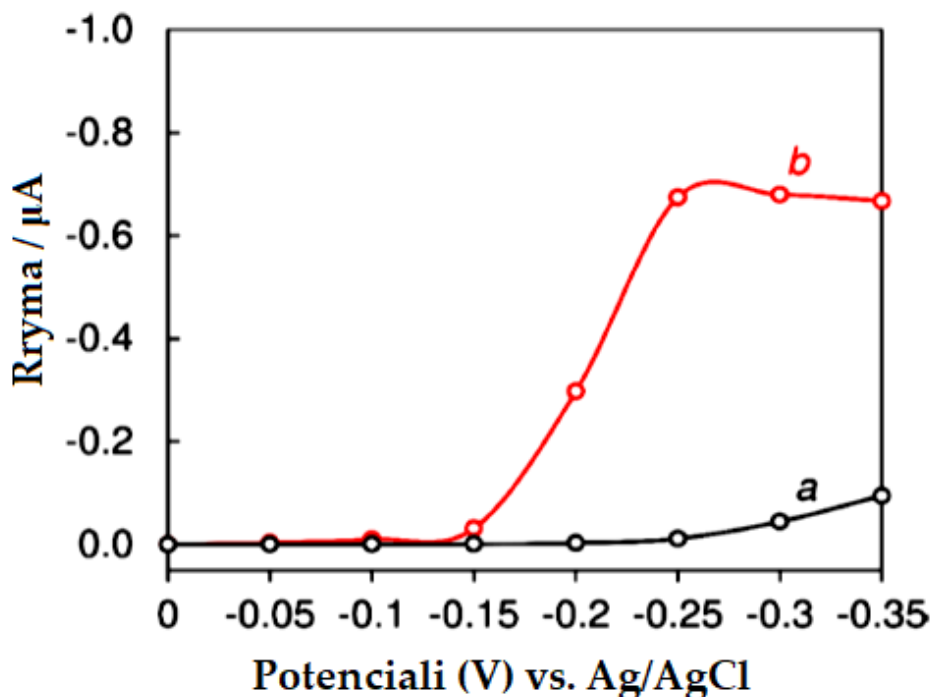


Figura 4.18 Efekti i potencialit operues kur është përdorur CPE/MWCNTs (a), dhe CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® (b). Analiti $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Troloks; elektroliti mbështetës puferi fosfat $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0; shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

4.2.6 Analiza e frutave

Përmbajtja e lagështisë është përcaktuar fillimisht, duke i thatë frutat në peshë konstante në temp. 60°C . Sasi më e lartë e ujit është vërejtur tek dredhëzat (93 %), kurse sasi më e ulët tek mjedrat (82%). Për frutat tjera të analizuara përmbajtja e ujit ka qenë 85%. Sasi totale antioksiduese është përcaktuar në 100 g të frutave të thara, dhe për këtë arsye ka qenë e rëndësishme të dihet sasia e ujit për ta përcaktuar më pas sasinë totale antioksiduese në indet e njoma (frutat e pa thara).

Për ta eliminuar matriksin e mostrës, është përdorur metoda me shtesa të standardit me anë të biosensorit të zhvilluar në kushte optimale të cilat janë përcaktuar paraprakisht. Vëllim prej 1.0 mL të ekstraktit të frutave është vendosur në 9 mL pufer fosfat dhe më pas janë shtuar 3 ose 4 shtesa të standardit nga 0.5 mL secila (Troloks $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Pas llogaritjes së rezultateve është fituar ekuacioni $I(\mu\text{A}) = -2.0082 c (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}) - 1.5137 (\mu\text{A})$ dhe $R^2 = 0.9978$ siç tregohet në Fig. 4.19.

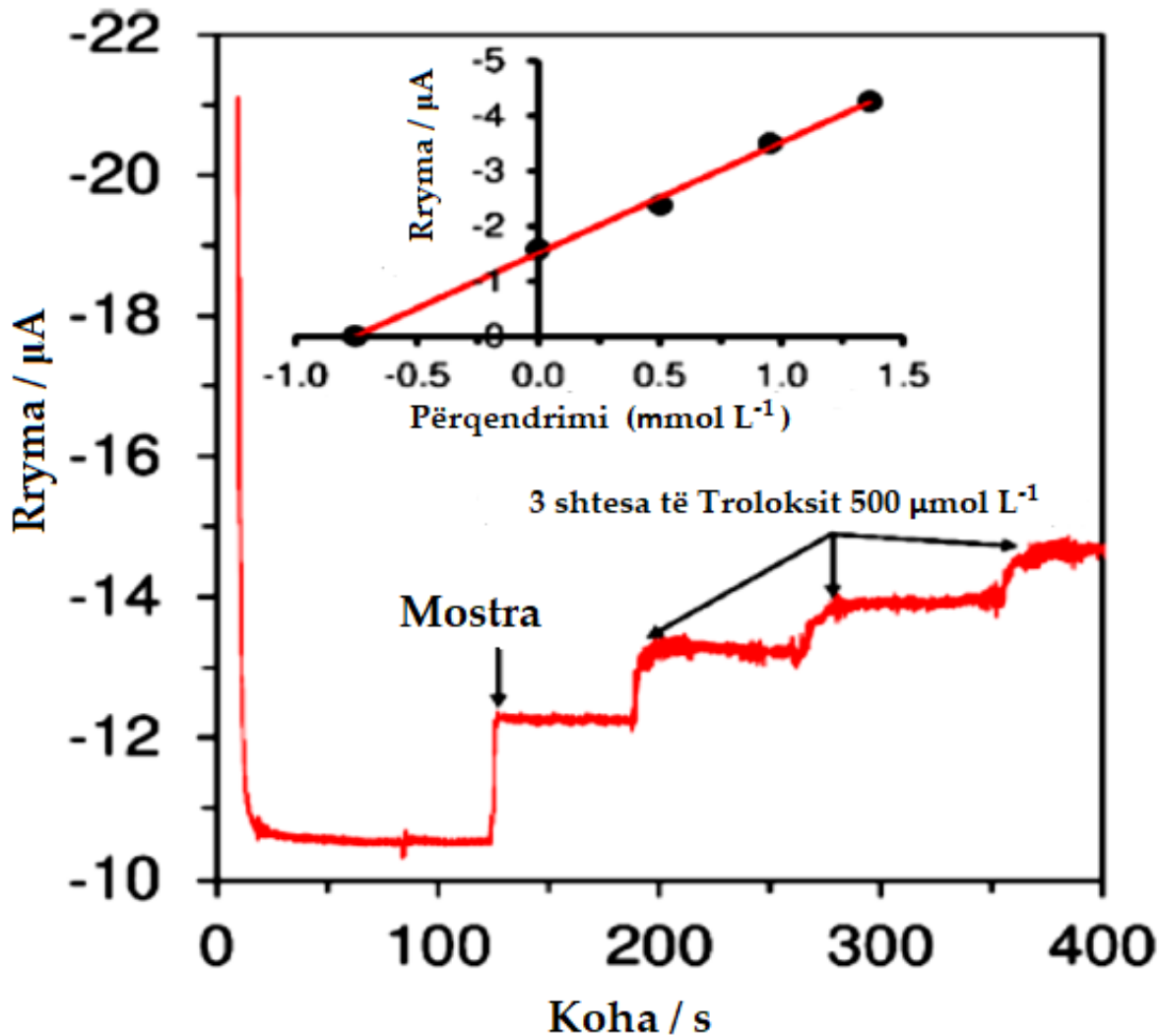


Figura 4.19 Analiza e TEAC duke përdorur metodën e shtimit të standardit me anë të biosensorit CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® në potencialin operues -0.25V , shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

Metoda referente (DPPH) është përdorur me këto parametra të kalibrimit për substancën standarde Troloksin $A = -0.0103 c (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.3516$ dhe $R^2 = 0.9943$.

Koha e reagimit ka qenë e ndryshme për frutat e përzgjedhura. Është interesant të theksohet se kohë më e shkurt e reagimit është parë tej mjedrat ($< 10\text{ s}$) se sa tek Troloksi ($> 25\text{ s}$). Kjo për arsye se mjedrat përmbajnë komponime fenolike të cilat janë më të përshtatshme për tirozinazën (substrat më të përshtatshëm).

Në aspektin e jetëgjatësisë, biosensori është testuar për dy javë duke përdorur tretësirën e Troloksit me përqendrim $150\text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ për çdo dy ditë (Fig. 4.20). Sinjali i biosensorit qëndron stabile për një javë.

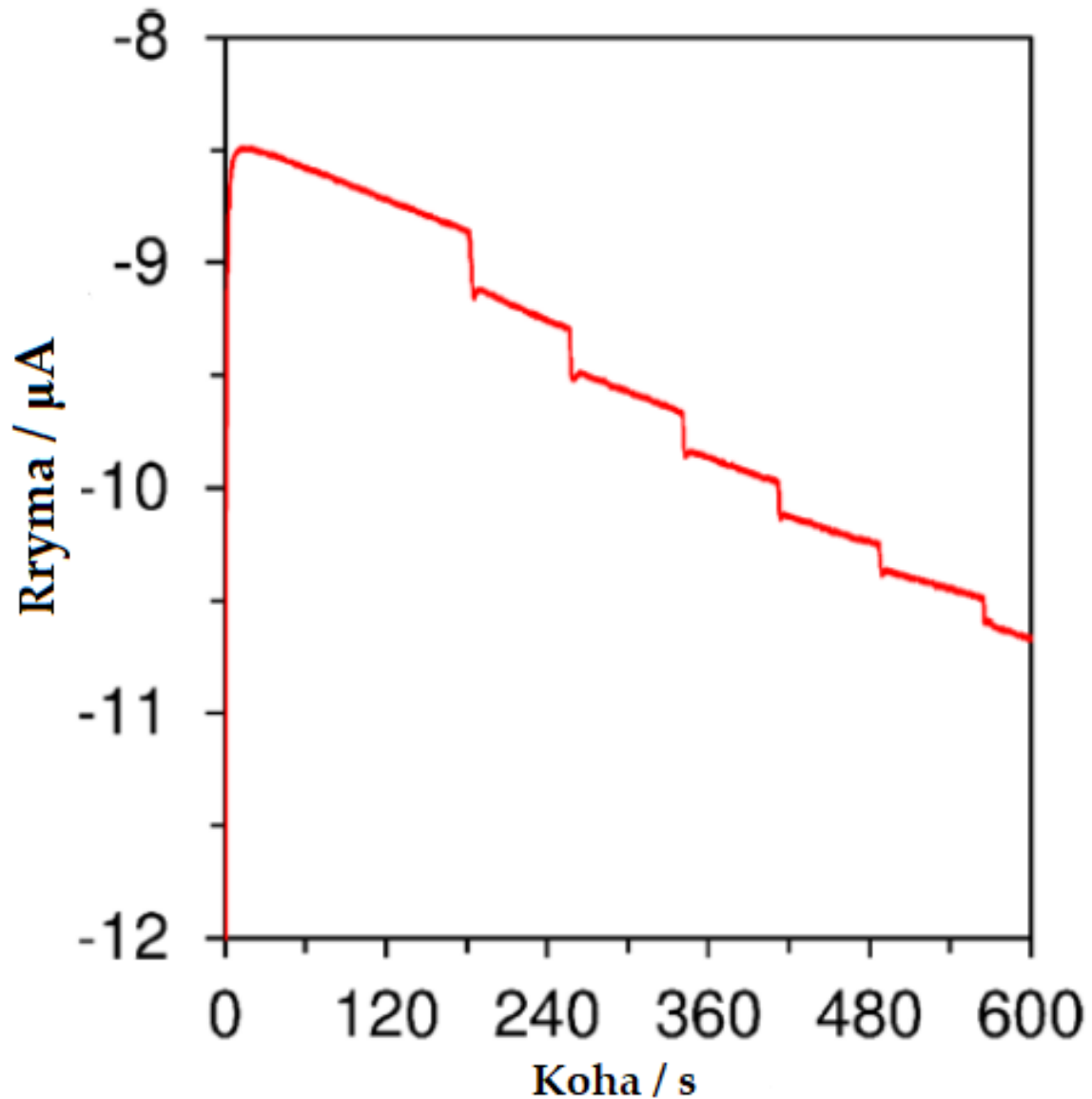


Figura 4.20 Amperogram tipik i fituar duke përdorur biosensorin elektrokimik CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® gjatë shtimit individual të Troloksit me përqendrim $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Elektroliti mbështetës puferi fosfat $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0; shpejtësi e përzierjes 400 rpm.

