



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**



**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA  
Scienze e Biotecnologie  
dei Sistemi Agrari e Forestali  
e delle Produzioni Alimentari**

Indirizzo Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXVIII

**Sviluppo e studio di biosensori sostenibili e performanti  
dedicati alla determinazione di composti nutraceutici e  
contaminanti di interesse agroalimentare**

dr. Patrizia Monti

*Direttore della Scuola  
Referente di Indirizzo  
Docente Guida  
Co-tutors*

prof. Antonello Cannas  
dott. Severino Zara  
dott. Giovanna Delogu  
prof. Pier Andrea Serra  
prof. Quirico Migheli

Anno accademico 2014-2015



<b>SOMMARIO</b>	<b>pagina</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	4
<b>1.1 - I biosensori e il settore agroalimentare</b>	4
<i>1.1.1 Biosensori enzimatici amperometrici</i>	8
<b>1.2 - Film polimerici permselectivi</b>	10
<b>1.3 - <math>\beta</math>-Ciclodestrina</b>	14
<i>1.3.1 <math>\beta</math>-Ciclodestrina: generalità</i>	15
<i>1.3.2 <math>\beta</math>-Ciclodestrina: applicazioni in biosensoristica</i>	18
<b>2. SCOPO DEL PROGETTO</b>	20
<b>3. SINTESI DEL LAVORO DI TESI</b>	22
<b>4. ABSTRACT</b>	25
<b>5. CAPITOLO I: A study of an acetylcholine esterase based biosensor for mycotoxins detection by means of a telemetric system</b>	28
<b>5.1 Sintesi</b>	29
<b>5.2 Manoscritto</b>	31
<b>6. CAPITOLO II: Electropolymerized phenol derivatives as permselective polymers for biosensor applications</b>	43
<b>6.1 Sintesi</b>	44
<b>6.2 Manoscritto</b>	47
<b>7. CAPITOLO III: Improving permselectivity of electropolymerized natural phenols choosing polymerization potential</b>	63
<b>7.1 Sintesi</b>	64
<b>7.2 Manoscritto</b>	69
<b>8. CAPITOLO IV: <math>\beta</math>-cyclodextrin modification with sustainable reagents and conditions for biosensor application</b>	94
<b>8.1 Sintesi</b>	95
<b>8.2 Manoscritto</b>	98

<b>9. CAPITOLO V: Sensor applications of a sulfur-containing phenol used for leather curing</b>	118
<b>9.1 Sintesi</b>	119
<b>9.2 Manoscritto</b>	121
<b>10. DISCUSSIONE GENERALE E PROSPETTIVE FUTURE</b>	132
<b>11. RINGRAZIAMENTI</b>	144
<b>12. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	145



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 - I biosensori e il settore agroalimentare

I biosensori sono dei dispositivi in grado di rilevare la presenza di una determinata sostanza -l'*analita*- producendo un segnale misurabile. La capacità di interagire con l'*analita*, quindi la specificità, è dovuta alla componente biologica del dispositivo. L'interazione viene poi rilevata dalla componente artificiale -il *trasduttore*- che elabora il segnale e, eventualmente, lo amplifica. Tale segnale rivela la presenza dell'*analita* ed è correlato alla concentrazione dello stesso. Il primo biosensore è stato costruito nel 1967 da Updike e Hicks. L'enzima glucosio ossidasi immobilizzato su di un sensore elettrochimico è stato in grado di misurare la concentrazione del glucosio in una soluzione biologica (Updike e Hick, 1967).

I biosensori possono essere divisi in base alla natura della componente biologica (anticorpi, DNA, RNA, aptameri, cellule intere, membrane, *etc.*) o al tipo di trasduttore usato (elettrochimico, ottico, massa o termico), come schematizzato in Figura 1.

Oggi giorno, esistono biosensori per ogni tipo di molecola, dalle più piccole (come O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) alle più complesse (metaboliti, ormoni *etc.*).

Nel settore agroalimentare è largamente incoraggiato lo sviluppo di questa particolare tecnologia legata ai biosensori per via della sua versatilità, sensibilità, prontezza di risposta, costi contenuti e idoneità alla produzione di massa in alternativa a metodi di analisi di tipo tradizionale quali tecniche cromatografiche o saggi immunologici. La richiesta di metodiche veloci e affidabili è in aumento per diversi motivi; sia per stabilire la qualità negli alimenti o dei processi produttivi, rilevando determinate molecole che contribuiscono alla qualità e/o salubrità del prodotto, sia per questioni di sicurezza, come accertare la presenza di tossine alimentari e/o allergeni. Ad esempio, un sistema biosensore/sensore si è dimostrato un valido metodo alternativo rispetto a una tradizionale titolazione o analisi in HPLC per misurare l'acido ascorbico (Barberis *et al.*, 2012) e il potere antiossidante di fenoli in succhi di frutta, presentando i vantaggi di un minor costo e rapidità di analisi (Barberis *et al.*, 2014).

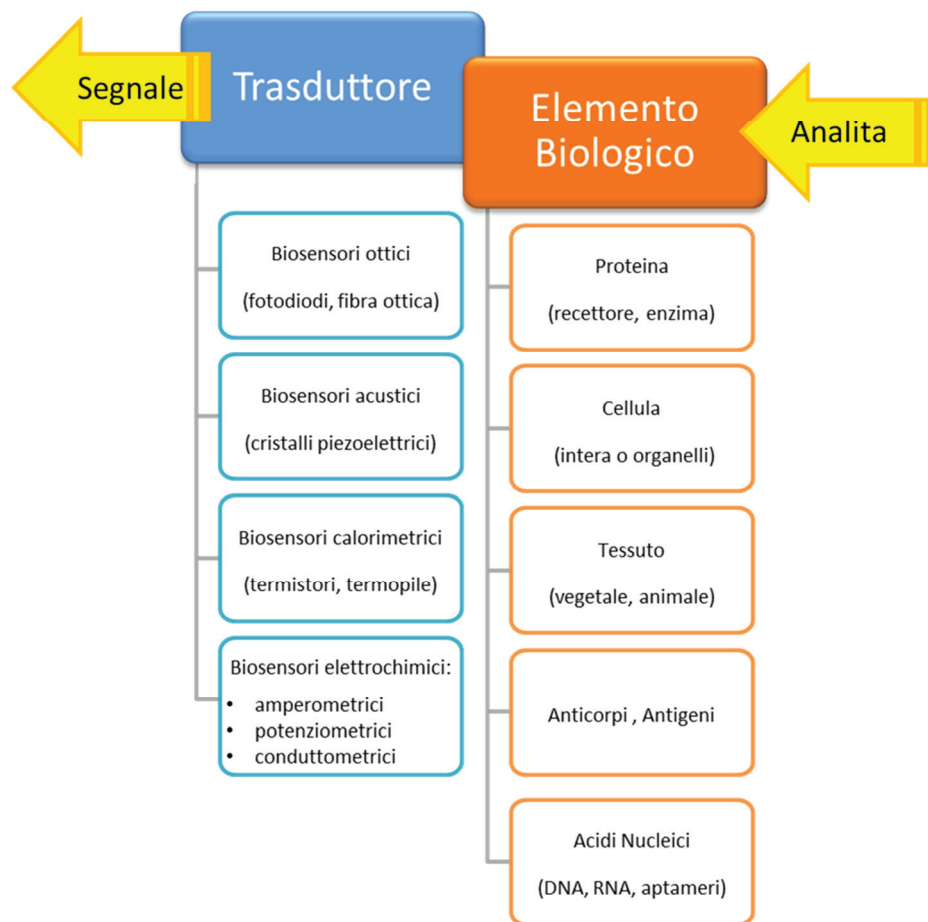


Figura 1 – Schema delle diverse nature dei componenti di un biosensore. L’interazione tra l’analita e l’elemento biologico è trasformata e talvolta amplificata dal trasduttore che produce un segnale di tipo analitico misurabile.

Dal punto di vista della sicurezza alimentare vi è la reale esigenza di creare nuovi dispositivi per rilevare, in modo sicuro, veloce ed economico, la presenza di agenti tossici naturalmente presenti in determinati alimenti. Tra questi, le micotossine sono molecole con attività tossica prodotte in particolari condizioni microclimatiche da funghi microscopici e filamentosi, meglio noti come “muffe”. Tra le più conosciute e studiate, si citino le aflatoossine (prodotte soprattutto da funghi appartenenti al genere *Aspergillus*), le ocratossine (prodotte da funghi appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium*), le tossine prodotte da specie del genere *Fusarium*, che includono zearalenoni, fumonisine e tricoteceni e la patulina (prodotta da specie di *Penicillium*) (Figura 2). I prodotti suscettibili di contaminazione destinati al consumo umano o animale sono numerosi e rappresentano una minaccia per la salute e un danno per l’economia (Bennett e Klich,

2003). Per via della loro stabilità termica e chimica, le micotossine permangono nelle matrici anche se sottoposte a lunga conservazione e ai processi produttivi.

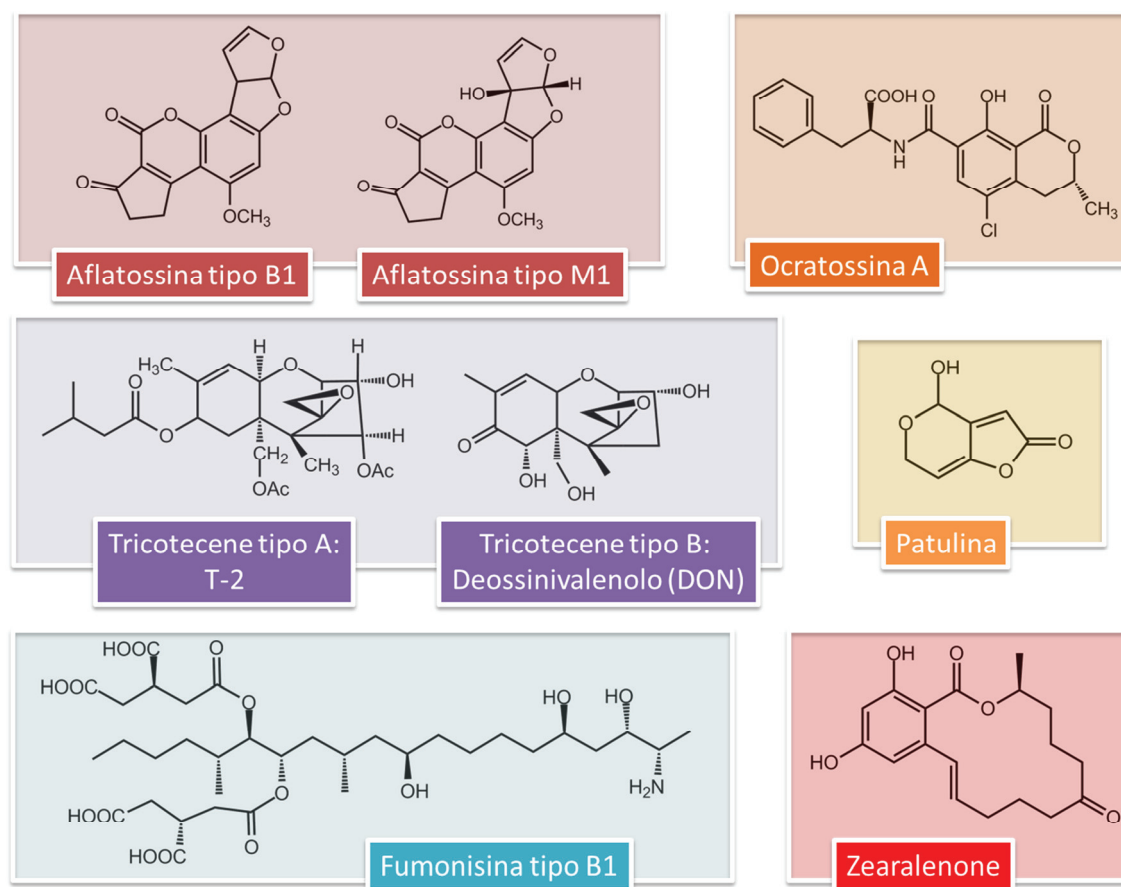


Figura 2 – Formula di struttura di alcune delle principali micotossine; in rappresentanza di ogni gruppo di micotossine vengono mostrate le molecole più significative per pericolosità e frequenza di ritrovamento.

La loro grande diversità strutturale ( Figura 2 ) e le loro diverse caratteristiche fisico-chimiche determinano la necessità di metodi analitici versatili, in grado di poter determinare micotossine di diversa natura. Il regolamento (UE) N. 165/2010 ha stabilito i tenori massimi di alcune importanti micotossine nei prodotti alimentari; per esempio, è stato fissato un tenore massimo di 2 µg/kg di aflatoxina B1 e di 4 µg/kg di aflatoxine totali per tutti i cereali ed i prodotti derivati, fatta eccezione per il granturco (tenore massimo di 5 µg/kg e 10 µg/kg per aflatoxine B1 e totali rispettivamente). In ambito legislativo europeo viene riconosciuta la pericolosità di molte micotossine e viene ribadita la necessità di metodi di controllo adeguati alla vastità e diffusione di tale problema

(Walker e Wong, 2014). Tra i metodi analitici convenzionali, i saggi di tipo cromatografico quali la TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Chan *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2000; Vahl, 1998), HRLC (High Resolution Liquid Chromatography) (Tamura *et al.*, 2015<sup>a</sup>; Tamura *et al.*, 2015<sup>b</sup>) sono quelli più impiegati. Anche metodi di dosaggio che utilizzano anticorpi mono- e policlonali (Meulenberg, 2012), come il test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Azer e Cooper, 1991) hanno trovato applicazione in questo settore. Al fine di aumentare la capacità di analisi, possono essere associati efficaci metodi estrattivi della micotossina dalla matrice (Zhao *et al.*, 2014). I metodi convenzionali presentano alcuni svantaggi, come la preparazione del campione, alti costi, necessità di personale qualificato (Kaushik *et al.*, 2013). Inoltre, i lunghi tempi di risposta non permettono una analisi in tempo reale. Tra le tecnologie innovative per la determinazione di micotossine è possibile trovare quelle basate sulla creazione di film polimeri sintetici ad impronta molecolare (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs). Sono stati sintetizzati MIPs per l'aflatossina B1 (Jiang *et al.*, 2015), per il deossinivalenolo (Choi *et al.*, 2011; Pascale *et al.*, 2008) e per la tossina T-2 (De Smet *et al.*, 2010).

Tuttavia, i biosensori si sono rivelati metodi assai più validi, in particolare le tecnologie che hanno riscosso più successo sono basate su immunobiosensori e aptameri (Rhouati *et al.*, 2013). I vantaggi consistono nella possibilità di poter ottenere un anticorpo o un aptamero per ogni micotossina e nell'alta affinità e selettività nella interazione tra questi elementi biologici. Sono stati proposti aptasensori per ocratossina (Sharma *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2012; Bonel *et al.*, 2011) e aflatossina B1 (Castillo *et al.*, 2015); tra gli immunobiosensori esistono esempi per il deossinivalenolo (Zhao *et al.*, 2012; Romanazzo *et al.*, 2010), aflatossina B1 (Chauhan *et al.*, 2015), aflatossina M1 (Gan *et al.*, 2013). L'alta specificità dovuta all'elemento biologico e la piccola dimensione dei biosensori permette la rilevazione simultanea di più micotossine in uno stesso dispositivo (Wang *et al.*, 2012).

Recentemente varie *reviews* riguardanti l'analisi delle micotossine (Kaushik *et al.*, 2013; Campas *et al.* 2012; Maragos e Busman, 2010) hanno passato in rassegna l'uso di biosensori di tipo elettrochimico e concordano su come i biosensori possano rappresentare una valida alternativa ai metodi analitici tradizionali, quali cromatografia, spettroscopia o immuno-enzimatica. In particolare, i principali vantaggi derivano dal

poter evitare procedure estrattive preventive, ridurre tempi e i costi delle analisi, realizzare dispositivi adatti ad analisi automatizzate in tempo reale (Wang e Wang, 2008) in continuo o in *batch*.

È stato realizzato recentemente un biosensore cronoamperometrico basato sulla ossidazione dell'ocratossina da parte dell'enzima perossidasi del rafano (HRP, horse radish peroxidase) (Alonso-Lomillo *et al.*, 2011).

### 1.1.1 Biosensori enzimatici amperometrici

In un tipico biosensore enzimatico amperometrico la componente biologica è un enzima appartenente alla classe delle ossidasi. L'interazione dell'enzima con l'analita prevede almeno una reazione redox nella quale un substrato è ossidato sulla superficie dell'elettrodo (molecola *reporter*) generando una corrente elettronica. Questo segnale può essere determinato tramite potenziometria o amperometria tramite un potenziostato come mostrato in Figura 3.

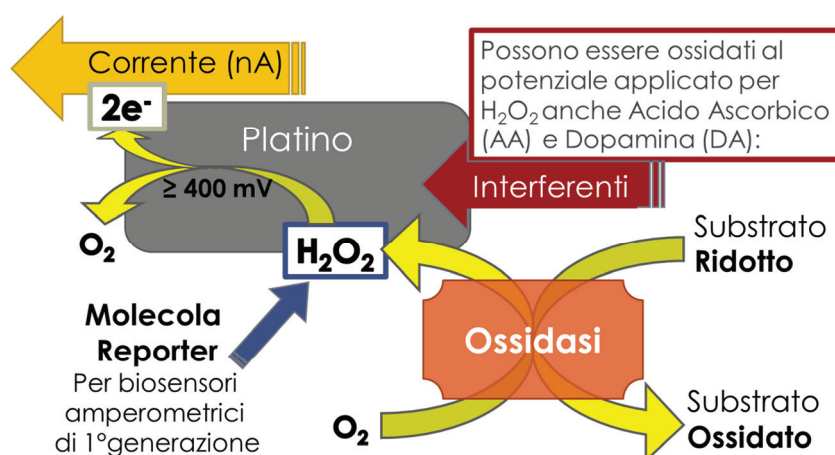
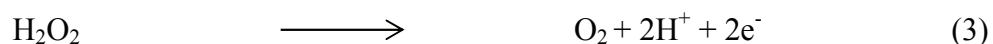


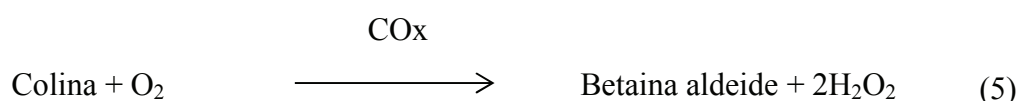
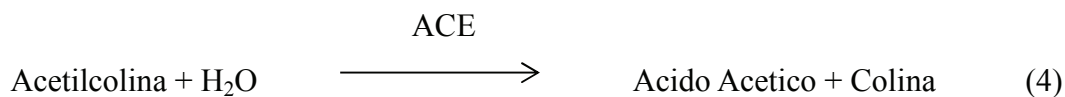
Figura 3 - Schema di un biosensore enzimatico di tipo amperometrico nel quale l'elemento biologico è rappresentato da una ossidasi e il trasduttore è un elettrodo metallico, in questo caso platino. Il segnale analitico è la corrente elettrica generata dalla ossidazione della molecola reporter  $H_2O_2$  misurata tramite un potenziostato collegato al biosensore.

Uno dei biosensori amperometrici più diffusi è basato sull'enzima Glucosio Ossidasi (GOx) che catalizzando le reazioni (1) e (2) ossida il glucosio riducendo il cofattore FAD in  $FADH_2$ . Quest'ultimo grazie all'ossigeno si ricostituisce producendo  $H_2O_2$ , la molecola reporter di numerosi biosensori enzimatici.



L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene ossidata applicando potenziali ossidanti relativamente alti (circa +700 mV vs Ag/AgCl) sulla superficie di un elettrodo di platino grazie alle proprietà elettrocatalitiche degli ossidi del metallo presenti sulla superficie (Hall *et al.*, 1997). Il risultato delle reazioni (1), (2) e (3) correla la concentrazione del glucosio alla generazione di una corrente elettrica misurabile.

Sulla base dell'interazione specifica tra enzima e substrato sono stati proposti numerosi biosensori. Per determinare la presenza dell'acetilcolina è stato sviluppato da Mitchell nel 2004 un biosensore basato sulle reazioni catalizzate da due enzimi (reazioni 4 e 5), la acetilcolinesterasi (ACE) e la colina ossidasi (COx):



Arduini *et al.* (2007) hanno dimostrato che l'aflatossina inibisce l'acetilcolinesterasi (ACE) in una maniera reversibile. Tale inibizione è stata sfruttata in questo lavoro di tesi per la determinazione della aflatossina: più la micotossina inibisce l'ACE meno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene prodotta. Detto biosensore è anche sensibile alla presenza di organofosfati (Pohanka *et al.*, 2008).

## 1.2 - Film polimerici permselettivi

I film polimerici sono da sempre un potente strumento per migliorare le prestazioni di un biosensore; infatti fin dal 1986 l'utilizzo di un polimero conduttivo derivante dalla elettropolimerizzazione del pirrolo nella costruzione di un biosensore amperometrico per il glucosio (Umaña e Waller, 1986) permetteva una efficace immobilizzazione dell'enzima sul trasduttore. Nel biosensore i film polimerici tutt'ora svolgono svariate

funzioni come: contribuire alla immobilizzazione della parte biologica, proteggere la superficie del trasduttore, permettere la determinazione differenziale di specie con proprietà elettrochimiche simili e, ultima ma non meno importante, l'esclusione di sostanze interferenti.

Una delle caratteristiche di un biosensore amperometrico di prima generazione, infatti, è dato dal fatto che allo stesso potenziale necessario alla ottimale ossidazione della molecola reporter  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $> 500 \text{ mV vs Ag/AgCl}$ ) numerose sostanze possono essere ossidate sulla superficie dell'elettrodo. Ad esempio, l'acido ascorbico, antiossidante molto diffuso, viene ossidato su Pt a circa  $+530 \text{ mV vs Standard Calomelan Electrode}$  (Pisoschi *et al.*, 2011). Per evitare questo problema si può ricorrere a vari metodi; si possono includere mediatori redox, in maniera tale da applicare un potenziale di lavoro più basso rispetto a quello della ossidazione del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Questo permette l'eliminazione dell'interferenza di quelle specie chimiche più facilmente ossidabili (Calvo *et al.*, 1996). In alternativa si può evitare che l'interferente giunga sull'elettrodo, pretrattando il campione o, più comunemente, usando un enzima che converta la specie interferente in una inerte, come ad esempio l'ascorbato ossidasi che intercetta e converte l'acido ascorbico in deidroascorbato, una specie non ossidabile ai potenziali di lavoro usati (Oldenziel *et al.*, 2006). Il metodo più comune per aumentare la selettività rimane, tuttavia, rivestire l'elettrodo di un film polimerico caratterizzato da una diversa permeabilità nei confronti di molecole di natura diversa. La caratteristica di essere allo stesso tempo trasparente alla molecola reporter e impermeabile agli interferenti viene chiamata permselectività. Il rivestimento può essere preformato e quindi depositato sull'elettrodo come una membrana (Sternberg *et al.*, 1988), oppure elettrosintetizzato immergendo l'elettrodo in una opportuna soluzione elettrolitica contenente una molecola (monomero) in grado di polimerizzare sulla sua superficie (Malitesta *et al.*, 1990; Ohnuki *et al.*, 1983). Diversi film polimerici sono stati così ottenuti a partire da diverse classi di molecole. Il processo elettrochimico di deposizione porta rapidamente alla formazione di film organici con precise caratteristiche morfologiche che ne determinano le caratteristiche di permeabilità nei confronti di analiti, reporter e interferenti. Inoltre, i film polimerici elettrogenetati sono dotati di stabilità in solventi organici o acquosi in grado di durare nel tempo. Le condizioni di elettropolimerizzazione permettono di poter variare le proprietà del rivestimento polimerico come la morfologia e/o lo spessore partendo da uno



stesso monomero. A seconda della tecnica di elettrodeposizione adottata, poi, i film possono essere prodotti in massa con una buona riproducibilità delle loro proprietà (Cosnier e Holzinger, 2011). Per la elettrodeposizione, le tecniche più usate sono la voltammetria ciclica (CV), nella quale il potenziale applicato varia nel tempo, e l'amperometria a potenziale costante (CPA), dove il potenziale è fisso. Sebbene la CV sia un potente strumento per ottenere informazioni qualitative sulla formazione dei film polimerici esso permette la polimerizzazione di un elettrodo alla volta, diminuendo la riproducibilità dei risultati. Al contrario, la CPA permette più polimerizzazioni in parallelo, ottenendo un gruppo di sensori polimerizzati in maniera più omogenea.