Vlerat finale për analizën e TEAC për secilën frutë me anë të biosensorit elektrokimik dhe asaj referente (DPPH) janë paraqitur në Tabelën 4.5.

Tabela 4.5 Përmbajtja e TEAC dhe AA në fruta të ndryshme

| Frutat | AA në Pulp ^b [mg për 100 g] | | Acidi askorbik në pulp ^b [mg/100 g] |
|-----------------|---|--------------------------|--|
| | Biosensori ^a | Metoda DPPH ^a | |
| Dredhëza | 1569 (133) | 6735 (570) | 59 |
| Manaferra | 2593 (337) | 3868 (503) | 30 |
| Mjedra | 5317 (793) | 5968 (890) | 32 |
| Boronicë | 1917 (270) | 4878 (687) | 14 |
| Boronicë e kuqe | 6738 (935) | 8027 (1114) | 13 |

^aVlerat janë dhënë si mesatare aritmetike e pesë përsëritjeve. B Vlerat për përmbajtjen e AA janë marr nga U. S Department of Agriculture [129, 130-131].

Nga tabela mund të vërehet lehtë se vlerat nuk janë të njëjta nëse i krahasojmë dy metodat e përdorura.. Në përgjithësi, matjet me metodën DPPH ofrojnë riprodhueshmëri të mirë me 95 %. Riprodhueshmëria tek biosensori elektrokimik ka qenë e krahasueshme me metodën referente DPPH, për veç se në rastin e dredhëzave (90%). Kjo mund të shkaktohet nga përmbajtja e lartë e antioksidantëve jofenolike: AA, karrotenidet, mineralet me veti reduktuese, etj. dhe nga prezenca e fibrave të patretshëm. Për shembull, prania e AA në pulpë të dredhëzës është 90 mg 100 g⁻¹. Prezenca e AA në fruta është e njohur dhe vlerat mund të mirren nga National Nutrient Database (USDA) (U.S. Department of Agriculture, 2010); si referencë, e që janë paraqitur gjithashtu në Tabelën 6.5. Rezultatet e paraqitura janë kompaktibile edhe me referencat [130, 131].

Për më tepër, biosensori amperometrik CPE/MWCNTs/TYR/Nafion® mund të përdoret për përcaktimin e sasive totale fenolike (TPC) [132] dhe gjithashtu sasive totale antioksiduese (TAC) [133] ekuivalent me Troloksin për mostrat që kanë vlera të ulëta të antioksidantëve jofenolik. Për frutat e thara(boronicë, boronica e kuqe, mjedër), vlerat për TEAC të fituara nga biosensori elektrokimik janë në korrelacion të mirë me metodën referente DPPH si vërehet në Tabelën 6.5. Një diskrepancë e madhe mund të vërehet boronica, sidomos verat e fituar me rastin e analizimit të pulpës, vlera e TEAC janë shumë më të ulëta se matjet që janë realizuar me metodën referente. Kjo me gjasë prezencës së sasive të larta të anthoksianinës e cila e nxit aktivitetin anti-Tirozinazë [134].

Një tjetër karakteristik e cila duhet të përmendet është sasia e lartë e AA në dredhëza (sipas literaturës). Tirozinaza katalizon vetëm oksidimin e komponimeve fenolike dhe për këtë arsye sasi e vogël e TEAC është gjetur në këtë frutë me përdorimin e biosensorit amperometrik. AA ndikon që të zbritet intensiteti i ngjyrës së tretësirës alkoolike të DDPH, dhe që për pasojë ka rritjen e vlerave të sasive totale antioksiduese. Biosensori amperometrik i zhvilluar mund të aplikohet me sukses për përcaktimin e TPC dhe TEAC në mostrat në të cilat përmbajtja e polifenoleve janë dominant si komponentë antioksiduese. Krahasimi me metoda referente tjera siç janë ORAC, FRAP DHE TRAP janë paraqitur në Tabelën 4.6.

Tabela 4.6. Shqyrtimi i vlerave të TEAC në pulp të frutave përcaktuar nga analizat tjera TEAC (mg për 100 g)

| Frutat | TEAC (mg për 100 g) | | |
|-----------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | ORAC ^a | FRAP ^b | TRAP ^c |
| Dredhëza | 1077 | 543 | 214 |
| Manaferra | 1478 | 1269 | 526 |
| Mjedra | 1268 | 994 | 262 |
| Boronicë | 1169 | 911 | 233 |
| Boronicë e kuqe | 2275 | 1259 | 678 |

Të dhënat për TEAC janë marr nga referencat ^a[53,55] dhe ^c[137].

Vlerat korresponduese të TEAC në fruta marr nga analizat individuale janë gjetur ose llogaritur duke u mbështetur në literaturën përkatëse [8,135–138].

Biosensori elektrokimik ka ofruar sensitivitet të ngjashëm ndaj metodave DPPH dhe TRAP. Në krahasim me metodën ORAC, sensitiviteti i biosensorit është dy herë më i ulët. Nga të gjitha metodat analitike të përdorura mundësia më e ulët për ta larguar ndikimin negativ të radikaleve të lira është vërejtur tek dredhëzat dhe e kundërta tek boronica e kuqe. Nëse dëshirojmë të krahasojmë kapacitetin antioksidues për secilën frut, biosensori elektrokimik ofron informacione të ngjashëm si DPPH, ORAC dhe TRAP analizat në këtë sekuencë: boronicë e kuqe > mjedër > manaferra > boronicë > dredhëz. Koeficienti i korrelacionit $R^2 = 0.8409$ është gjetur gjatë krahasimit të biosensorit elektrokimik me metodën DPPH në analizën e TEAC në secilën pulp të frutave, Figura 4.21.

Për më tepër duket që ORAC dhe TRAP metodat japin sasi më të ulëta të TEAC vlerave se sa biosensori elektrokimik i zhvilluar dhe dy metodat tjera spektrometrike. Një sqarim për këtë mund të gjendet në format e ndryshme të polifenoleve që gjenden në mjedër dhe boronicë të kuqe, që me siguri përmbajnë sasi më të larta të polifenoleve të pasura me grupe ketolike në strukturën e vet kimike.

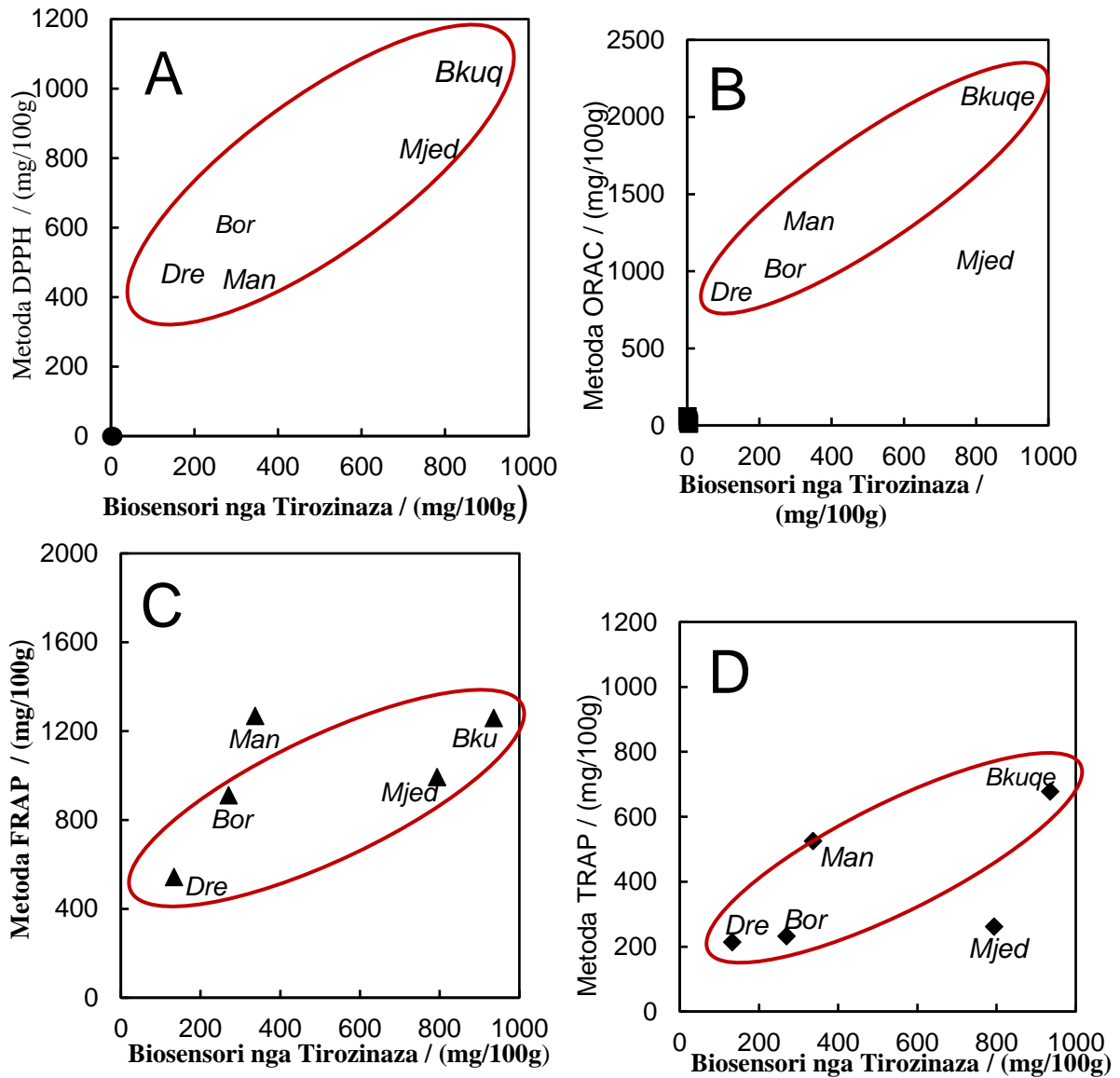


Figura 4.21. Krahasimi i biosensorit elektrokimik me metodat tjera analitike (A) DPPH, (B) ORAC, (C) FRAP, (D) TRAP për analizën e TEAC në pulp të dredhëzës (Dre), manaferrave (Man), mjedrës (Mjed), boronicës (Bor) dhe boronicës së kuqe (Bkuqe).

4.3 Përcaktimi i kapacitetit total antioksidues ekuivalent me troloksin në mostrat e çokollatës duke përdorur elektrodën e diamantit dopuar me bor në sistemin ma analizë ne rrjedhje

4.3.1. Voltametria ciklike

Duke përdorur voltametrinë ciklike është bërë e mundur të studiohet sjellja elektrokimike e 13 substancave të ndryshme të cilat janë potencialisht të pranishme në kakao si antioksidantë. Matjet janë realizuar duke përdorur pufer fosfat 0.1 M, pH =7.0 dhe gjithashtu pufer i njëjtë fosfat por me përqindje të metanolit në rastet kur substancat nuk kanë pasur tretshmëri në pufer të pastër.