Tra i polimeri più utilizzati per la costruzione di biosensori amperometrici di prima generazione spiccano i derivati delle fenilendiammine (Figura 4). Sono stati estesamente studiati per via delle loro interessanti proprietà di respingere l'acido ascorbico rimanendo quasi del tutto trasparenti nei confronti del  $H_2O_2$ . Nello sforzo di migliorare le proprietà permselective delle polifenilendiammine (PPD) nell'ambito della biosensoristica si è indagato su vari fronti. Sono stati confrontati i polimeri ottenuti dagli isomeri *orto*, *meta* e *para* della fenilendiammina (Killoran e O'Neill, 2008), rispetto a molecole simili per struttura come l'anilina (Craig e O'Neill, 2003<sup>a</sup>) o il fenolo (Craig e O'Neill, 2003<sup>b</sup>), e valutati gli effetti che queste molecole e i diversi sostituenti sull'anello esercitano sulle proprietà permselective del polimero che si genera (Craig e O'Neill, 2003a). Inoltre, sono state esplorate diverse condizioni di elettropolimerizzazione a diversi potenziali applicati (Rothwell *et al.*, 2010) e diverse tecniche di elettropolimerizzazione (Killoran e O'Neill, 2008). Riuscire a realizzare un polimero performante e comprendere i fattori che influenzano le sue proprietà permselective è difficoltoso ma contribuisce ad innovare e migliorare la tecnologia dei biosensori.



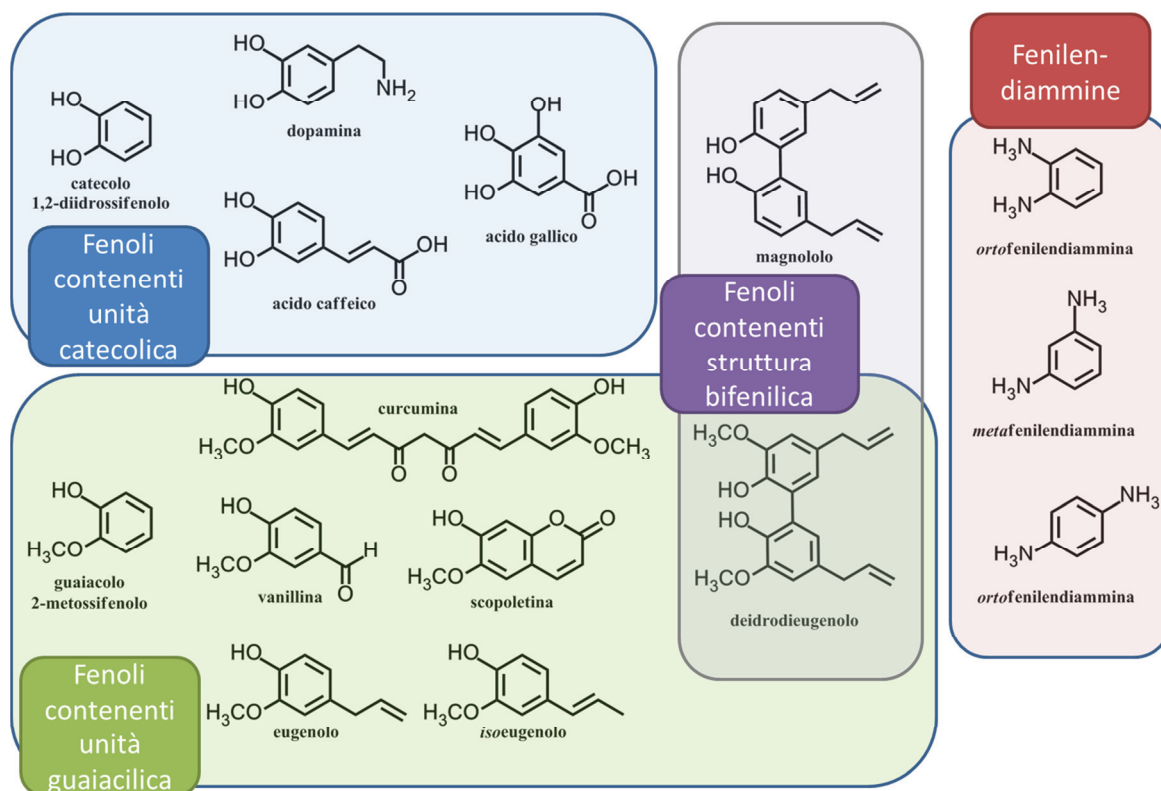


Figura 4 – Formula di struttura di monomeri di partenza per la sintesi di polimeri permselectivi: gli isomeri delle fenilendiammine e molecole alternative di origine naturale.

Lo studio di nuovi film polimerici è costantemente in evoluzione e propone costantemente nuovi film alternativi. Sfortunatamente le fenilendiammine sono tossiche e carcinogeniche e questo porta qualche preoccupazione nel loro utilizzo esteso, fuori dai laboratori o nei settori destinati all'uso umano o nell'alimentazione. Sono stati proposti monomeri alternativi a partire da molecole naturali, ecosostenibili e con modesti profili tossicologici.

La capacità di depositarsi sull'elettrodo formando un film non conduttivo è stata dimostrata per una serie di molecole naturali, le cui strutture sono riportate in Figura 3: scooletina (Gajovic-Eichelmann *et al.*, 2003), acido gallico (Song *et al.*, 2009), acido caffeico (Ren *et al.*, 2006), vanillina (Zheng *et al.*, 2009), curcumina (Devadas *et al.*, 2014).

Fra i monomeri naturali più utilizzati è possibile individuare la dopamina (Sedó *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011) e l'eugenolo. L'eugenolo è una molecola naturale presente nei chiodi di garofano, cannella e basilico; le sue capacità di elettropolimerizzare su platino (Ciszewski e Milczarek, 1999), su pasta di carbonio (Patel *et al.*, 2006) e oro (Ciszewski-

e Milczarek, 2012; Okumura *et al.*, 2008) sono abbastanza note e i film polimerici che ne derivano hanno caratteristiche diverse (Ciszewski e Milczarek, 1998). Il polieugenolo sembra escludere le molecole in base alla loro dimensione: le piccole molecole come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e O<sub>2</sub> attraversano il film, mentre le più grandi come acido ascorbico (Paul *et al.*, 2013) e acido urico non riescono a passare. Ciszewski e Milczarek nel 2001 hanno dimostrato che conducendo l'elettropolimerizzazione a potenziali decisamente ossidanti maggiori di 1.85 V vs Ag/AgCl essa determina la comparsa di proprietà elettrocatalitiche che modificano la permeabilità del film agli anioni come ad esempio la dopamina. Il polieugenolo si è dimostrato un ottimo sostituto del Nafion, un polimero fluorurato selettivo per l'esclusione di molecole anioniche (Ciszewski e Milczarek, 1998). Il polieugenolo è stato usato per la costruzione di un sensore per la determinazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in matrici di origine alimentare come succhi di frutta (Toniolo *et al.*, 2011). Fino ad ora non è stato riportato il suo uso in biosensori e nulla è noto riguardo l'interazione del film con un enzima.

In questa tesi sono state studiate come candidati alternativi all'*ortofenilendiammina*, in aggiunta al conosciuto eugenolo, altre molecole naturali affini quali il guaiacolo, l'*isoeugenolo*, il dimero dell'eugenolo ed il magnololo. L'*isoeugenolo*, nell'unico lavoro in cui è stata riportata la sua elettropolimerizzazione, ha dimostrato una migliore schermatura nei confronti della dopamina (Milczarek e Ciszewski, 2003). Il guaiacolo è stato incluso come struttura base per meglio indagare l'effetto dei sostituenti sull'anello guaiacilico.

Come monomeri alternativi sono stati studiati bifenili idrossilati simmetrici naturali quali il magnololo e il dimero dell'eugenolo (deidrodieugenolo) in virtù della loro maggiore abilità di instaurare interazioni con le proteine rispetto ad altri composti aromatici (Hajduk *et al.*, 2000).

I bifenili idrossilati utilizzati in questa tesi sono costituiti da due unità fenoliche identiche legate insieme da un semplice legame C-C che permette la libera rotazione dei due anelli aromatici e quindi la dimensionalità nello spazio. Questa struttura impartisce alla molecola diverse caratteristiche rispetto al corrispondente fenolo sia dal punto di vista elettronico che biologico. Una di queste riguarda la capacità antiossidante che in genere è superiore a quella del monomero di partenza. L' elettropolimerizzazione del bifenile

idrossilato e il film derivato potrebbero esercitare una maggiore affinità per l'enzima in studio.

Il magnololo è un composto bifenilico idrossilato, presente nella corteccia della magnolia, insieme al suo isomero onokiolo. Esso viene usato comunemente nella medicina orientale per le sue proprietà antifungine, antibatteriche e antiossidanti (Ogata *et al.*, 1997). Dal punto di vista chimico possiede due gruppi idrossilici fenolici elettroattivi facilmente ossidabili. La sua ossidazione elettrochimica è un processo irreversibile che coinvolge il trasferimento di un elettrone e un protone (Zhou *et al.*, 2010). Altre caratteristiche come la capacità di depositarsi sull'elettrodo e la progressiva riduzione dell'ampiezza del picco ossidativo in cicli successivi durante voltammetria ciclica (Yang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008) suggeriscono la possibilità di una sua elettrodeposizione come polimero.

Il secondo bifenile preso in considerazione è il deidrodieugenolo, il dimero a simmetria C<sub>2</sub> dell'eugenolo. Questa molecola naturale contribuisce alle attività antimicrobiche (Ogata *et al.*, 2000) antimutageniche (Miyazawa e Hisama, 2003) e antiinfiammatorie (Murakami *et al.*, 2003) degli olii essenziali in cui viene frequentemente rilevato in bassa quantità insieme all'eugenolo (chiodi di garofano, basilico) ed è stata dimostrata una minore tossicità rispetto al suo monomero (Fujisawa *et al.*, 2002).

### 1.3 - $\beta$ -ciclodestrina

La costruzione di un biosensore enzimatico implica spesso la partecipazione di altre molecole che migliorino e preservino il funzionamento del dispositivo. Un biosensore richiede una stabile e riproducibile immobilizzazione dell'entità biologica sulla superficie del trasduttore, senza alterare l'attività biologica dell'enzima. A tal fine sono disponibili numerose molecole che promuovono la catalisi enzimatica. Un noto stabilizzante enzimatico è la polietilenimina (PEI), usata con l'ascorbato ossidasi (Barberis *et al.*, 2014), l'alcol ossidasi (Rocchitta *et al.*, 2012) e con l'acetilcolinesterasi (Vakurov *et al.*, 2005). La sua presenza previene l'inattivazione enzimatica e l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici della proteina (Qian *et al.*, 2004). Il PEI è un polimero ad alta densità con numerosi residui amminici, ionizzati a pH neutro, che possono reagire con agenti con caratteristiche *cross-linking* come glutaraldeide, permettendo una rapida e sicura

immobilizzazione delle parti del biosensore sul trasduttore (Bolivar *et al.*, 2009). L'apporto di numerose cariche positive dovuta ai gruppi amminici potrebbe causare problemi interagendo con interferenti carichi negativamente come l'acido ascorbico. La PEI ha lo svantaggio di essere una molecola inquinante.

Questo progetto di tesi mira a proporre alternative sostenibili utilizzabili nella biosensoristica, a tale proposito la  $\beta$ -ciclodestrina ( $\beta$ CD), prodotta dalla degradazione dell'amido, è proposta come coadiuvante della funzionalità enzimatica. Tale molecola è stata scelta per via delle sue proprietà di interazione con le varie componenti presenti in un biosensore, come enzima, polimero, analita o interferenti. Inoltre presenta vantaggi di ordine pratico essendo un composto naturale ben tollerato da esseri viventi e ottenibile a basso costo ad alto grado di purezza tramite processi biotecnologici sostenibili su larga scala (van de Mannakker *et al.*, 2009).

### 1.3.1 $\beta$ -Ciclodestrina: generalità

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici naturali, formati da unità di D-(+)-glucopiranosio unite da un legame  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) O-glucosidico. Il risultato di tali legami e delle interazioni molecolari che si instaurano (legami idrogeno) fanno assumere alla molecola una forma a tronco di cono (toroide). La particolare disposizione tridimensionale dei residui risulta nella formazione di una cavità dalle spiccate caratteristiche idrofobiche; al contrario l'esterno del toroide mantiene carattere idrofilo (Szejtli *et al.*, 1998). Il suffisso  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  si riferisce al numero di residui glucopiranosici: 6 residui formano l' $\alpha$ CD, 7 la  $\beta$  e infine 8 la  $\gamma$ . Il numero dei residui influisce su diverse caratteristiche della molecola, quali la grandezza, il numero e l'intensità dei legami intermolecolari e la solubilità in acqua.

Il successo di queste molecole dipende in gran parte dalla capacità del macrociclo di includere molecole idrofobiche di una dimensione appropriata (dette *guest*) al suo interno (Figura 5). Un complesso è favorito dallo stabilirsi di interazioni molecolari di tipo idrofobico e di van der Waals tra la ciclodestrina (*host*) e la molecola includente (*guest*), dal conseguente rilascio delle molecole d'acqua normalmente associate al macrociclo e da una ridotta tensione dell'anello. Il complesso è da intendersi come un fenomeno dinamico

in cui host e guest esistono complessati e non, e la formazione è regolata da una costante di equilibrio (Figura 5).

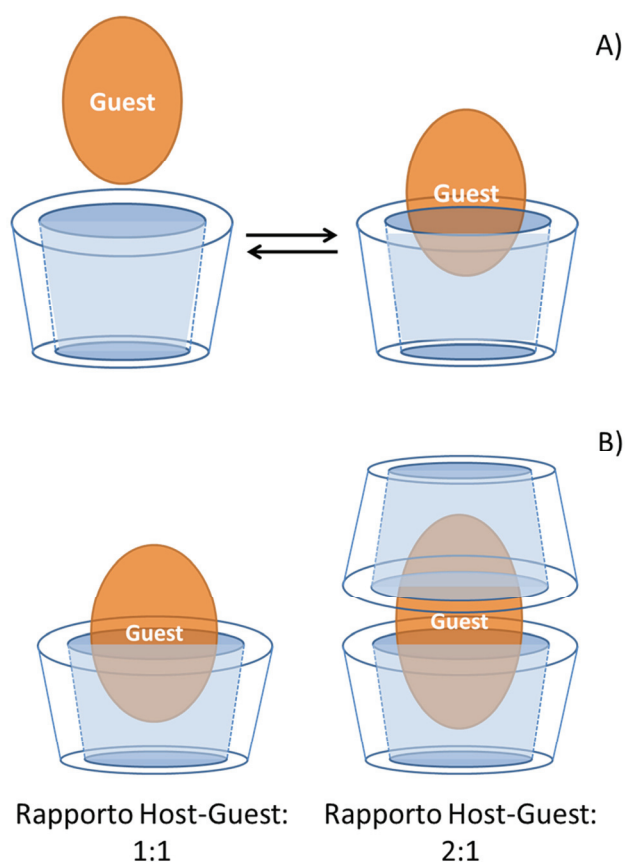


Figura 5 – parte A) un complesso tra la ciclodestrina e il guest è un processo dinamico, in equilibrio tra le due molecole allo stato libero e complessato; parte B) i complessi si possono formare con vari rapporti tra Host e Guest, i più frequenti sono 1:1 e 2:1 benché anche altre combinazioni siano possibili.

L'inclusione può essere sfruttata per permettere la solubilizzazione di molecole idrofobiche in acqua, per aumentare l'assorbimento UV del guest, o per estrarre o separare una molecola da una miscela. Sono numerosissime le applicazioni: veicolante di farmaci (Trotta *et al.*, 2012), agente di modifica di tessuti (Shown e Murthy, 2009; Wang e Cai, 2008), rimozione di inquinanti (Raovv *et al.*, 2014), sintesi regioselettiva, chimica supramolecolare, macchine molecolari (Hashidzume *et al.*, 2014).

Tra le ciclodestrine la  $\beta$ CD rimane la più utilizzata per una serie di motivi: prezzo, disponibilità, dimensioni della cavità e comprovata bassa tossicità orale (Figura 6 parte D) al punto di essere utilizzata nell'industria alimentare. La struttura e alcune delle

caratteristiche di questo particolare macrociclo amiloide a 7 residui sono schematizzate in Figura 6; la  $\beta$ CD possiede ben 21 residui ossidrilici, gli OH primari dei C6 si ritrovano al margine piú stretto del toroide (*primary face*), mentre al margine piú largo (*secondary face*) sono presenti gli idrossili secondari legati al C2 e C3 (Figura 6 parte A).

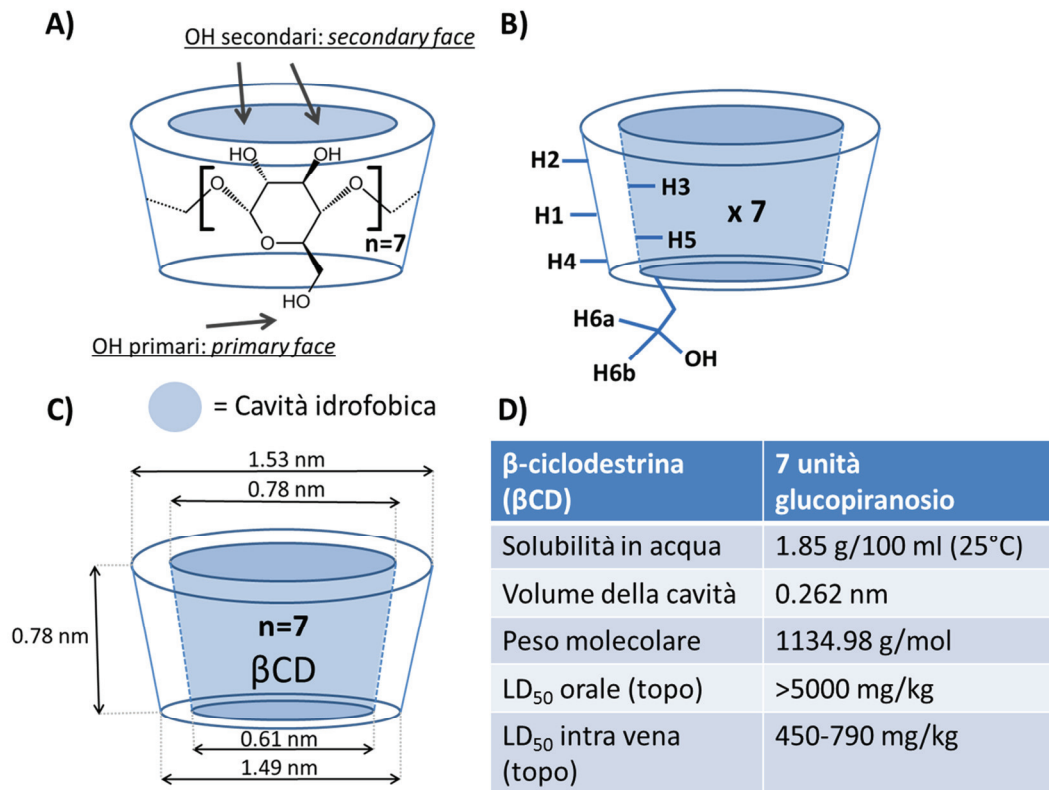


Figura 6 – parte A) schema di una delle sette unità glucopiranosiche che fanno parte del macrociclo della  $\beta$ CD; parte B) sono evidenziate le posizioni dei protoni diagnostici all'esame NMR della  $\beta$ CD, i protoni si riferiscono a una singola unità glucopiranosica; parte C); schema della geometria e delle dimensioni della  $\beta$ CD; parte D) riassunto di alcune caratteristiche chimico-fisiche della  $\beta$ CD.

Gli atomi di ossigeno dei legami glicosidici e gli atomi di idrogeno H3 e H5 legati ai carboni C3 e C5 sono rivolti all'interno della cavità (Figura 6 parte B). Gli H3 e H5 sono di particolare interesse diagnostico per il riconoscimento del complesso di inclusione per via NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) (D'Souza e Lipkowitz, 1988).

Per poter aumentare la sua solubilità in acqua e ampliarne i campi di applicazione la  $\beta$ CD è stata oggetto di numerose modifiche e derivatizzazioni.

I gruppi ossidrilici presenti su ogni residuo glucidico sono caratterizzati da una diversa reattività nell'ordine C6>C2>C3 (Loftsson e Brewster, 1996).



Sfortunatamente, le ciclodestrine, di per sé, non possiedono gruppi chimici adatti per il graffaggio sulla superficie del trasduttore. Alcuni studi riportano l'uso di acidi policarbossilici (PCAs) come crosslinkers di cellulose (Medronho *et al.*, 2013) e cotone (Voncina e Majcen Le Marechal, 2005), le cui condizioni di reazione e funzionalizzazioni sono state analizzate da Martel *et al.*, 2005. È quindi possibile modificare chimicamente la  $\beta$ CD in maniera tale da renderla più idonea all'utilizzo su di un biosensore.

### 1.3.2 $\beta$ -Ciclodestrina: applicazioni in biosensoristica

Le caratteristiche della  $\beta$ CD sono state sfruttate anche nel campo della biosensoristica (Trotta *et al.*, 2012). La capacità di interazione con l'enzima tramite la cavità idrofobica e gli ossidrilici determina un effetto stabilizzante; ad esempio la  $\beta$ CD aiuta la stabilizzazione e la ritenzione della attività catalitica nel tempo. È stato dimostrato un effetto stabilizzante nei confronti di diversi enzimi, quali la lipasi (Boscolo *et al.*, 2010; Ozmen *et al.*, 2009) e la laccasi (Franzoi *et al.*, 2010; Brondani *et al.*, 2009). L'effetto stabilizzante sembra dovuto alla presenza di gruppi ossidrilici come viene osservato per altri derivati glucidici come il saccarosio per l'acetilcolinesterasi (ACE) (Vakurov *et al.*, 2005).

La  $\beta$ CD, inoltre, può aumentare la selettività di un biosensore attraverso altri meccanismi. Una membrana semipermeabile costituita da  $\beta$ CD e poli-vinilalcol è in grado di preconcentrare l'analita (Tingry *et al.*, 2006). La presenza della  $\beta$ CD è inoltre in grado di escludere gli interferenti. È stato dimostrato che la co-elettropolimerizzazione di ortofenilendiammina e  $\beta$ CD dà origine a un film più permselectivo (Kirwan *et al.*, 2007) e si è dimostrata utile nella rilevazione di acido urico in presenza dell'interferente acido ascorbico (Ramírez-Berriozabal *et al.*, 2008).

La  $\beta$ CD è inoltre utilizzata per l'immobilizzazione non covalente degli enzimi tramite la formazione di strutture sopramolecolari. Vista la grande affinità tra  $\beta$ CD e adamantano, l'enzima che funge da elemento biologico viene coniugato con quest'ultima molecola, il ponte formato da  $\beta$ CD-adamantano immobilizza stabilmente ma non covalentemente l'enzima sul trasduttore. Questa strategia è stata sfruttata con la glucosio ossidasi (Díez *et al.*, 2013), perossidasi HRP (Camacho *et al.*, 2009) fenilalanina deidrogenasi (Villalonga *et al.*, 2007).

È possibile estendere l'elettropolimerizzazione di complessi  $\beta$ CD costituiti con i fenoli selezionati in quanto è stato osservato che dal punto di vista elettrochimico avviene un lieve cambiamento delle capacità ossidativa dell'eugenolo incluso nella cavità della  $\beta$ CD (Garg *et al.*, 2010). Anche la formazione di un complesso tra  $\beta$ CD e magnololo è stata osservata (Qi *et al.*, 2003). Il vantaggio di usare i complessi tra  $\beta$ CD e monomero è di poter incorporare la  $\beta$ CD nel film polimerico in un unico passaggio. Inoltre il complesso  $\beta$ CD–eugenolo rende possibile la solubilizzazione di questa molecola idrofobica in acqua, permettendo una elettropolimerizzazione dei fenoli in un solvente perfettamente sostenibile.



## 2. SCOPO DEL PROGETTO

Questa tesi di dottorato è stata dedicata alla messa a punto di biosensori amperometrici applicabili nella determinazione della presenza di contaminanti quali le micotossine e di composti nutraceutici di rilevanza alimentare e alla loro ottimizzazione attraverso la sintesi e la caratterizzazione di nuove sue componenti (Schema 1).