Me anë të voltametrisë ciklike lehtë mund të vërehen piket e oksidimit për secilën substancë të analizuar dhe kjo është një ndihmës e madhe për ta përcaktuar potencialin operues në ampermetrinë hidrodinamike. Piket e observuara të oksidimit të këtyre substancave janë: acidi kafeik në +0.398 V, kamferoli në +0.483 V, acidi klorogjenik në +0.505 V, acidi sinapik +0.620 V, acidi gallik në +0.635 V, (+)-katehina në +0.640 V, L-acidi arkorvik në +0.649 V, vanilina (VA) në +0.688 V, (-)-epikatehina në +0.744 V, naringina në +1.011 V, acidi kanellik në +1.133 V, kafeina në +1.384 V, dhe theobromina në +1.404 V.

Në figurën 4.22 janë paraqitur voltamogramet ciklike të troloksit, vanilinës dhe theobrominës. Tek troloksi mund të vërehet se oksidohet në potencialin +0.623 V. Fukusi vendoset tek Troloksi ngase kjo substancë përdoret si standard për përcaktimin e sasive totale të antioksidantëve dhe gjitha kalibrimet janë bërë duke përdorur troloksin si standard. Por sidoqoftë ky potencial operues nuk është i favorshëm për një pjesë të madhe substancash të cilat oksidohen në potenciale më pozitive (deri në +1.4V), kështu që potenciali operues duhet të bëjë të mundur oksidimin e të gjitha substancave, në mënyrë që të bëhet përcaktimi total I antioksidantëve në mostrën e analizuar.

Voltametria ciklike jep të kuptojmë gjithashtu që molekulat e oksiduara të cilat mbesin aftër elektrodës e bllokojnë në një formë sinjalin ngase nuk lejojnë që molekulat tjera të pa oksiduara të arrijnë në sipërfaqen e elektrodës. Kjo pasi që pas një numri të shkurtë të cikleve intensiteti i rrymës bie për arsytet e përmendura më lartë. Ky problem do të eliminohet duket përdorur sistemin me injektim në rrjedhje.

4.3.2 Optimizimi i kushteve në analizën me injektim në rrjedhje

Shpejtësia e rrjedhjes

Një prej parametrave të rëndësishme në analizën me injektim në rrjedhje është optimizimi i shpejtësisë së rrjedhjes, figura 6.23.

Shpejtësia e rrjedhjes e definon kohën e mbërritje së analitit nga momenti i injektimit deri në momentin e mbërritjes në elektrodën e punës (sensori). Shpejtësia optimale duhet të prodhojë intensitet të lartë por edhe të kalkulohet që mos të bëhet shpenzimi i tepërt i substancave nëse operohet në shpejtësi të lartë.

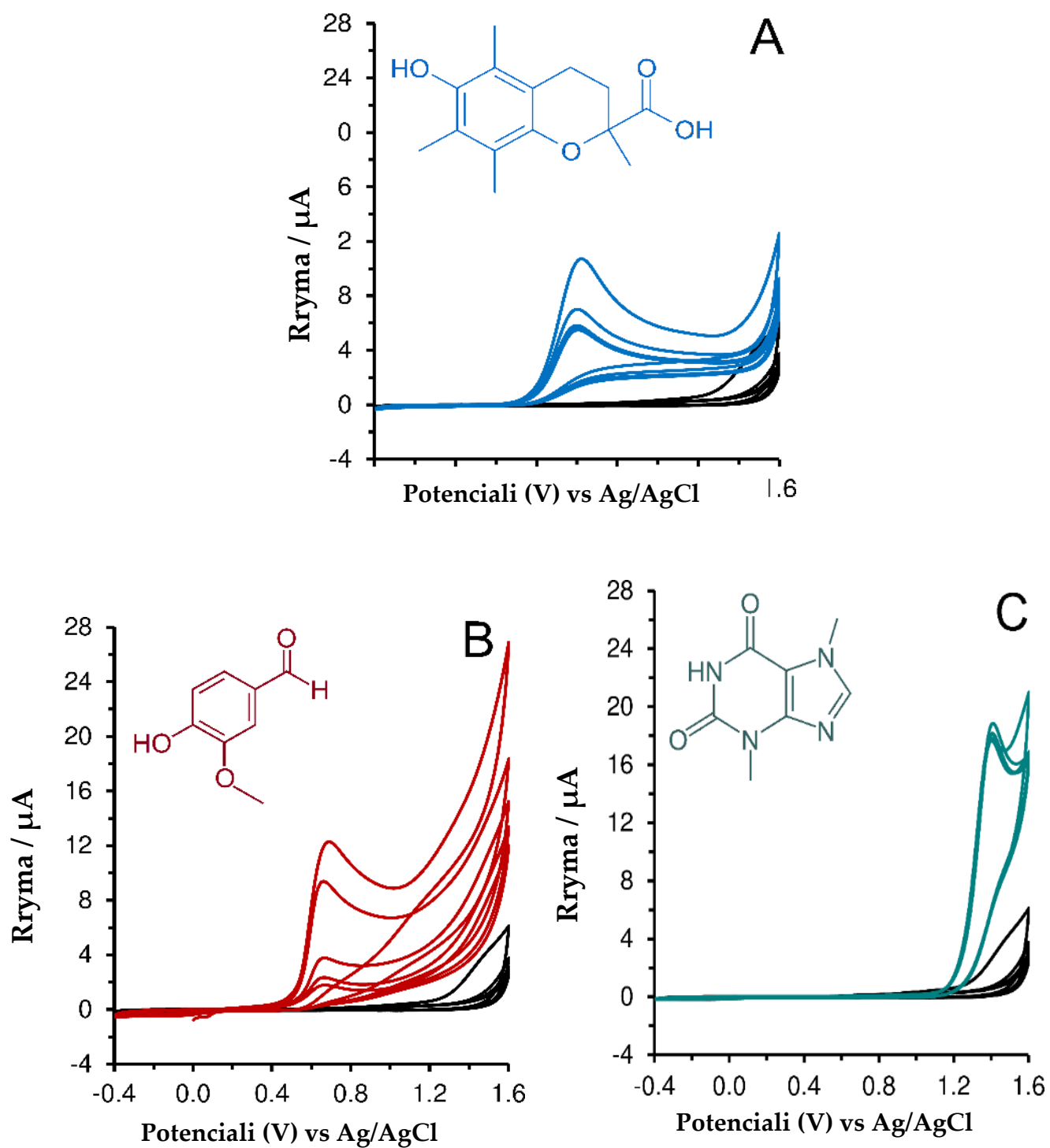


Figura 4.22. Voltamogramet ciklike të përsëritura (5 cikle) 1 mmol L⁻¹ të: Troloks (A), vanilinë (B), dhe theobrominë (C) regjistruar tek BDDE në 0.1 mol L⁻¹ PB (pH 7.0), shpejtësi të skanimit prej 50 mV s⁻¹. Lakoret e zeza (blank) tregojnë që matja është bërë në pufër të pastër.

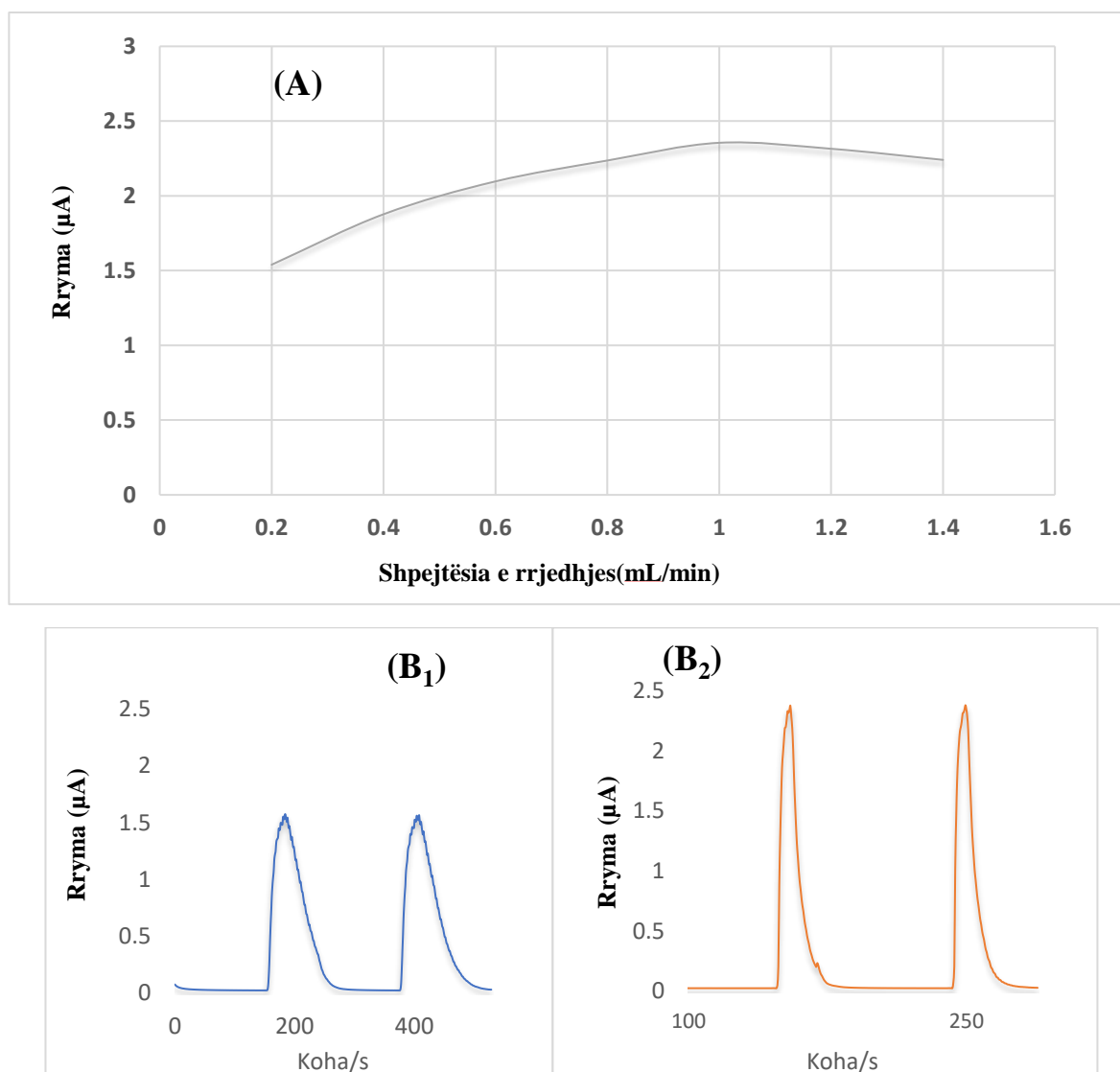


Figura 4.23. Ndjeshmëria në raport me shpejtësinë e rrjedhjes (A) dhe ndryshmi në intensitetin e rrymës kur është përdorur shpejtësia e rrjedhjes 0.2 mL/min (B₁) dhe 1 mL/min (B₂), potenciali operues +1.3V, gjatë shtimit të troloksit me përqendrim 50 ppm, bartës puferi fosfat pH = 7.0.

Studimi në këtë aspekt është bërë duke filluar me shpejtësi të rrjedhjes nga 0.2ml/mi nderu në 1.4ml/min. Nga Figura 4.23 (A) mund të vërehet se shpejtësia optimale arrihet tek 1 ml/min dhe kjo shpejtësi është përdorur për gjitha matjet.

Potenciali operues

Gjatë matjeve amperometrike potenciali mbahet konstant dhe luanë rol thelbësor në analizën kimike. Potenciali operues përcaktohet nga lloji i substancave që do të analizohen, përcakton ndjeshmërinë dhe selektivitetin e metodës.