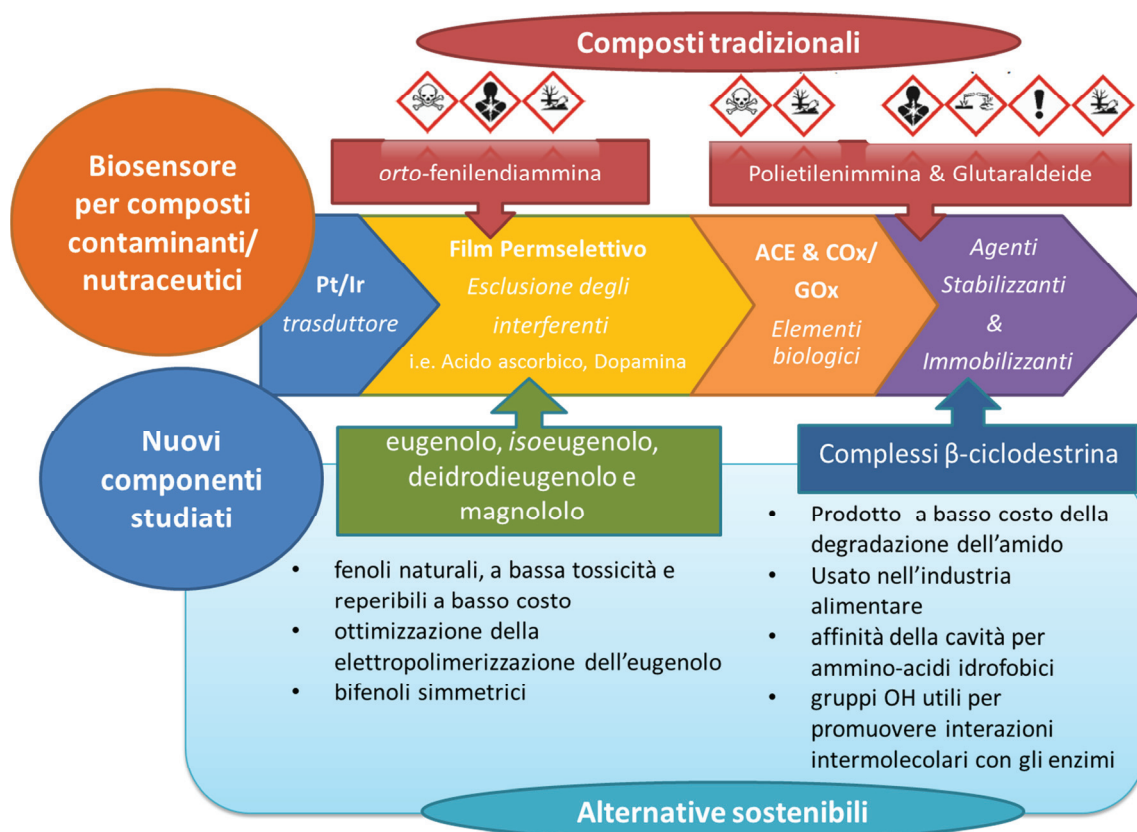
È stato messo a punto un biosensore amperometrico basato su due enzimi: acetilcolina esterasi (ACE) e colina ossidasi (COx). L'interazione alla base del funzionamento è di tipo inibitorio reversibile e viene esercitata da alcuni tipi di tossine nei confronti dell'ACE. La capacità del sistema di determinare la presenza di diversi mix di micotossine quali ocratossina, tricoteceni di tipo B, aflatossina e patulina, è stata saggiata *in vitro* usando un innovativo sistema telemetrico per la raccolta dei dati di analisi.

Per innovare il design del biosensore tenendo conto di una prospettiva sostenibile sono state valutate alternative non tossiche rispetto ai composti tradizionali. Infatti alcune delle molecole usate correntemente nell'ambito biosensoristico sono inquinanti o pericolosi per l'ambiente o le persone. I nuovi componenti studiati sono stati ottenuti a partire da molecole di origine naturale, a bassa tossicità e disponibili a basso costo. Sono state selezionate delle molecole fenoliche di origine naturale quali guaiacolo, eugenolo, *isoeugenolo*, deidrodieugenolo e magnololo come monomeri non tossici alternativi alle carcinogeniche fenilendiammine. I film polimerici permselectivi sono stati ottenuti per deposizione elettrochimica tramite due differenti tecniche: amperometria a potenziale costante (CPA) e voltammetria ciclica (CV). Inoltre un composto fenolico solfonato usato nella concia "green" delle pelli è stato per la prima volta elettropolimerizzato. I diversi comportamenti dell'elettrodo rivestito con il polimero di questa particolare molecola sono stati valutati nei confronti di analiti, interferenti e in differenti condizioni di conservazione.

Ulteriori componenti utili sia per quanto riguarda la stabilizzazione dell'attività enzimatica e della esclusione degli interferenti sono stati ottenuti tramite la modifica di  $\beta$ -ciclodestrina con diverse molecole come acidi policarbossilici e composti polioidrossilati.

Inoltre è stata condotta una procedura di complessazione di alcuni dei monomeri fenolici con la  $\beta$ CD per permettere la sperimentazione di diverse modalità di

elettropolimerizzazione e di inclusione in un singolo passaggio del macrociclo durante la formazione del film permselettivo.



Schema 1 – Schema riassuntivo dello scopo del progetto. Nello sforzo di innovare la costruzione di un biosensore sono stati selezionati, studiati e sintetizzati componenti sostenibili, alternative a composti già in uso in biosensoristica.

### 3. SINTESI DEL LAVORO DI TESI

La capacità di un biosensore di rispondere ad un analita risiede nella natura della componente biologica. A partire dal fatto che l'aflatossina è in grado di inibire l'attività enzimatica dell'acetil colinesterasi (ACE) (Arduini *et al.*, 2007), è stato sviluppato un biosensore amperometrico basato sugli enzimi ACE e colina ossidasi. Il biosensore è stato saggiato con diversi mix di micotossine (aflatossina, patulina, tricoteceni di tipo B e ocratossina) e ha rilevato la presenza di aflatossine e patulina in una matrice biologica (Capitolo 1) mostrando diverse sensibilità nei confronti delle due micotossine.

In parallelo, sono stati sintetizzati e valutati nuovi componenti chimici da fonti sostenibili per poter migliorare le prestazioni del biosensore. Per risolvere il problema dei segnali interferenti presenti nelle matrici, come acido ascorbico (AA) e dopamina (DA), il trasduttore è comunemente ricoperto con film polimerici provenienti dall'*ortofenilendiammina* (PPD) (Killoran e O'Neill, 2008), un monomero tossico e mutageno (Murata *et al.*, 2006). In una prima fase, i monomeri scelti per l'ottenimento di nuovi film permselectivi sono stati rappresentati da fenoli non tossici, naturalmente presenti in natura, quali eugenolo, *isoeugenolo*, magnololo e deidrodieugenolo. Tra di queste si è proceduto alla sintesi chimica del solo deidrodieugenolo a partire dall'eugenolo. Le molecole sono state elettropolimerizzate tramite due tecniche: la voltammetria a potenziale costante e la voltammetria ciclica. I diversi polimeri sono stati caratterizzati attraverso studi di permselectività e microscopia a scansione elettronica (SEM); gli studi sono stati ripetuti nel tempo per valutare la stabilità dei polimeri ottenuti. Sono stati usati potenziali di elettropolimerizzazione alti, in maniera tale da sovraossidare i polimeri e esaltare le caratteristiche di repulsione di carica del polimero. Tramite il calcolo del parametro di permselectività (S%), sono state quantificate le proprietà permselective dei film polimerici. Il polimagnololo si è dimostrato la migliore alternativa all'PPD per cui è stato incluso nella realizzazione di un biosensore basato sull'enzima glucosio ossidasi (Capitolo 2).

Il passo successivo nello studio di polimeri alternativi da monomeri naturali ha previsto l'aggiunta di una ulteriore molecola, il guaiacolo. Essa presenta una struttura più semplice rispetto alle altre molecole studiate, essendo costituita della sola unità guaiacilica.

Tenendo conto delle importanti variazioni alle caratteristiche di permselectività impartite dalle condizioni di polimerizzazione applicate, in questa parte del lavoro i diversi fenoli sono stati polimerizzati tramite l'amperometria a potenziale costante esplorando un discreto *range* di potenziali di elettropolimerizzazione. Ogni fenolo è stato sottoposto a quattro diversi potenziali e le caratteristiche dei film derivanti sono state osservate rispetto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acido ascorbico e dopamina e corredate di immagini ottenute dalla microscopia elettronica a scansione (SEM). Gli esperimenti mostrano che le caratteristiche di permeabilità sono fortemente correlate al potenziale di polimerizzazione applicato; inoltre sono stati migliorati i valori di permselectività ottenuti precedentemente (Capitolo 3).

Sono state selezionate diverse molecole in grado di poter modificare le caratteristiche della  $\beta$ CD per potenziarne e ampliarne l'uso all'interno di un biosensore. L'introduzione di un ponte creato da un legame covalente tra una molecola linker e due  $\beta$ CD può esaltare la capacità inclusiva del macrociclo; inoltre la natura del linker può apportare nuovi gruppi funzionali e/o cariche che aiutano l'interazione con l'enzima. Un buon sito di attacco è rappresentato dall'OH primario presente sul C6 della  $\beta$ CD, dove, sotto determinate condizioni, può avvenire una reazione di esterificazione tra linker e  $\beta$ CD. Come molecole linker sono stati utilizzati degli acidi policarbossilici (PCA), il gliceroldiglicidil etero (GDGE) e il dimetilcarbonato (DMC). I prodotti delle reazioni sono stati esaminati tramite risonanza magnetica nucleare (NMR). Sotto le condizioni sperimentali utilizzate, la reazione tra l'anidride dell'acido 1,2,3,4-butanetetracarbossilico (BTCAa) e la  $\beta$ CD mostra la formazione di una miscela di differenti complessi. Il complesso è stato testato con il carvacolo, una molecola che forma facilmente complessi stabili con la  $\beta$ CD. La forte interazione BTCA- $\beta$ CD ha impedito la formazione del complesso  $\beta$ CD-carvacolo e l'esterificazione tra la BTCAa e la  $\beta$ CD (Capitolo 4).

Per poter includere la  $\beta$ CD in fase di elettropolimerizzazione sono state messe a punto diverse procedure per l'ottenimento di complessi tra la  $\beta$ CD e i fenoli. Il complesso  $\beta$ CD-eugenolo, ottenuto in resa dell'85%, è stato caratterizzato tramite spettroscopia NMR; le analisi in D<sub>2</sub>O mostrano una modificazione del segnale del H5 della  $\beta$ CD e la presenza dei segnali ben risolti dell'eugenolo in soluzione. Anche la formazione del complesso  $\beta$ CD-guaiacolo è stata confermata tramite NMR con una resa del 47%. Analisi NMR ripetute a distanza hanno confermato una stabilità nel tempo per almeno 2 settimane.

Differenti condizioni di complessazione, tutte sostenibili, compresa la tecnologia alle microonde, non hanno avuto successo nell'ottenimento di un complesso d'inclusione  $\beta$ CD- magnololo (Capitolo 4).

Sono state valutate le proprietà di un derivato fenolico contenente zolfo prodotto dalla ditta Chemiplastica Specialties SpA (S-PhOH) e usato nella concia green delle pelli.

È stata studiata tramite spettroscopia NMR la formazione di forti complessi tra S-PhOH e la  $\beta$ CD sotto diverse condizioni sperimentali, quali microonde, coprecipitazione, sonicazione e evaporazione del solvente sotto vuoto (Rotavapor). Questi complessi sono altamente solubili e stabili in acqua. Il prodotto di elettro-ossidazione del S-PhOH è in grado di modificare un elettrodo di platino impartendo interessanti caratteristiche di sensore per l'acido ascorbico (Capitolo 5).

#### 4. ABSTRACT

The ability of a biosensor to respond to an analyte lies in the nature of the biological component. Based on the evidence that aflatoxin is able to inhibit the enzymatic activity of the acetyl cholinesterase enzyme (ACE) (Arduini *et al.*, 2007), an amperometric biosensor based on enzymes ACE and choline oxidase has been developed. The biosensor was tested with different mixtures of mycotoxins (aflatoxin, patulin, type B trichothecene and ochratoxin) and reported the presence of aflatoxins and patulin in a biological matrix (Chapter 1), showing different sensitivity to the two mycotoxins.

In parallel, new chemical components from sustainable sources were synthesized and evaluated in order to improve the performance of the biosensor. To solve the problem of the interfering signals present in the matrix, such as ascorbic acid (AA) and dopamine (DA), the transducer is commonly covered with polymeric films derived from *orthofenilendiammine* (PPD) (Killoran and O'Neill, 2008), a monomer toxic and mutagenic (Murata *et al.*, 2006). In a first step, the monomers chosen as candidates for obtaining new permselective films were represented by non-toxic phenols, naturally occurring in nature, such as eugenol, *isoeugenol*, magnolol and dehydrodieugenol. Among these, for practical reason, dehydrodieugenol was obtained through chemical synthesis starting from eugenol. Molecules were elettropolymerized using two techniques: constant potential amperometry and cyclic voltammetry. The polymers were characterized through permselectivity studies and Scanning Electron Microscopy (SEM); the studies were repeated over time to assess the stability of obtained polymers. High electropolymerization potentials were used, in order to overoxidate polymers and enhance charge repulsion characteristics of the polymer. Through the calculation of the permselectivity parameter (S%), permselective properties of the polymer films were quantified. The poly-magnolol proved the best alternative for PPD and it was included in the construction of a biosensor based on the enzyme glucose oxidase (Chapter 2).