Potenciali i punës është përcaktuar në dy mënyra në mënyrë që të saktësohet vlera optimale e tij.

Mënyra e parë është studiuar duke përdorur trolaksin si analit standard dhe mënyra e dytë duke përdorur mostrën e çokolletës e cila përmban 80% kakao, (Fig. 4.24).

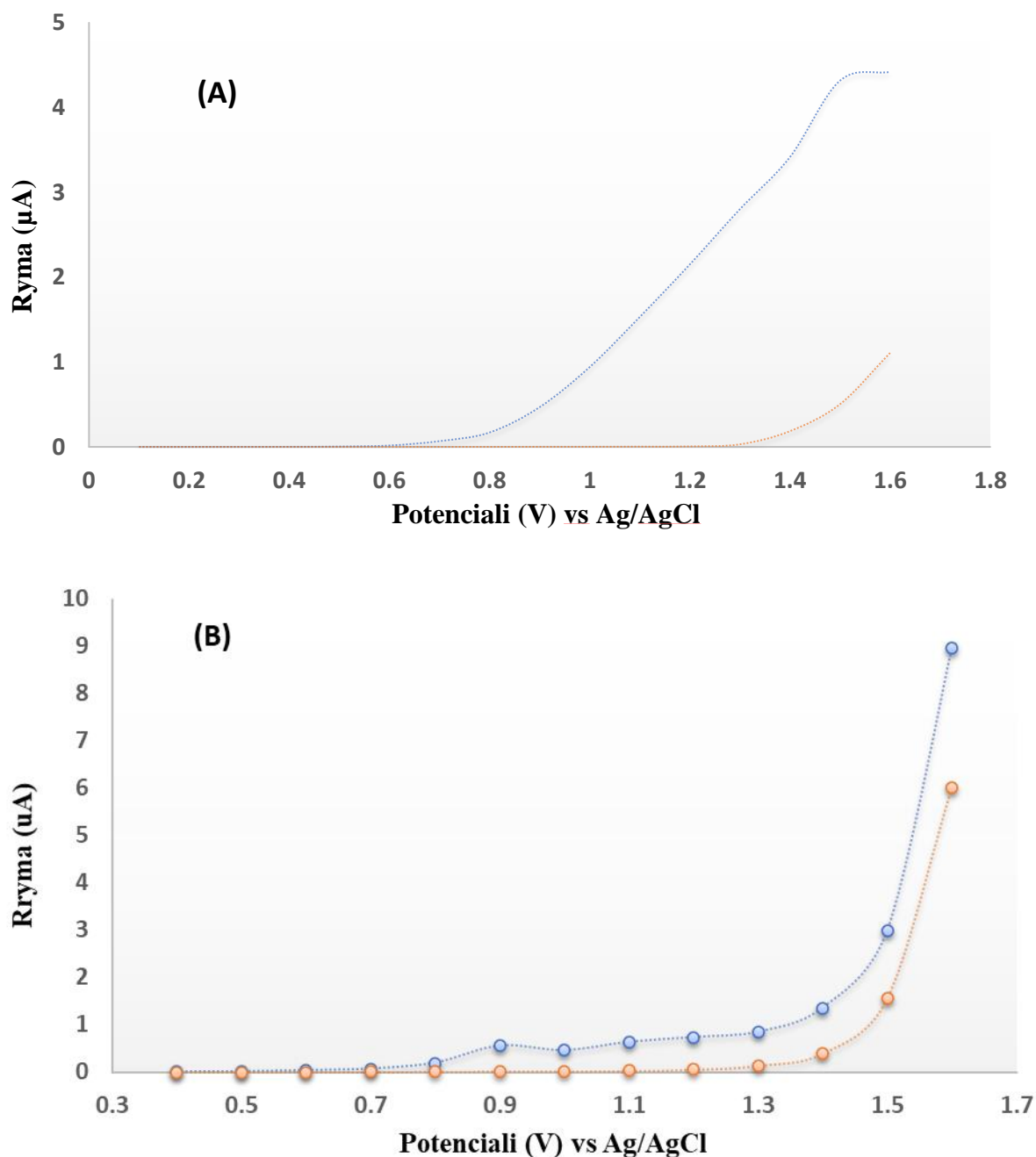


Figure 4.24. Varësia e intensitetit të rrymës ndaj ndryshimit të potencialit operues, BDDE si elektrodë e punës, pufer fosfat (pH 7.0), shpejtësi e rrjedhjes 1mL/min, duke përdorur troloksin me përqendrim 50ppm(A) dhe mostrën e çokollatës(B), lakorja me ngjyrë të kuqe paraqet rrymën bazike.

Troloksi tregon ndjeshmëri të lartë në potencialet +1.3V e më lartë, mostra e çokollatës jep rezultate shumë të ngjashme me troloksin ku potenciali +1.4V është zgjedhur si i miri ngase kemi ndjeshmëri të lartë dhe kemi substanca të cilat e kërkojnë këtë potencial për të oksiduar. Potencialët më të larta se +1.4V nuk preferohen ngase rryma bazë është e lartë e cila ndikon që interferencat të mëdha e stabiliteti i matjeve të jetë i vogël.

Sasia e metanolit në tretësirat e punës

Përderisa ka qenë e nevojshme të përdoret metanoli për disa substanca si rezultat i tretshmërisë së ulët të tyre është bërë edhe optimizimi i sasisë së metanolit në tretësirat e punës, (Fig. 4.25).

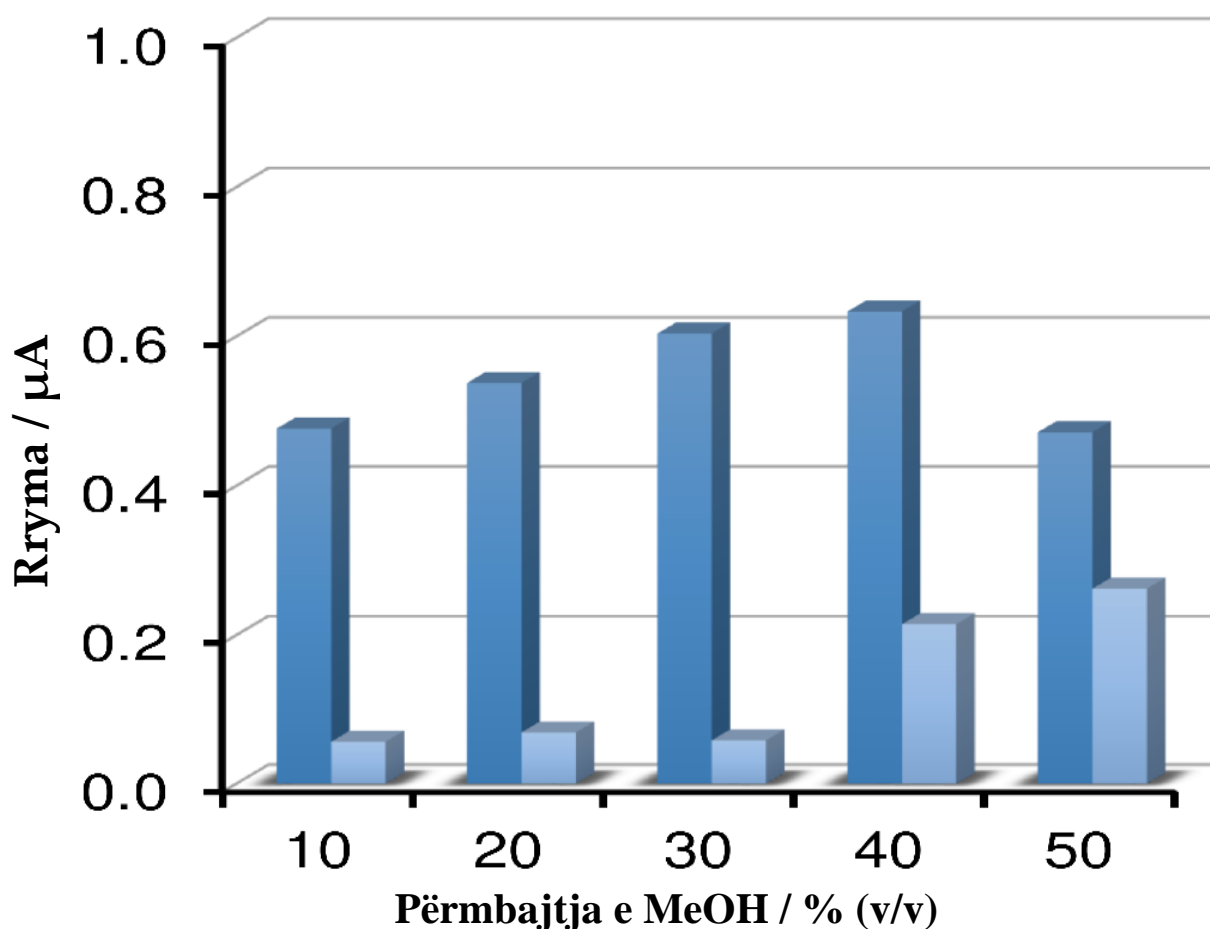


Figura 4.25. Efekti i metanolit në tretësirat e punës duke përdorur ekstrakt të çokolletës me 80% (ë/ë) kakao. Matjet janë realizuar duke përdorur BDDE në sistemin me analizë në rrjedhje, shpejtësi të rrjedhjes 1 mL/min dhe potencial operues + 1.3V. Ngjyra e kaltër e zbehtë tregon rrymën bazë.

Duke marr të dhënat nga grafiku mund të konstatohet 30% (v/v) është si vlerë optimale e punës ngase kemi sinjal të lartë dhe rrymë bazike të ulët.

4.3.3 Validimi i metodës

Është me rëndësi të theksohet se ky studim nuk paraqet ndonjë metodë komplet të re por një hulumtim fillestar që ka për qëllim përcaktimin e sasive totale të antioksidantëve në ekstrakte të çokolletës, por sidoqoftë duhet bëhen disa validime bazë.

Preciziteti është përcaktuar duke përdorur verat e devijimit standard nga mesatarja (RSD) për pesë analiza (injektive). Vlerat e RSD 3.3% dhe 3.8% i kemi për çokolletën me qumësht (30% kakao, ë/ë) dhe çokolletën e zezë (50% kakao, w/w).

Në Figurën 4.26 janë paraqitur shtesat e standardit të Troloksit duke filluar nga 5 deri 160ppm.

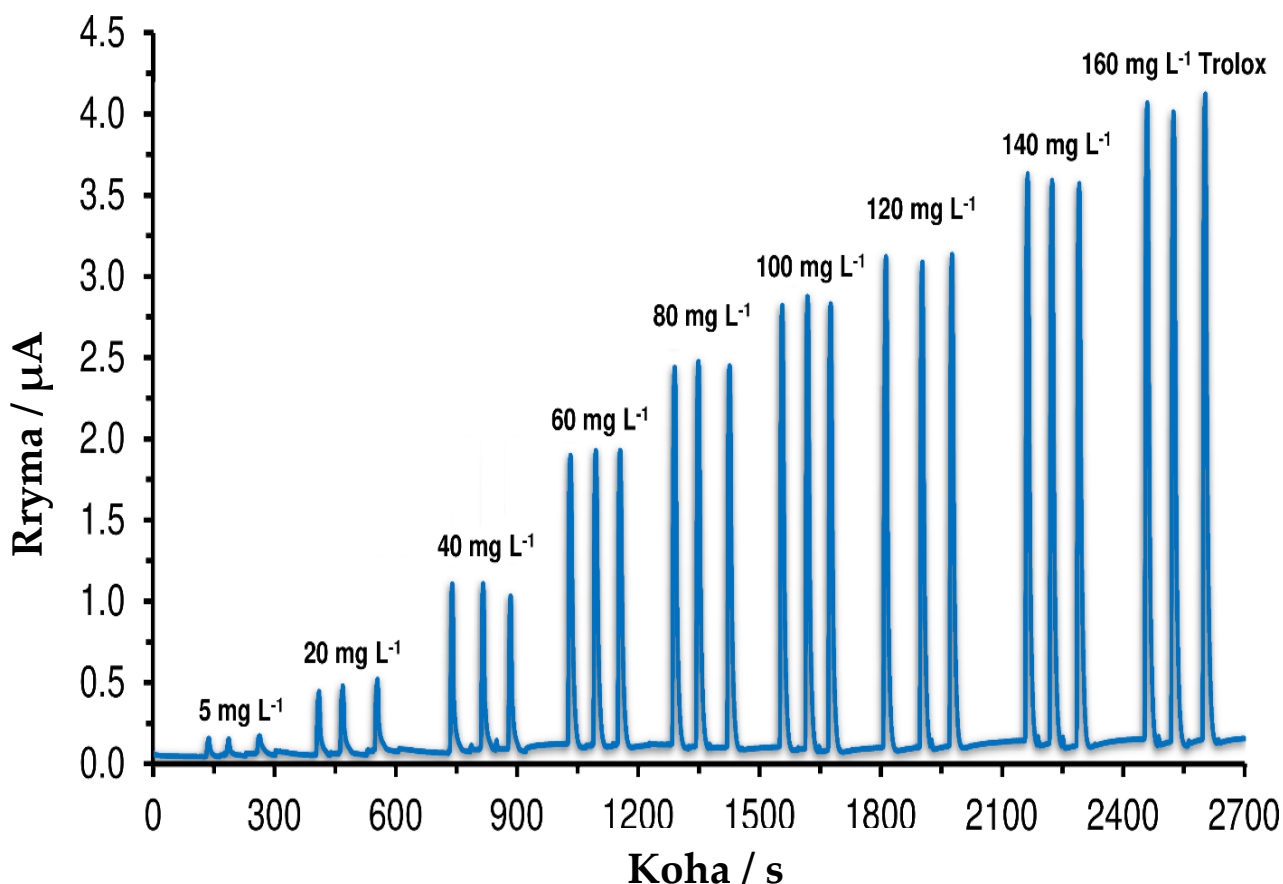


Figura 4.26. Amperogram tipik i analizës me injektim në rrjedhje realizuar në BDDE, potenciali operues +1.3V, shpejtësia e rrjedhjes 1 mL/min, pufer fosfat me 30% MeOH (v/v).

Rendi linear nga 5 deri 100ppm Troloks mund të përshkruhet me ekuacionin $I = 0.0233c + 0.04859$ dhe karakterizohet me koeficient të korrelacionit $R^2 = 0.9994$, për përqendrime më të larta deri në 160 ppm Troloks mund të përdoret ekuacioni tjetër $I = 0.0211c + 0.05736$, $R^2 = 0.9954$.

Për shkak të vlerave të larta të interceptit nuk ka qenë e mundur të përdoret metoda me shtesa të standardit por është zgjedhur metoda me lakore të kalibrimit për të zhvilluar analizën e mostrave reale.

Limiti i detektimi (LD) dhe limiti i kuantifikimit (LK) të 1.4 dhe 4.6 ppm Troloks është kalkuluar në bazë të formulës $LD = 3s/k$, $LOQ = 10s/k$ respektivisht, ku s paraqet devijimin standard të pesë përsëritjeve të 5ppm Troloks dhe k është pjerrtësia e drejtëzës (0.0233).

4.3.4 Analiza e mostrave të çokollatës

Ekstrakti i çokollatës së bardhë (0% kakao; w/w), dy mostra të çokollatës me qumësht (30% kakao; w/w), dhe tri çokollata të zeza (50, 64, 80% kakao; w/w) janë analizuar duke përdorur FIA me BDDE. Dy çokollata me qumësht nga prodhues të ndryshëm me përmbajtje të njëjtë të kakaos janë zgjedhur qëllimisht për ta verifikuar saktësinë e analizës. Fig. 4.27 tregon se dy ekstraktet e çokollatës me qumësht japin sinjal të krahasueshëm. Sinjali për ekstraktin e çokollatës së bardhë është në vlerat e limitit të detektimit që konfirmon faktin se kjo llojë e çokollatës nuk mund të konsiderohet e pasur me antioksidantë.

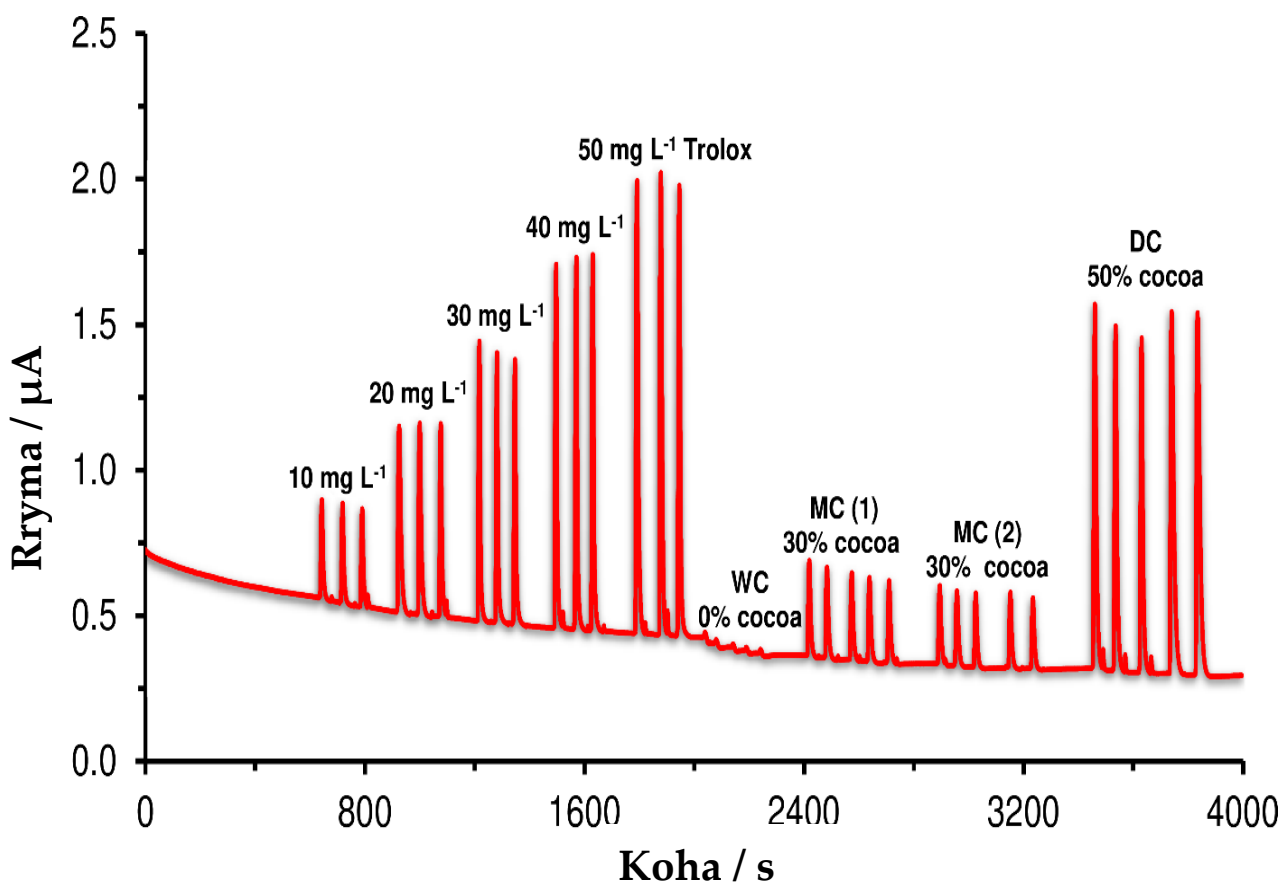


Figura 4.27. Amperogrami hidrodinamik në FIA, gjatë matjeve të standardeve të Troloksit dhe mostrave të çokollatave me sasi të ndryshme të kakaos.

Ndryshe nga kjo, ekstraktet e çokollatës së zezë është dashur të hollohen dy herë më shumë në mënyrë që sinjali të mos e kalojë rendin linear. Përfunduar një mostër të çokollatës me 80% (w/w) kakao (përfunduar nga llogaritjet statistikore), vlerat e kapacitetit total antioksidues ekuivalent me troloksin (TEAC) (mg Troloks për 100 g mostër) rriten sa më e lartë të jetë përmbajtja e kakaos.

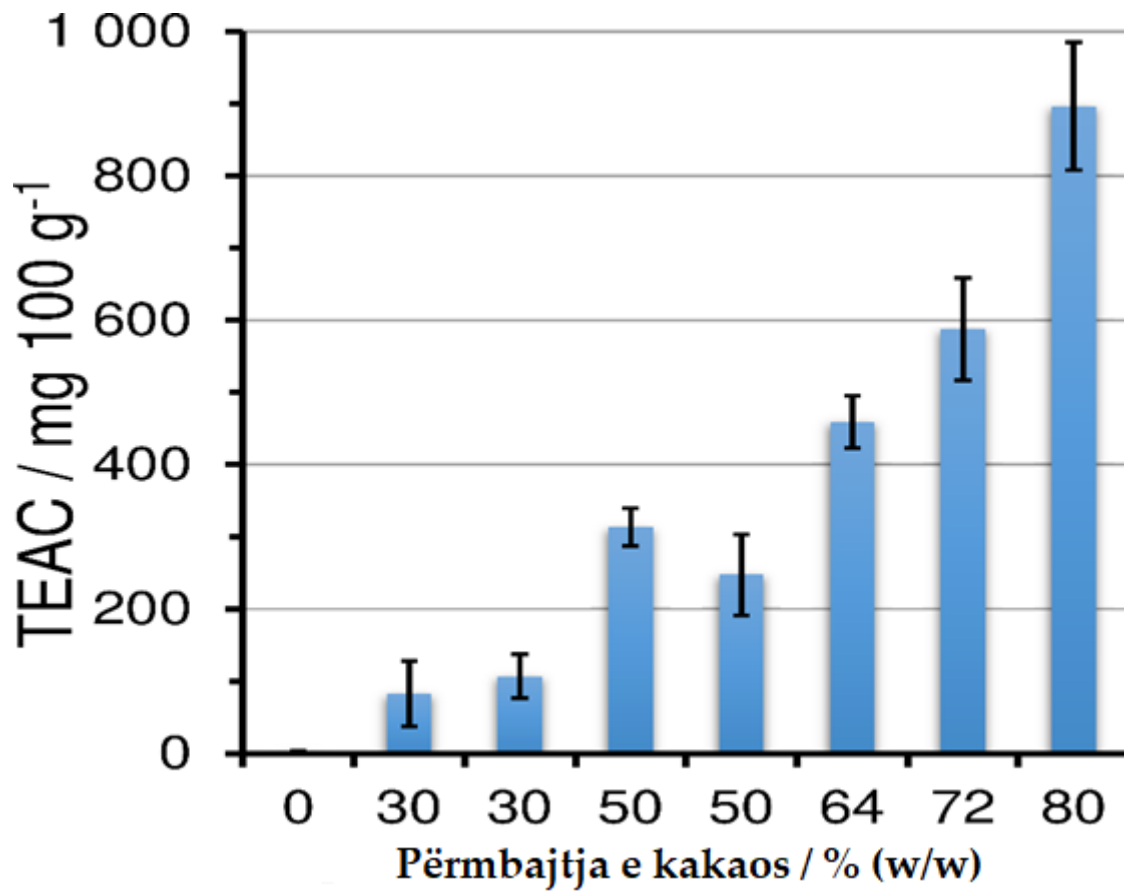


Fig. 4.28 TEAC i çokollatës së bardhë (0%), me qumësht (30%), dhe asaj të zezë (50-80% kakaos; w/w), regjistruar në FIA duke përdoruar BDDE.