The next step's study of alternative polymers from natural monomers comprised the addition of a further molecule, guaiacol. This compound presents a simpler structure compared to the other molecules studied, being constituted of one guaiacyl unit. Taking into account the significant changes in permselectivity imparted by the polymerization

conditions applied, in this part of the work the different phenols were polymerized by constant potential amperometry exploring a discrete range of electropolymerization potentials. Each phenol was subject to four different potentials and the characteristics of the resulting film were observed compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ascorbic acid and dopamine, and accompanied by images obtained by scanning electron microscopy (SEM). The experiments showed that the permeability characteristics are strongly related to the potential applied during polymerization; also permselectivity values were improved compared to previously reported work (Chapter 3).

Several molecules, that can alter the characteristics of  $\beta$ CD, have been selected in order to strengthen and widen  $\beta$ CD use in biosensors. The introduction of a bridge, created by a covalent bond between a linker molecule and two  $\beta$ CD, can enhance the ability of inclusive power of macrocycle; also the nature of the linker may make new functional groups and / or charges that help the interaction with the enzyme. A good attachment site is represented by the primary OH present on C6 of  $\beta$ CD, where, under certain conditions, can take place an esterification reaction between linker and  $\beta$ CD. As linker molecules have been used the polycarboxylic acid (PCA), the glyceroldiglycidylether (GDGE) and dimethyl carbonate (DMC). The products of the reactions were examined by means of nuclear magnetic resonance (NMR). Under the experimental conditions used, the reaction between the anhydride of 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (BTCAa) and the  $\beta$ CD shows the formation of a mixture of different complexes. The complex was tested with carvacrol, a molecule that easily forms stable complexes with the  $\beta$ CD. The strong interaction BTCA- $\beta$ CD has prevented the formation of the  $\beta$ CD-carvacrol complex and esterification between BTCAa and  $\beta$ CD (Chapter 4).

To include the  $\beta$ CD during electropolymerization various procedures were developed to obtain complexes between  $\beta$ CD and phenols. The  $\beta$ CD-eugenol complex, obtained in 85% of yield, was characterized by NMR spectroscopy; the analysis in D<sub>2</sub>O show a modification of the signal of the H5  $\beta$ CD and the presence of well resolved eugenol signals in solution. Also the formation of  $\beta$ CD-guaiacol complex was confirmed by NMR with a yield of 47%. Repeated NMR analysis have confirmed a long-term stability for at least 2 weeks. Different conditions of complexation, all sustainable, including the technology to microwaves, have not been successful in obtaining a  $\beta$ CD- magnolol inclusion complex (Chapter 4).

The properties of a sulfur-containing phenol (S-PhOH) derivative product from Chemiplastica Specialties SpA were evaluated. The formation of strong complexes between S-PhOH and the  $\beta$ CD was studied by NMR spectroscopy under different experimental conditions, such as microwave, coprecipitation, sonication and solvent evaporation under vacuum (Rotavapor). These complexes are highly soluble and stable in water. The electro-deposition of S-PhOH is able to modify a platinum electrode imparting interesting characteristics towards ascorbic acid presence (Chapter 5).



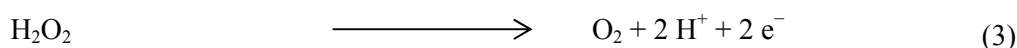
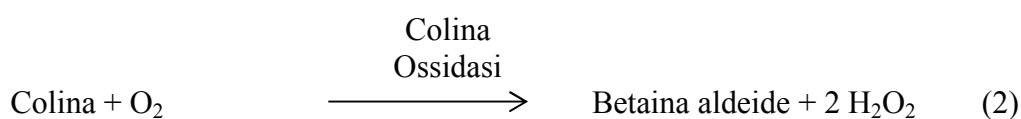
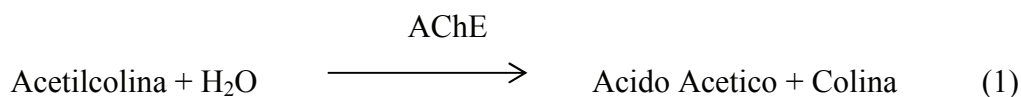
**CAPITOLO  
I**

**Studio di un biosensore basato sull'enzima  
acetilcolinesterasi per la determinazione di  
micotossine tramite un sistema telemetrico**

## SINTESI

Nel campo agroalimentare è largamente incoraggiato lo sviluppo di alternative a metodi convenzionali di analisi. Infatti questi spesso presentano alcuni svantaggi come la preparazione del campione, gli alti costi e lunghi tempi di risposta. Nell'interesse generale di poter disporre di metodi analitici affidabili ma di maggiore praticità d'uso, i biosensori rappresentano un'alternativa sostenibile a metodi analitici tradizionali (Campas *et al.*, 2012).

Per rilevare la presenza dell'aflatossina, una tra le più pericolose micotossine presenti negli alimenti destinati all'uomo e agli animali, sono stati proposti vari prototipi di biosensori enzimatici amperometrici (Arduini *et al.*, 2007). Tutti sono basati sulla inibizione competitiva e reversibile esercitata dall'aflatossina sull'enzima acetilcolinesterasi (AChE). Più l'AChE è inibita, meno  $H_2O_2$  è prodotta come mostrato nelle seguenti reazioni (1 e 2):



Il segnale elettrochimico che risente dell'effetto inibitorio dell'aflatossina sull'AChE viene prodotto sul trasduttore, un elettrodo di platino, dalla ossidazione della  $H_2O_2$  ad un potenziale costante di +700mV (3).

Il biosensore per le micotossine basato sulla AChE è stato costruito in base al design sintetizzato nella dicitura seguente:



Dove un elettrodo cilindrico di platino ( $Pt_c$ ) è stato ricoperto da un film polimerico di poli-fenilendiammina (PPD); l'immobilizzazione degli elementi biologici sulla superficie è avvenuta per evaporazione del solvente dopo immersione degli elettrodi nella miscela

enzimatica contenente AChE e colina ossidasi (ChO) e nella soluzione dello stabilizzatore enzimatico polietilendiammina (PEI), sono state eseguite 5 immersioni; la sieralbumina bovina (BSA) e la glutaraldeide (GA) sono stati utilizzati alla concentrazione indicata in parentesi per costituire il rivestimento esterno del biosensore.

In considerazione del rischio di entrare in contatto con composti tossici, il biosensore è stato utilizzato con un sistema telemetrico a basso costo; questo dispositivo portatile è in grado di rilevare i segnali e mandare i dati ad un personal computer, limitando l'esposizione dell'operatore ai composti e dimostrando la sua praticità in una analisi in continuo.

Oltre che per la aflatossina (B1, B2, G1 e G2), il funzionamento di questo biosensore è stato saggiato con diverse altre micotossine, quali patulina, tricoteceni di tipo B (deossinivalenolo, nivalenolo, 3-acetildeossinivalenolo, 15-acetildeossinivalenolo) e ocratossina A.

Il corretto funzionamento del biosensore AChE/ChO è stato valutato tramite i parametri di cinetica enzimatica  $V_{max}$  e  $K_m$  con calibrazioni con il substrato acetilcolina. L'effetto inibitorio è stato confermato per il farmaco AChE-inibitore neostigmina e per i mix di aflatossina e patulina; al contrario, i tricoteceni e l'ocratossina non hanno dimostrato alcuna attività inibitoria. Inoltre è stata dimostrata la maggior capacità inibitoria dell'aflatoxina rispetto alla patulina.

I biosensori AChE/ChO sono stati in grado di segnalare la presenza di micotossine in una matrice più complessa come il substrato di cultura della specie produttrice di aflatoxine *Aspergillus flavus*.

# **A STUDY OF AN ACETYLCHOLINE ESTERASE BASED BIOSENSOR FOR MYCOTOXINS DETECTION BY MEANS OF A TELEMETRIC SYSTEM**

GIAMMARIO CALIA,<sup>a</sup> STEFANO FIORI,<sup>b</sup> PATRIZIA MONTI,<sup>b,c</sup> SAMIR JAOUA,<sup>d</sup> QUIRICO MIGHELI,<sup>b</sup> GIOVANNA DELOGU,<sup>c</sup> AND PIER A. SERRA,<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> *Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/b, I-07100 Sassari, Italy*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Agraria and Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy*

<sup>c</sup> *Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy*

<sup>d</sup> *Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.*

*\*Corresponding author: E-mail Address: [paserra@uniss.it](mailto:paserra@uniss.it)*

## **ABSTRACT**

**Revealing the presence of toxic contaminant mycotoxins in food and feed is of uttermost importance. Biosensor technology offers an effective alternative to traditional methods. The acetyl choline esterase (AChO) can be used as a sensing element for aflatoxin in the construction of a biosensor. In order to generate the reporting molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, essential for amperometric measurement, also choline oxidase (ChO) has to be integrated in the biosensor. The AChO/ChO biosensor proposed here was connected to a telemetric system. The analyses were performed over different kind of mycotoxin standard mix and a feasible use of AChO/ChO biosensor for aflatoxin and patulin detection was found. A non competitive reversible inhibition was revealed. The aflatoxin detection by AChO/ChO biosensor was also assayed with the cultural broth of the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus* grown in mycotoxin-inducing medium.**

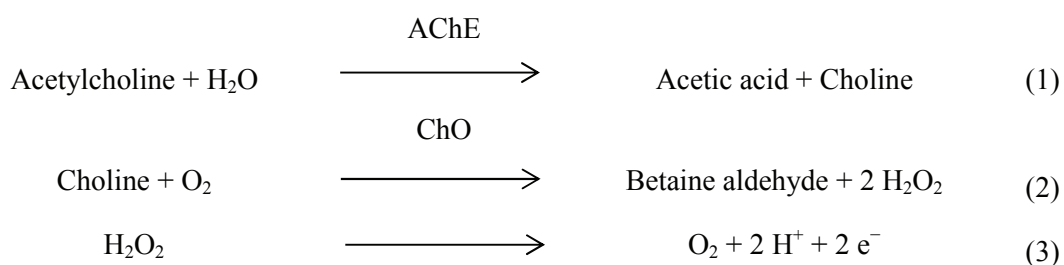
**KEY WORDS:** aflatoxin; patulin; trichothecenes; ochratoxin; non competitive inhibition; biomatrix.

## INTRODUCTION

Since early sixties the matching between a biological sensing element and a transducer has given birth to the first biosensor (Clark and Lyons, 1962). Meanwhile (Sargeant *et al.*, 1961), a large number of animals died for a disease correlated contaminated feed. The toxic compound was characterized as an aflatoxin (Asao *et al.*, 1963) a molecule produced by fungal metabolism under special microclimate conditions. Nowadays biosensor technology provides easy-to-use, effective devices for medical, environmental and agro-food analysis (Turner, 2013), including mycotoxins (Campas *et al.*, 2012).

Although biosensors for mycotoxin analysis are frequently antibody- or aptamer-based also enzymatic biosensor can be found. The design of a biosensor for acetylcholine (ACh) detection (Mitchell, 2004) can be exploited for aflatoxin detection.

ACh biosensor is composed of two enzymes: acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO) immobilized on a platinum transducer. These enzymes catalyze ACh hydrolysis and choline (Ch) oxidation with subsequent production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reactions 1 and 2; Rejeb *et al.*, 2009); the outcoming electric signal is due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electro-oxidation occurring at + 700 mV vs Ag/AgCl reference electrode (RE) over the platinum surface (reaction 3).



The acetylcholine esterase is inhibited by aflatoxin B1 in a reversible and competitive way, this interaction turns the biosensor sensible to aflatoxin (Arduini *et al.*, 2007) (see Figure 1, part A). This mycotoxin binds a site located near the active site of the enzyme, preventing the substrate from entering inside (Hansmann *et al.*, 2009). AChE of *Electrophorus electricus*, electric eel, revealed the highest inhibition rate among commercially available enzymes.

Together with aflatoxins, also ochratoxins, trichothecenes and patulin are of worldwide concern. In this work a biosensor based on AChE/ChO was assessed with a mix of several

mycotoxins. Because of high toxic risk involved in mycotoxin analysis a telemetric system for data recording was used. This low-cost device is a miniaturized potentiostat that can be placed under a fumehood. Data during calibration are sent to a personal computer, so the researcher can attend to the analysis at a safe distance. Telemetric system is as reliable as any other potentiostat, but is a portable device. It was successfully used for *in vivo* measurement (Bazzu *et al.*, 2009; Calia *et al.*, 2009), but also in agro-food field with fresh fruit and juices (Barberis *et al.*, 2012; Barberis *et al.*, 2010). The inhibition by mycotoxin is shown in Figure 1A.