Figura 6.28 tregon faktin se kapaciteti total antioksidues (TAC) prezantuar si TEAC mund të konsiderohet si një shënjim shtesë për përmbajtjen e sasisë së kakaos. Për më shumë, korrelacion shumë pozitiv në mes përcaktimit të vlerave të TEAC dhe përmbajtjes së kakaos karakterizuar me $r = 0.9187$ për tetë çokollata të përzgjedhura si mostra reale.

5. PËRFUNDIMET

Në këtë temë të doktoratës janë arritur të zhvillohen sensor dhe biosensor amperometrik për përcaktimin e komponimeve me përmbajtje fenolike duke vënë theks te veçante ato për destinim farmaceutik. Zhvillimi i sensorëve dhe biosensorëve është arritur duke përdorur materialet nga elektrodave të pastra të karbonit ose duke i modifikuar ato. Modifikimet janë realizuar duke përdorur teknika shumë komplekse dhe interesante me çka është arritur të rritet sinjali analitik dhe mundësia e operimit në potenciale ku interferencat janë minimale. Kjo më pas ka mundësuar të analizohen edhe mostra fiziologjike të cilat përmbajnë matriks mjaft kompleks.

Biosensori amperometrik bazuar në elektrodave të printuara komerciale të karbonit (DS-150) veshur nga një shtresë e hollë e grafenit dhe film nga Nafioni me tirozinazë e cila është e lidhur nga glutaraldehidi ka treguar performancë të lartë në përcaktimin e paracetamolit në formulimet farmaceutike dhe në urinën e njeriut. Kjo formë e modifikimit ka lejuar konstruktivitet relativisht të thjeshtë të biosensorit (duke mos u shpërlarë elementi bionjohës me kalimin e kohës) që prodhon selektivitet të shkëlqyeshëm në matjet amperometrike tek potenciali 0V. Biosensori i zhvilluar ka treguar të ketë rend linear në përqendrime nga 4.0 – 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$, kufi të detektimit LOD = 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tek potenciali operues 0 V, 3.0 – 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ me LOD = 0.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ në potencial operues -0.1 V, dhe 1.5 – 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ me LOD = 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ në potencial operues -0.15 V.

Duhet të theksohet se sensitiviteti i biosensorit bie në mënyrë të ndjeshme me vjetërsinë e tij. Optimizimi i kushteve të ruajtjes do të jetë një hap i rëndësishëm në të ardhmen. Nga ana praktike zhvillimi i elektrodave të freskëta nuk është i vështirë ngase ka elektroda të gatshme komerciale të cilat janë të modifikuara me grafen (lloji DRP-110GPH) me çka procesi i përgatitjes së elektrodave nuk merr më shumë se 30 minuta kohë.

Me këtë kontribut gjithashtu është demonstruar sjellja biosensorit amperometrik në analizën e frutave të ndryshme të malit, i përbërë nga pasta e karbonit dhe modifikuar me nanotuba të karbonit dhe tirozinazë. Pas disa hapave të optimizimit është realizuar përcaktimi i sasive totale antioksiduese ekuivalent me Troloksin (TEAC) në dredhëza, manaferra, mjedër, boronicë dhe boronicë e kuqe. Sasia më e lartë e polifenoleve shprehur në formë të TEAC është gjetur tek boronica e kuqe (6378 mg/100g) dhe tek mjedrat (5317 mg/100g) në materien e thatë, gjithashtu edhe në pulp; boronicë e kuqe (935 mg/100g) dhe mjedër (793 mg/100g). Sasia më e ulët e TEAC është gjetur tek dredhëzat në materien e thatë (1569 mg/100g) dhe në pulp (133mg/100g). Rezultatet e fituara janë krahasuar me metodën referente DPPH, por gjithashtu edhe me metodat tjera (ORAC, TRAP, FRAP), bazuar në spektrometri marrë nga literatura. Mund të thuhet se rezultatet tona të fituara me përdorimin e biosensorit amperometrik, janë në korrelacion të mirë me metodën DPPH. Për metodat ORAC dhe TRAP mund të arrihen vlerat e korrelacionit më të larta se 0.9, përjashtimisht tek mjedrat. Duhet të përmendet që rezultatet e fituara nga biosensori shtyjnë një gabim negativ, për shkak të prezencës së komponimeve jofenolike, në masë të madhe të pranishme të AA. Për më tepër biosensori elektrokimik është i përshtatshëm për përcaktimin e përmbajtjes totale fenolike dhe kapacitetit total antioksidues për mostrat të cilat kanë sasi të ulët të antioksidantëve jofenolik. Si disavantazh edhe këtu, duhet të përmendet jetëgjatësia e biosensorit ku me kalimin e kohës fillon të zbritet intensiteti i sinjalit përafërsisht pas një jave. Biosensori i zhvilluar ofron një pajisje mobile për kontrollin e shpejtë të kualitetit të ushqimeve në aspektin e freskisë së tyre dhe vlerave nutritive. Ky biosensor si

përparësi ka kosto të ulët, përdorimin e instrumenteve të thjeshta, matjen e mostrave me turbullirë, punimi me kemikate më pak të rrezikshme etj. Biosensor i zhvilluar nuk e zëvendëson analizën spektrometrike por paraqet një alternativë. Si metodë e zhvilluar mund të shërbej si komplementare me ato të zhvilluara deri më tani duke sjellë informata shtesë rreth analizës së mostrave, reflektimin direkt në vetitë elektrokimike.

Elektroda e diamantit e dopuar me bor e integruar në sistemin FIA ka treguar të jetë efikase në përcaktimin e sasive totale antioksiduese ekuivalent me Troloksin gjatë analizës së mostrave të çokolatës duke paraqitur një pajisje të thjeshtë analitike për përcaktimin e kualitetit të çokollatës, veçanërisht në përcaktimin e përmbajtjes së kakaos (w/w). Rendi linear për këtë metodë e analitike të zhvilluar ka qenë 5 – 100 mg · L⁻¹ karakterizuar me koeficient të korrelacionit $R^2 = 0.9994$. Rezultatet e analizave të çokolatës kanë treguar se kemi korrelacion të mirë në mes sasive totale antioksiduese ekuivalent me Troloksin dhe përmbajtjes së kakaos e cila është deklaruar në paketim të çokolatës. Ky studim bazik paraqet një hap të parë drejt zhvillimit të një metode të thjeshtë analitike për përcaktimin e kakaos si burim i polifenoleve dhe antioksidantëve tjerë potencial. Sistemi i tillë i zhvilluar do të mund të gjejë aplikim në kontrollin e kualitetit të ushqimit kryesisht.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] F.A. Carey, R.M. Giuliano. Organic Chemistry. McGraw-Hill Education, 2014.
- [2] Smith JG. Organic chemistry. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2011. 1285p.
- [3] Morrison RT, Boyd R N. Chemia Organiczna. 4th ed. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe; 1985. 966p.
- [4] Magdalena Sobiesiak. Chemical Structure of Phenols and Its Consequence for Sorption Processes 2017. IntechOpen
- [5] S.D. Sarker, L. Nahar, Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic, and Natural Product Chemistry, 2007. doi:10.1002/9781118687529.
- [6] D.J.D.L.D. Y. Singh, Undergraduate organic chemistry, 2010.
- [7] J.B. Baruah, CHEMISTRY OF PHENOLIC COMPOUNDS: STATE OF THE ART, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011. doi:10.1039/c3ce27017c.
- [8] Meredith TJ, Goulding R. Paracetamol. Postgraduate Medical Journal 1980;56:459-473.
- [9] Ivey KJ, Setttee P. (1976). Effect of paracetamol (acetaminophen) on gastric acid fluxes and potential difference in man. Gut., 17(11):916–9.
- [10] Clissold SP. (1986). Paracetamol and phenacetin. Drugs, 32(4), 46–59.
- [11] Lancaster EM, Hiatt JR, Zarrinpar A.(2015). Acetaminophen hepatotoxicity:an updated review. Arch Toxicol, 89, 193–9.
- [12] Myers RP, Li B, Fong A, Shaheen AA, Quan H. (2004). Hospitalizations for acetaminophen overdose: a Canadian population-based study from 1995 to 2004. BMC Public Health, 7, 143.
- [13] Li Y, Chen SM. The electrochemical properties of acetaminophen on bare glassy carbon electrode. Int J Electrochem Sci. 2012;7:2175–87.
- [14] Gil ES, Cout RO. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. Rev Bras. 2013; 23:542–58.
- [15] I. M. Apetrei, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, D. Tutunaru (2014). Biosensors Based on Graphene Modified Screen-Printed Electrodes for The Detection of Catecholamines. Romanian Biotechnological Letters 19(5), 9801-9809.
- [16] Orlando Fatibello-Filho, Karina Omuro Lupetti, Iolanda Cruz Vieira (2001). Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (Persea americana) biosensor. Talanta, 55(4), 685-692.
- [17] Luane Ferreira Garcia, Stephen Rathinaraj Benjamin, Rafael S. Antunes, Flavio Marques Lopes, Vernon Sydwill Somerset & Eric de Souza Gil (2016). Solanum melongena polyphenol oxidase biosensor for the electrochemical analysis of paracetamol. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 46 (8).

- [18] Aazam Aliabadi, Gholam Hossein Rounaghi, Mohhammad Hossein Arbab Zavar (2017). A new droplet-based polymeric banana electrochemical biosensor for analysis of one microliter solution of paracetamol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 182-189.
- [19] Rafael Souza Antunes, Luane Ferreira Garcia, Vernon Sydwill Somerset, Eric de Souza Gil and Flavio Marques Lopes (2018). The Use of a Polyphenoloxidase Biosensor Obtained from the Fruit of Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) in the Determination of Paracetamol and Other Phenolic Drugs. *Biosensors*, 8, 36.
- [20] Orlando Fatibello-Filho, Karina Omuro Lupetti, Oldair Donizeti Leite and Iolanda C. Vieira (2007). Voltammetric determination of paracetamol in pharmaceuticals using a zucchini (*Cucurbita pepo*) tissue biosensor. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 49, e157-e161.
- [21] Peter A. Vaughan, Lesley D.L. Scott and Jerome F. McAleer (1991). Amperometric biosensor for the rapid determination of acetaminophen in whole blood. *Analytica* 248(2), 361-365
- [22] Dalibor M. Stankovic, Miloš Ognjanović, Milica Jović, Valentina Cuplić, Andreas Lesch, Hubert H. Girault, Marija Gavrović Jankulović and Bratislav Antić (2019). Disposable Biosensor Based on Amidase/CeO₂/GNR Modified Inkjet-printed CNT Electrodes-droplet Based Paracetamol Detection in Biological Fluids for “Point-of-care” Applications. *Electroanalysis*, 31, 1– 10.
- [23] Douglas Vieira Thomaz, Mayk Teles de Oliveira*, Germán Sanz Lobón, Carlos Eduardo Peixoto da Cunha, Fabio Bahls Machado, Emily Kussmaul Gonçalves Moreno, Karla Carneiro de Siqueira Leite, Nara Ballaminut, Morgana Fernandes Alecrim, Murilo Ferreira de Carvalho, Bruna Guimarães Isecke, Isaac Yves Lopes de Macêdo, Renê Oliveira do Couto, Edson Silvio Batista Rodrigues, Luiz Alcir de Faria Carvalho, Leo Fernandes Ávila (2018). Development of Laccase-TiO₂@Carbon Paste Biosensor for Voltammetric Determination of Paracetamol. *International journal of electrochemical science*, 13, 10884 – 10893.
- [24] Ana Carolina Sousa Pereira, Daniela Nunes da Silva, Laís Sales Portoa, Arnaldo César Pereira (2020). Development of an electrochemical biosensor based on nanostructured carbon materials for paracetamol determination. *Electroanalysis*, 32, (9).
- [25] Ezgi Bayrama, Erol Akyilmaza (2016). Development of a new microbial biosensor based on conductive Polymer / multiwalled carbon nanotube and its application to Paracetamol determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233(5), 409-418.
- [26] Ismail I. Althagafi, Mohammed A. Kassem, and Mohamed I. Awad (2019). Enhanced Electrocatalytic Oxidation of Paracetamol at DNA Modified Gold Electrode. *Electroanalysis*, 31, 1– 9.
- [27] M. Hu. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arm. *Mol. Pharm.* Vol 4, (2007), pp.803-806.
- [28] S. Ramos; J. Nutr. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Biochem.* Vol. 18, (2007), pp. 427-442.
- [29] S. B. Lotito & B. Frei, :”Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon” *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 41, (2006), pp. 1727-1764.