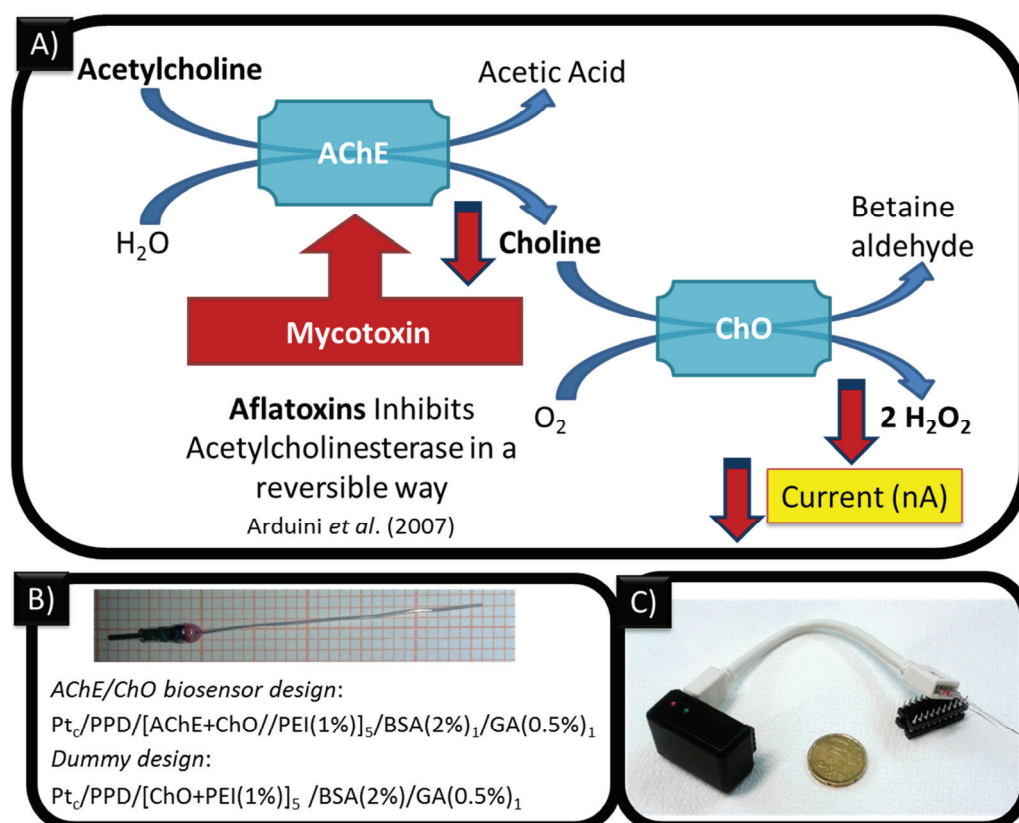


Figure 1 - Part A) the reactions and the inhibition involved in the developing of the biosensor based on acetyl choline esterase (AChE) and choline oxidase (ChO) enzymes, red arrows indicate a decrease of concentration and current intensity. Part B) reports a sensor photo and a scheme of biosensor and dummy used in the work. Part C) show the telemetric system compared with a coin.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

All chemicals were high purity grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Milano, Italy) except for neostigmine methylsulfate (0.5 mg/ml) from Istituto Luso Farmaco D'Italia S.p.A. 1% w/v polyethyleneimine (PEI), 1% w/v glutaraldehyde (GA) and 2 % w/v bovine serum albumin (BSA) were obtained with an appropriate dilution in bidistilled water starting from a 50% w/v stock solution. Phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4) was prepared by dissolving NaCl (8.9 g), NaOH (1.76 g), and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6.89 g) in 1 L of bidistilled water. An *ortho*-phenylenediamine monomer solution (*o*PD, 300 mM) was prepared in deoxygenated PBS (as Killoran and O'Neill, 2008). Acetylcholinesterase (AChE) type VI-S from *Electrophorus electricus*, Electric eel, and choline oxidase (ChO) from *Alcaligenes species* were diluted in PBS until 10 U/ml and 1 U/ml, respectively, and stored at -20°C when not in use.

Patulin (100 µg/ml), aflatoxin mix (2 µg/ml B1-G1; 0.5 µg/ml B2-G2), trichothecene type B mix (100 µg/ml: deoxynivalenol, DON; nivalenol, NIV; 3- and 15-acetyldeoxynivalenol, 3-Ac and 15-Ac DON) and ochratoxin A (10 µg/mL) were of analytical standard grade. Mycotoxin standards were sold in acetonitrile, an organic solvent that can interfere with AChE activity (Somerset *et al.*, 2010). In order to prevent false inhibition, acetonitrile has been removed by evaporation under vacuum. Mycotoxins were redissolved in bidistilled water.

Teflon-coated platinum wire, (Pt 90% - Ir 10%) purchased from Advent Research Materials, Suffolk, UK was used for biosensor construction.

### Biosensor construction

Biosensors were constructed starting from a 30 mm length and 125 µm diameter of Pt wire. The insulating Teflon has been hand-removed from both endings with a scalpel. One of these was fixed to a metal pin and the other one was cutted at 1 mm under a stereoscopy in order to obtain the transducer surface of sensors. In Figure 1 part B both a sensor and biosensor design are shown.

In order to exclude interferents, a polyphenylenediamine (PPD) permselective film was electrodeposited on electrodes. Electrosynthesis occurred by placing electrodes into 20

mL of oPD and applying a +700 mV potential vs Ag/AgCl reference electrode (RE) for 15 minutes using the four-channel equipment (eDAQ *QuadStat*, e-Corder 410, eDAQ, Australia). Then enzymes were deposited by adsorption, dipping electrodes into a mix of 10  $\mu$ l of ChO and 10  $\mu$ l of AChE solutions. Soon after electrodes were quick dipped into the enzyme stabilizer PEI solution and air-dried for 5 minutes. Enzymes and PEI dips were repeated 5 times. Biosensors were placed at 37°C for 15 minutes after a dip in BSA and a quick dip in GA in order to promote GA evaporation and crosslinking.

Biosensors were stored in PBS at +4°C when not in use.

Meanwhile, also a sentinel biosensor, called *dummy*, was realized in the same way as aforementioned biosensor except it was dipped into a solution containing ChO alone. Dummy sensor lacks AChE enzyme so it is insensible to mycotoxin inhibition and the signal can be used to subtract current due to background interference.

### ***Aspergillus flavus* culture**

*Aspergillus flavus* B1 and B2 mycotoxins production was induced by cultivating a fungal strain in yeast-extract-sucrose medium (YES) for 15 days. As a control, *A. flavus* was grown on the non-inducive medium yeast-extract-peptone (YEP) for 15 days. The cultural broth were collected at days 3°, 6°, 9°, 12° and 15° post inoculation and used for biosensor evaluation.

### **Calibration**

The *in vitro* response of biosensor was studied into a electrochemical cell consisting of ACh/ChO biosensors as working electrodes (WE), ChO biosensor (as dummy), an Ag/AgCl (NaCl, 3 M) electrode as reference electrode (RE), and a Pt wire as auxiliary electrode (AE). Calibrations were performed in PBS by applying a constant potential of +0.7 V versus Ag/AgCl (Serra *et al.*, 2007), using eDAQ *QuadStat* and the telemetric system 24 hours after biosensor construction.

The actual operation of ACh/ChO biosensors was assessed by means of a full calibration in 10 ml di PBS with acetylcholine (0–5000  $\mu$ M) until saturation.

Neostigmine and mycotoxin calibration were performed in 1 ml of PBS under a fume hood and the telemetric system. The device used in this study (Figure 1C) was based on previous design (Barberis *et al.*, 2010; Calia *et al.*, 2009; Bazzu *et al.*, 2009) and allowed



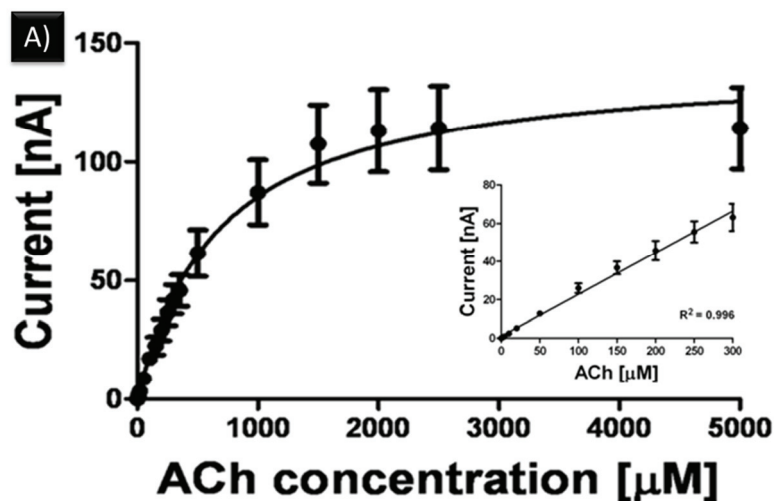
a second-by-second data acquisition by a home-made software. The transmission *via* Bluetooth of data to a personal computer limited personal exposure to dangerous mycotoxins. Inhibition behavior of neostigmine and mycotoxin injection was observed in a 1 ml of PBS containing 50  $\mu$ M ACh.

ACh and neostigmine concentration are expressed in  $\mu$ M, while mycotoxin concentration is expressed in ng/ml. Electrochemical signals are measured in nA and utilized after baseline subtraction. The current inhibition was expressed as a percent of the total current generated by 50  $\mu$ M injection of ACh, before injection of inhibitor (neostigmine or mycotoxin).

Linear and nonlinear regression analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.02, San Diego, CA, USA). The enzymatic parameters were obtained from Michaelis-Menten kinetic and Lineweaver-Burk model.

## RESULTS AND DISCUSSION

The parameters derived from a full calibration with ACh of AChE/ChO biosensor are shown in Figure 2. In enzymatic kinetics  $V_{\max}$  and  $K_m$  describe enzymatic activity;  $V_{\max}$  represent the maximum rate at which substrate is converted into the product, it is reached when all active sites are occupied by substrate.  $K_m$  is an affinity index between the enzyme and its substrate, the lower  $K_m$  is the more substrate can easily bind catalytic site. The AChE/ChO biosensor  $V_{\max}$  and  $K_m$  are satisfactory for subsequent analysis. Moreover the low data dispersion expressed by a  $R^2$  value very close to 1 suggest an homogeneous biosensor set.



B) <i>In vitro</i> electrochemical characterization at day 1, n=9		
Michaelis-Menten kinetics:	$V_{max}$ : 145.9 ± 9.2 nA	$K_m$ : 669.8 ± 120 μM
Linear regression: $R^2$ : 0.996	Linear range: 0-300 μM	Slope: 0.143 ± 0.003 nA*μM <sup>-1</sup>

Figure 2 - Part A) calibration curve of AChE / ChO biosensors towards acetylcholine (ACh). Part B) statistical analysis of data obtained from 9 independent biosensors (n=9).

The biosensor inhibition was assessed with the parasympathomimetic compound neostigmine, a well known reversible acetylcholinesterase inhibitor. The AChE/ChO biosensor can generate a 10 nA current after an ACh 50 μM injection; 1.12 μg/mL of neostigmine can reduce current to 7.5 nA resulting in a biosensor's inhibition of 25% (Figure 3).

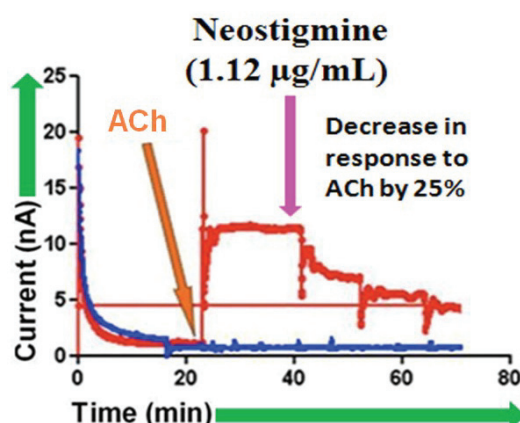


Figure 3 – Time line inhibition of AChE/ChO biosensor induced by neostigmine injection. The red line is the biosensor signal, the blue line is the dummy sensor signal, as internal negative control.

Among tested mycotoxins, trichothecenes and ochratoxin A were not detected by the biosensor: probably due to their bigger dimension they cannot interact with the active site of AChE.

On the contrary, both aflatoxin mix and patulin showed an inhibitory effect, aflatoxins having a greater inhibitory effect than patulin (Figure 4).