- [30] G. R. Beecher, :” Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake” J. Nutr. Vol. 133, (2003),pp. 3248S- 3254S.
- [31] P. Fresco, F. Borges, C. Diniz, M.P.M. Marques, :”New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols” Med. Res. Rev. Vol. 26, (2006), pp. 747-766.
- [32] R. Slimestad, et al., :”Onions: a source of unique dietary flavonoids” J. Agric. Food Chem. Vol.55, (2007), pp. 10067-10080.
- [33] B. Frei & J. V. Higdon, :”Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies” J. Nutr. Vol 133, 3275S-3284S.
- [34] M. Kampa, et al. :”Polyphenols and cancer cell growth” Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Vol. 159, (2007), pp. 79-113.
- [35] S. Shankar, et al. :”Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer” Front. Biosci. Vol.12, (2007), pp. 4881 -4899.
- [36] C. G. Fraga, :” Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions” IUBMB Life, Vol 59, (2007), pp. 308-315.
- [37] R. J. Williams, JP. [Spencer](#), C. Rice-Evans, :” Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?” Free Radic. Biol. Med. Vol.36, (2004) pp. 838-849.
- [38] Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancerrelated biological pathways: O. Benavente-Garcia, et al.; Curr. Cancer Drug Targets 7, 795 (2007)
- [39] Reading the tea leaves: anticarcinogenic properties of (-)-epigallocatechin-3-gallate: J. R. Carlson, et al.; Mayo Clin. Proc. 82, 725 (2007)
- [40] Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas: M. Friedman; Mol. Nutr. Food Res. 51, 116 (2007)
- [41] Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?: B. Halliwell; Cardiovasc. Res. 73, 341 (2007)
- [42] Aprotosoai AC, Luca SV, Miron A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products – An overview. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016;15(1):73–91.
- [43] Montagna MT, Diella G, Triggiano F, Caponio GR, De Giglio O, Caggiano G, et al. Chocolate, “Food of the Gods”: History, science, and human health. Int J Environ Res Public Health. 2019;16(24):4960.
- [44] Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2011;15(10):2779– 811.
- [45] Kopřiva P. As good as half of the cocoa content was missing in instant drink MalCao. Brno, Czech Republic: Czech Agriculture and Food Inspection Authority (CAFIA); 2016. Available from: <https://www.szpi.gov.cz/en/article/as-good-as-half-of-the-cocoa-content-was-missing-in-instant-drinkmalcao.aspx?q=JmNobnVtPTEmaGw9Y29jb2E%3d>.
- [46] Genovese MI, da Silva Lannes SC. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. Food Sci Technol. 2009;29(4):810–4.

- [47] Švorc L, Tomčík P, Svítková J, Rievaj M, Bustin D. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. *Food Chem.* 2012;135(3):1198–204.
- [48] Farag AS, Sýs M, Hájek T, Vytřas K. Voltammetric determination of ethylvanillin and methylvanillin sum at carbon paste electrode modified by sodium dodecyl sulfate in selected foodstuffs. *Monatsh Chem.* 2018;149:1945–53.
- [49] Brčanović JM, Pavlović AN, Mitić SS, Stojanović GS, Manojlović DD, Kaličanin BM, Veljković JN. Cyclic voltammetric determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: Correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds. *Food Technol Biotechnol.* 2013;51(4):460–70.
- [50] Švorc L, Haššo M, Sarakhman O, Kianičková K, Stanković DM, Otrřisal P. A progressive electrochemical sensor for food quality control: Reliable determination of theobromině in chocolate products using a miniaturized boron-doped.
- [51] Triantis, T.; Stelakis, A.; Dimotikali, D.; Papadopoulos, K. Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 536, 101–105.
- [52] Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Shaikh, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85, 957–998.
- [53] Atala, E.; Vásquez, L.; Speisky, H.; Lissic, E.; López Alarcón, C. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC pyrogallol red methodology. *Food Chem.* **2009**, 113, 331–335.
- [54] Rabeta, M.S.; Nur Faraniza, R. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *Int. Food Res. J.* **2013**, 20, 1691–1696.
- [55] Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, A.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M. Solid phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* **2010**, 123, 1055–1061.
- [56] Pantelidis, G.G.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G.A.; Diamantidis, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**, 102, 773–778.
- [57] Giacomelli, C.; Giacomelli, F.C.; Alves, L.O.; Timbola, A.K.; Spinelli, A. Electrochemistry of vitamin E hydroalcoholic solutions. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, 748–755.
- [58] Isaacs, N.S.; van Eldik, R. A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1997**, 1465–1468.
- [59] Sýs, M.; Pekec, B.; Kalcher, K.; Vytřas, K. Amperometric enzyme carbon paste-based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8, 9030–9040.
- [60] W. L. DeLano, Palo Alto, 2003 E. I. Solomon; U. M. Sundaram; T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* 1996, 96, 2563–2605.
- [61] W. S. Oetting, *Pigm. Cell Res.* 2000, 13, 320–325.

- [62] Ibrecht Messerschmidt. 8.14 - Copper Metalloenzymes, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010, pp 489-545.
- [63] M. Fairhead, L. Thöny-Meyer, Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology, *New Biotechnology*, Volume 29, Issue 2, 2012, pp 183-191,
- [64] S. Jus, V. Kokol & G. M. Guebitz. Tyrosinase-Catalysed Coating of Wool Fibres With Different Protein-Based Biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Volume 20, 2009 - Issue 2, 2012, pp 253-269.
- [65] S. Jus, V. Kokol, G. M. Guebitz. Tyrosinase-catalysed coupling of functional molecules onto protein fibres. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 42, Issue 7, 2008, pp 535-542
- [65] Valero E, Varón R, García-Carmona F. Catalytic oxidation of acetaminophen by tyrosinase in the presence of L-proline: a kinetic study. *Arch Biochem Biophys*. 2003;416(2):218–26.
- [66] Rolff M, Schottenheim J, Decker H, Tuzek F. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem Soc Rev*. 2011;40(7):4077–98.
- [67] Valero E, Varón R, García-Carmona F. Tyrosinase-mediated oxidation of acetaminophen to 4-acetamido-o-benzoquinone. *Biol Chem*. 2002;383(12):1931–9.
- [68] Calas-Blanchard C, Istamboulié G, Bontoux M, Plantard G, Goetz V, Noguier T. Biosensor-based real-time monitoring of paracetamol photocatalytic degradation. *Chemosphere*. 2015;131:124–9.
- [69] Skládal, P. Mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode as an amperometric biosensor for phenols. *Collect. Czech. Chem*. 1991, 56, 1427–1433.
- [70] Gründler, 2007, “Chemical Sensors, an Introduction for Scientists and Engineers”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007).
- [71] “Low cost sensors”, in: Mackintosh State of the Art Series, Luton, UK: Benn Electronics.
- [72] L. Berisha, “Zhvillimi i sensorit tw ri elektrokimik pwr pwrcaaktimin e oksidit tw azotit (II) bazuar nw modifikimin e elektrodws me pastw karboni”, Desertacion Doktoratws, Tiranë (2014)
- [73] A. Hulanicki, S. Geab, F. Ingman, *Pure and Applied Chemistry*. 63 (9) pp.1247-1250 (1991).
- [74] *Chemical Sensors and Biosensors, fundamentals and application*, Florinel - Gabriel Banica (2012) John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO198SQ, United Kingdom.
- [75] V. S. BAGOTSKY, “Fundamentals of Electrochemistry”, John Wiley & Sonsinc. New Jersey (2006).
- [76] L.M. Moretto, K. Kalcher, S. Editor, D.J. Lockwood, *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors: Fundamentals*, 2014.
- [77] B. Pejicic, R. D. Marco (2006) Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization *Electrochimica Acta* 51; 6217–6229.

- [78] J. S. Schultz, R. F. Taylor, "Handbook of chemical and biological sensors", CRC Press (1996)
- [79] J. FRADEN, HANDBOOK OF MODERN SENSORS, 2004.
- [80] D. R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification; Biosensors & Bioelectronics 16, 121–131.
- [81] C.A. Galan-Vidal, J. Muhoz, C. Dominguez, S. Alegret (1995) Chemical sensors, biosensors and thick-film technology trends in analytical chemistry 14/5, 325-231.
- [82] A. Chaubey, B.D. Malhotra. Biosensors & Bioelectronics 17 pp. 441-456 (2002).
- [83] Fatma Dridi, Mouna Marrakchi, Mohamed Gargouri, Joelle Saulnier, Nicole Jaffrezic-Renault, Florence Lagarde (2017). 5 - Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety and quality assessment. Nanobiosensors, 167-204
- [84] K. Cammann, Fresenius Z. Analytical Chemistry 287 pp. 1-9 (1977)
- [85] Cibele Marli, Cação Paiva Gouvêa, Biosensors for Health Applications.
- [86] Douglas Skoog, Donald M. West, Stanley R. Crouch - Fundamentals of Analytical Chemistry 8e HQ, United States (Thomson, 2004)
- [87] David Harvey, Modern Analytical Chemistry, DePauw University, McGraw-Hill Higher Education 2000.
- [88] J. Wang, Analytical Electrochemistry, 2006. doi:10.1002/0471790303.
- [89] F. A. Settle, "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", Prentice Hall PTR (1997).
- [90] D. K. Gosser Jr. "Cyclic Voltammetry, Simulation and analysis of reaction mechanisms", VCH Publishers Inc. New York (1993).
- [91] D.T Sawyer, W.R. Heineman, and J.M. Beebe (1984), Chemistry Experiments for Instrumental Methods
- [92] Kissinger P., Heineman W.R. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry (Dekker, 1996)(T)(952s).
- [93] I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytrás, Electroanalysis with carbon paste electrodes, 2012.
- [94] A. Escarpa, M.C. González, M.A. López, Agricultural and Food Electroanalysis, 2015. doi:10.1002/9781118684030.
- [95] D.C. Harris, QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS, 2010.
- [96] X. Cui, G. Liu, Y. Lin : "Amperometric biosensors based on carbon paste electrodes modified with nanostructured mixed-valence manganese oxides and glucose oxidase, Nanomedicine: Nanotechnology" Biology and Medicine 1/2, (2005) 130-135.
- [97] Zs. Papp, V. Guzsány, I. Švancara, K. Vytrás (2011) Carbon paste electrodes for the analysis of some agricultural pollutants and trace metals, Journal of Agricultural Science and Technology 5, No. 1; 85-92.

- [98] Aoife C. Power, Brian Gorey, Shaneel Chandra and James Chapman. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors: a review. *Nanotechnol Rev* 2018; 7(1): 19–41
- [99] L. Chen, Y. Tang, K. Wang, C. Liu, S. Luo, Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application, *Electrochemistry Communications*. 13 (2011) 133–137. doi:10.1016/j.elecom.2010.11.033.
- [100] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J.W. Suk, J.R. Potts, R.S. Ruoff, Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications, *Advanced Materials*. 22 (2010) 3906–3924.
- [101] D. Chen, H. Feng, J. Li, Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications, *Chemical Reviews*. 112 (2004) 6027–6053.
- [102] <https://pngio.com/images/png-a2163258.html> 01/10/2021.
- [103] Iijima S. Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B Condens. Matter* 2002, 323, 1–5.
- [104] Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 1993, 363, 603–605.
- [105] Qureshi A, Kang WP, Davidson JL, Gurbuz Y. Review on carbon derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. *Diam. Relat. Mater.* 2009, 18, 1401–1420.
- [106] Yang C, Denno ME, Pyakurel P, Venton BJ. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: a review. *Anal. Chim. Acta* 2015, 887, 17–37.
- [107] Marega R, De Leo F, Pineux F, Sgrignani J, Magistrato A, Naik AD, Garcia Y, Flamant L, Michiels C, Bonifazi D. Functionalized Fe-filled multiwalled carbon nanotubes as multifunctional scaffolds for magnetization of cancer cells. *Adv. Funct. Mater.* 2013, 23, 3173–3184.
- [108] Yu G, Wu W, Zhao Q, Wei X, Lu Q. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 68, 288–294.
- [109] Birch ME, Ruda-Eberenz TA, Chai M, Andrews R, Hatfield RL. Properties that influence the specific surface areas of carbon nano-tubes and nanofibers. *Ann Occup Hyg.* 2013;57(9):1148–66.
- [110] Brownson DA, Foster CW, Banks CE. The electrochemical performance of graphene modified electrodes: an analytical perspective. *Analyst.* 2012;137(8):1815–23.
- [111] Sýs M, Žabčíková S, Červenka L, Vytřas K. Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol. *Potr S J F Sci.* 2017;11(1):96–105.
- [112] Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv Mater.* 2010;22:3906–24.
- [113] Sheldon RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92:467–77.

- [114] Gorton L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*. 1995;7(1):23–45.
- [115] Calvo EJ, Danilowicz C. Amperometric enzyme electrodes. *J Braz Chem Soc*. 1997;8(1):563–74.
- [116] Hodis J. New facts about paracetamol, risks of overdose, intoxication and their management. *Practical Pharm*. 2015;11(3):90–2.
- [117] Duckworth HW, Coleman JE. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem*. 1970;245:1613–25.
- [118] Sýs M, Pekec B, Kalcher K, Vytřas K. Amperometric enzyme carbon paste-based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *Int J Electrochem Sci*. 2013;8:9030–40.
- [119] Vaughan PA, Scott LDL, McAller JF. *Anal Chim Acta*. 1991;248(2):361–5.
- [120] Maghear A, Cristea C, Marian A, Marian IO, Sandulescu R. Anovel biosensor for acetaminophen detection with Romanian clays and conductive polymeric films. *Farmacia*. 2013;61:1.
- [121] Vandepu M, Patris S, Silva H, Parsajoo C, Dejaeghere B, Martinez JA, et al. Application of a tyrosinase microreactor – detector in a flow injection configuration for the determination of affinity and dynamics of inhibitor binding. *Sensors Actuators B Chem*. 2017;248:385–94.
- [122] Santos AM, Vicentini FC, Deroco PB, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O. Square-wave voltammetric determination of paracetamol and codeine in pharmaceutical and human body fluid samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *J Braz Chem Soc*. 2015;26(10):2159–68.
- [123] Lourenção BC, Medeiros RA, Rocha-Filho RC, Mazo LH, Fatibello-Filho O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*. 2009;78(3):748–52.
- [124] Babaei A, Khalilzadeh B, Afrasiabi M. A new sensor for the simultaneous determination of paracetamol and mefenamic acid in a pharmaceutical preparation and biological samples using copper(II) doped zeolite modified carbon paste electrode. *J Appl Electrochem*. 2010;40(8):1537–43.
- [125] Sýs, M.; Metelka, R.; Mikysek, T.; Vytřas, K. Improvement of enzyme carbon paste based biosensor using carbon nanotubes for determination of water soluble analogue of vitamin E. *Chem. Pap*. 2015, 69, 150–157.
- [126] Sýs, M.; Metelka, R.; Vytřas, K. Comparison of tyrosinase biosensor based on carbon nanotubes with DPPH spectrophotometric assay in determination of TEAC in selected Moravian wines. *Monatshefte fuer Chem*. 2015, 146, 813–817.
- [127] Skládal, P. Mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode as an amperometric biosensor for phenols. *Collect. Czech. Chem*. 1991, 56, 1427–1433.
- [128] Akyilmaz, E.; Kozgus, O.; Türkmen, H.; Cetinkaya, B. A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino-benzene. *Bioelectrochemistry* 2010, 78, 135–140.

- [129] USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Available online: <https://ods.od.nih.gov/pubs/usdandb/VitaminC-Content.pdf> (4 Prill 2020).
- [130] Ancos, B.; González, E.M.; Cano, M.P. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4565–4570. [CrossRef] [PubMed]
- [131] Jabło 'nska-Ry's, E.; Zalewska-Korona, M.; Kalbarczyk, J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolic content in wild edible fruits. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 2009, 17, 115-120.
- [132] Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4113–4117.
- [133] Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 701–705.
- [134] Pornanong, A.; Nipaporn, B.; Teerapol, S. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Res. Int.* 2010, 43, 1093–1097.
- [135] Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Myhrstad, M.C.W.; Barikmo, I.; Hvattum, E.; Remberg, S.F.; Wold, A.B.; Haffner, K.; Baugerod, H.; Andersen, L.F.; et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Nutr. J.* 2002, 132, 461–471. [CrossRef]
- [136] Holasová, M.; Fiedlerová, V. Comparison of methods for determination of antioxidant activity in fruit and vegetable juices. *Chem. Listy* 2011, 105, 766–772.
- [137] Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Nutr. J.* 2003, 133, 2812–2819.
- [138] Tosun, M.; Ercisli, S.; Karlidag, H. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J. Food Sci.* 2009, 74, C575–C579.

7. BIOGRAFIA

Arbër Frangu u lind në Sllatinë të Poshtme të komunës së Vitisë më datë 03.09.1991. Shkollën fillore e përfundoi në vendlindje ndërsa në vitin shkollor 2007/2008 u regjistrua në Gjimnazin Kuvendi i Arbrit në Ferizaj, drejtimi Shkencat e Natyrës. Në vitin akademik 2010/2011 u regjistrua për herë të parë në Fakultetin e Shkencave Matematiko Natyrore në Departamentin e kimisë, drejtimi Inxhinierik. Në vitin 2013 përfundoi studimet themelore dhe mori titullin Bachelor i kimisë–Inxhinierik, dhe po të njëjtin vit regjistroi edhe studimet ne nivelin master në drejtimin Kimi Analitike dhe Ambientale në po të njëjtin Institucion arsimor të cilat i përfundoi në shtator të vitit 2015.

Në vitin akademik 2016/17 ka regjistruar nivelin e tretë të studimeve ato të doktoratës, të cilat i vazhdon pranë Universitetit të Prishtinës “Hasan Prishtina”. Arbër Frangu gjithashtu ka të përfunduar programin tjetër të studimeve bazike pranë Universitetit të Tetovës në departamentin e Kimisë me 240 kredi duke marr titullin Profesor i Diplomuar i Kimisë.

Gjatë studimeve pas diplomike ka realizuar edhe mobilitete të shumta në universitete të Evropës qendrore kryesisht, pjesëmarrje në konferenca dhe worshope të ndryshme. Arbër Frangu ka të botuar disa artikuj shkencorë si autor i parë ose si bashkautorë, të gjitha me impakt faktor dhe të indeksuara në platformat më kredibile të kohës.

Nga viti 2016 është aktivisht i angazhuar në procesin mësimorë në nivelin universitar dhe atë parauniversitar.

8. ANEKS – KONFERENCA, PUBLIKIME DHE MOBILITETE SHKENCORE

8.1 Publikime shkencore

1. **A. Frangu**, K. Pravcová, P. Šilarová, T. Arbneshi, M. Sýs, **“Flow injection tyrosinase biosensor for direct determination of acetaminophen in human urine”** Analytical and bioanalytical chemistry 2019, 411 (11), 2415-2424 <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01687-4> (Impact factor 4.15)

2. **A. Frangu**, AM. Ashrafi, M. Sýs, T Arbneshi, R. Metelka, V. Adam, M. Vlček, **“Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes”** Applied Sciences 2020, 10 (7), 2497 <https://doi.org/10.3390/app10072497> (Impact factor 2.67)

3. T. Arbneshi, **A. Frangu**, M. Frühbauerová, L. Červenka, L. Berisha, K. Kalcher and M. Sýs. **Flow Injection Amperometric Evaluation of Antioxidant Capacity of Chocolates Having Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode.** Food Technology and Biotechnology 59 (2) 2021 <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6984> (Impact factor 3.91)

8.2 Konferencat Shkencore

1. **“Flow injection tyrosinase amperometric biosensor with a single-layer graphene modified screen-printed electrode for determination of acetaminophen”** **A. Frangu**, M. Sýs, T. Arbneshi, K. Vytrás XXXVIII. Moderní elektrochemické metody: sborník příspěvků, Nëntor 2018.

2. “Determination of total antioxidant capacity using boron doped diamond electrode in flow injection mode”, **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Kurt Kalcher, Milan Sys, 3rd Webinar on Nanotechnology & Nanomaterials, March 22-23, 2021

3. "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Milan Sýs, 1st INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL SCIENCES, (10-12 SEPTEMBER 2021 Atatürk University, ERZURUM, TURKEY)

4. Prezantim me anë të posterit: "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol", **Arbër Frangu**, Tahir Arbneshi, Milan Sýs, TNT2021 International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).







www.tntconf.org

Tirana (Albania)
October 04, 2021

This is to certify that

Arbër Frangu

from

University of Prishtina "Hasan Prishtina", (Republic of Kosovo)

has attended "Trends in Nanotechnology (TNT2021)" International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

On behalf of the Organising Committee



Dr. Antonio Correia
Phantoms Foundation, Spain

Phantoms Foundation - Calle Alfonso Gomez 17 / Planta 2 - Left 16 / 28037 Madrid (Spain)



www.tntconf.org

Tirana (Albania)
October 04, 2021

This is to certify that

Arbër Frangu

from

University of Prishtina "Hasan Prishtina", (Republic of Kosovo)

has presented a Poster Contribution entitled: "Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrode modified with graphene and tyrosinase for direct determination of paracetamol" – Authors (Arbër Frangu, Tahir Arbneshi , Milan Sýs) at TNT2021 International Conference (Tirana-Albania, October 04-08, 2021).

On behalf of the Organising Committee



Dr. Antonio Correia
Phantoms Foundation, Spain

Phantoms Foundation - Calle Alfonso Gomez 17 / Planta 2 - Left 16 / 28037 Madrid (Spain) -

8.3 Mobilitete shkencore

Nga viti 2017 e deri në vitin 2020 janë realizuar katër mobilitete shkencore në periudha dhe kohë gjatësi të ndryshme në Universitetin e Prudubices, departamentin e kimisë analitike në kuadër të programin CEEPUS në bashkëpunim me Ministrinë e Arsimit dhe Universitetin e Prishtinës.