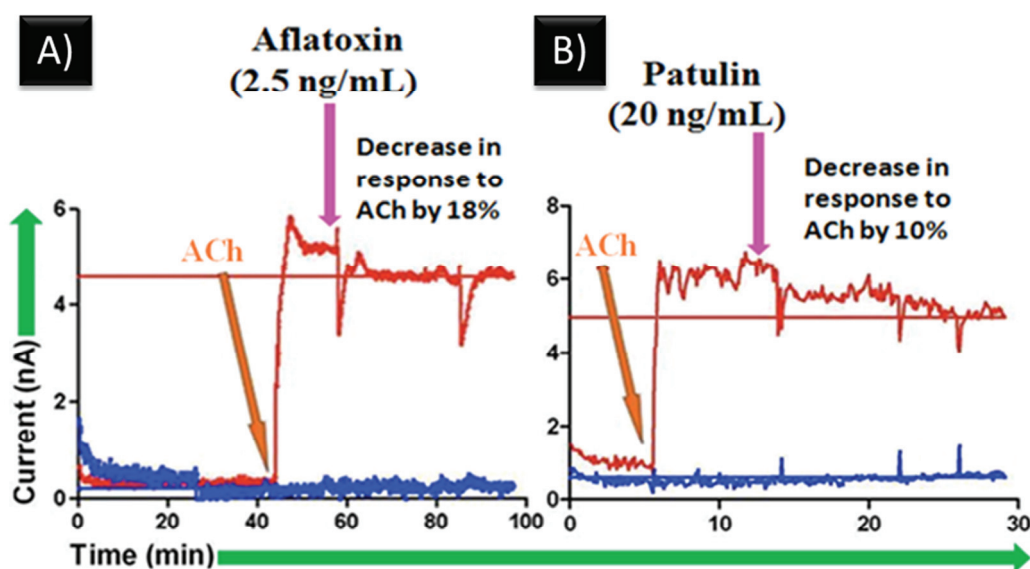


Figure 4 – Time line inhibition of AChE/ChO biosensor induced by aflatoxin mix (part A) and patulin (part B). The red line is the biosensor signal, the blue line is the dummy sensor signal, as internal negative control.

A further investigation elucidated the type of inhibition. Biosensors were exposed to aflatoxin (10 ng/mL) and patulin (100 ng/mL) mix in separate experiments and then calibrated with ACh. The comparison of Michaelis-Menten kinetics with or without these two mycotoxins did not show any change of  $K_m$ . At the same time  $V_{max}$  decreased, highlighting in both cases a reversible and non competitive inhibition (Figure 5).

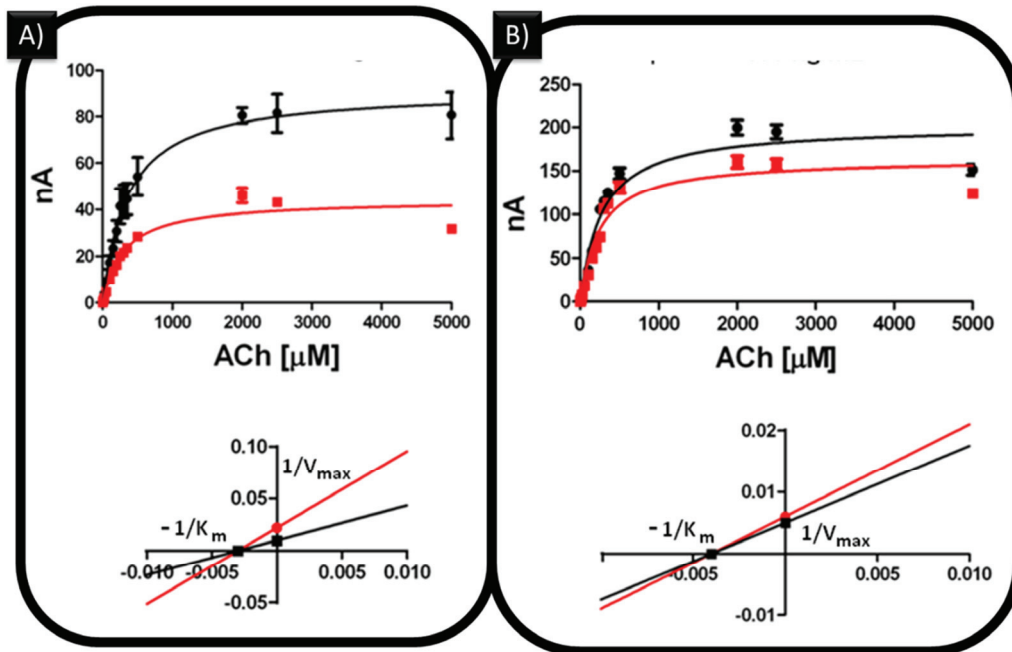


Figure 5 - Calibration curve for ACh (0-5000  $\mu\text{M}$ ) and Lineweaver-Burk linearization for AChE/ChO biosensors in presence (red line) or not (black line) of aflatoxin mix (part A) and patulin (part B).

Considering the higher inhibition of aflatoxin, biosensors were challenged with a more complex biological matrix. *A. flavus* can produce aflatoxins, preferably B1 and B2 (Schroeder and Boller, 1973), when cultured under appropriate conditions. As previously mentioned, *A. flavus* was cultured on mycotoxin-inducing medium YES and medium samples were collected at 3-15 days post-inoculation. Sequence injection of 10  $\mu\text{L}$  of the fungal culture filtrate into the electrochemical cell resulted in a current fall of 15% (Figure 6), hence mycotoxins produced by *A. flavus* can be detected by our prototype device. Neither injection of YES or YEP medium, with or without fungi, altered ACh oxidation current, therefore excluding any interference due to medium components (data not shown).

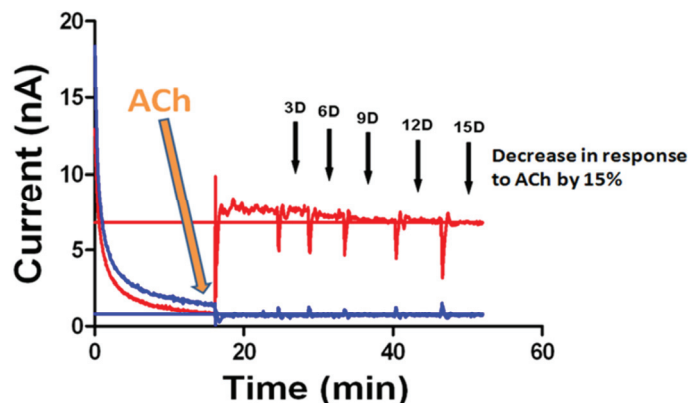


Figure 6 – Time line inhibition of AChE/ChO biosensor induced by YES medium injection at different growth days. The red line is the biosensor signal, the blue line is the dummy sensor signal, as internal negative control.

## CONCLUSION

The amperometric biosensor activity based on AChE and ChO enzymes is inhibited by neostigmine, aflatoxins and patulin with different sensitivities. For the latter two mycotoxins, a non competitive, reversible inhibition was found. To the best of our knowledge this is the first time that an interaction between patulin and AChE has been observed. AChE/ChO biosensors revealed a specific inhibition by aflatoxin also in a model biological matrix. The telemetric system confirmed its reliability and convenience during analysis.

## REFERENCES:

Arduini, F., Errico, I., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G. and Moscone, D. (2007) Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition. *Anal Chem* 79, 3409-3415.

Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. and Wogan, G.N. (1963) Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* 85, 1706–1707.

Barberis, A., Bazzu, G., Calia, G., Puggioni, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Schirra, M., Desole, M.S., Serra, P.A. (2010) New ultralow-cost telemetric system for a rapid electrochemical detection of vitamin C in fresh orange juice. *Anal Chem* 82, 5134–5140.

Barberis, A., Fadda, A., Schirra, M., Bazzu, G. and Serra, P.A. (2012) Detection of postharvest changes of ascorbic acid in fresh-cut melon, kiwi, and pineapple, by using a low cost telemetric system. *Food Chem* 135, 1555–1562.

Bazzu, G., Puggioni, G., Dedola, S., Calia, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Desole, M.S., Lowry, J.P., O'Neill, R.D. and Serra, P.A. (2009) Real-time monitoring of brain tissue oxygen using a miniaturized biotelemetric device implanted in freely moving rats. *Anal Chem* 81, 3911–3918.

Calia, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Puggioni, G., Spissu, Y., Bazzu, G., Mazzarello, V., Lowry, J.P., O'Neill, R.D., Desole, M.S. and Serra, P.A. (2009) Biotelemetric Monitoring of Brain Neurochemistry in Conscious Rats Using Microsensors and Biosensors. *Sensors* 9, 2511–2523.

Campas, M., Garibo, D. and Prieto-Sim, B. (2012) Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. *Analyst* 137, 1055–1067.

Clark, L.C. and Lyons, C. Jr. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 102, 29-45.

Hansmann, T., Sanson, B., Jure, S., Weik, M., Marty, J.L. and Fournier, D. (2009) Kinetic insight into the mechanism of cholinesterase inhibition by aflatoxin B1 to develop biosensors. *Biosens Bioelectron* 24, 2119–2124.

Killoran, S.J. and O'Neill, R.D. (2008) Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochim Acta*, 53, 77303-7312.

Mitchell, K.M. (2004) Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensors characterized in vitro and in vivo. *Anal Chem* 76, 1098-1106.

Rejeb, I.B., Arduini, F., Arvinte, A., Amine, A., Gargouri, M., Micheli, L., Bala, C., Moscone, D. and Palleschi, G. (2009) Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil. *Biosens Bioelectron* 24, 1962–1968.

Sargeant, K., Sheridan, A., Kelly, J.O. and Carnaghan, R.B.A. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192, 1096-1097.

Schroeder, H.W. and Boller, R.A. (1973) Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Appl Microbiol* 25, 885-889.

Serra, P.A., Rocchitta, G., Bazzu, G., Manca, A., Puggioni, G.M., Lowry, J.P. and O'Neill, R.D. (2007) Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications. *Sens Actuat B* 122, 118-126.

Somerset, V., Baker, P. and Iwouha, E. (2010) Mercaptobenzothiazole-on-gold organic phase biosensor systems: 3. Thick-film biosensors for organophosphate and carbamate pesticide determination. *Intelligent and Biosensors*, Book edited by: Vernon S. Somerset, 3.5, 197-198.

Turner, A.P.F. (2013) Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev* 42, 3175–3648.

**CAPITOLO II** **Derivati fenolici elettropolimerizzati come polimeri permselectivi per applicazioni nei biosensori**



## SINTESI

Come ogni altro metodo analitico i biosensori risentono della presenza di interferenti. Nel caso di un biosensore amperometrico di prima generazione gli interferenti sono rappresentati da molecole con un potenziale di ossidazione inferiore o uguale a quello della ossidazione della molecola reporter. Per evitare interferenze viene comunemente depositato un film polimerico sull'elettrodo. Le diverse permeabilità nei confronti di  $H_2O_2$  e degli interferenti archetipo come acido ascorbico (AA) e dopamina (DA) vengono correntemente studiate tramite calibrazioni *in vitro*. Le ottime qualità di permselectività della poli-*ortofenilendiammina* (PPD) sono state descritte da Killoran e O'Neill (2008). Nonostante la PPD dimostri una ridotta tossicità, il monomero di partenza, *o*PD, è considerato mutageno e cancerogeno. L'uso dell'*o*PD su di un biosensore dedicato all'analisi degli alimenti può porre alcuni limiti sui rischi legati alla salute, perciò in questo lavoro è stata valutata la capacità di formare film permselectivi stabili di una serie di monomeri alternativi non tossici. I composti selezionati sono composti fenolici naturali appartenenti alla classe dei fenilpropanoidi. Essi sono: eugenolo, *isoeugenolo*, magnololo e deidrodieugenolo (Figura 8).

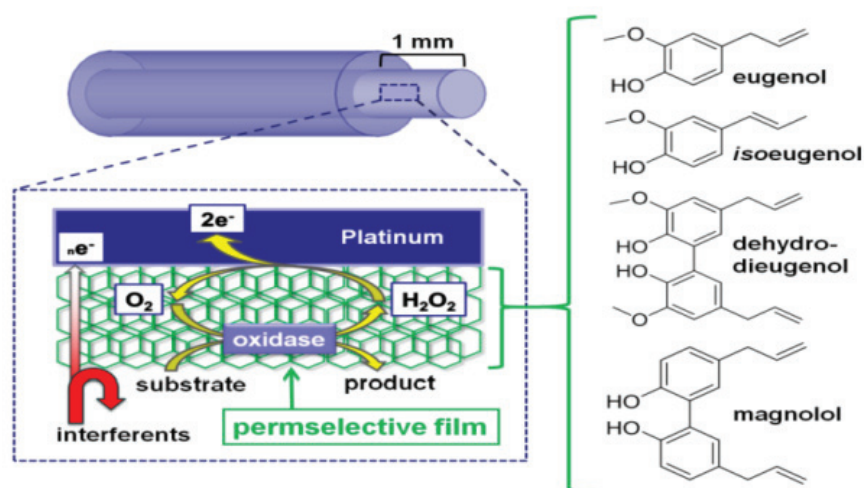


Figura 7 – In figura sono riportati i fenoli naturali utilizzati come monomeri per l'ottenimento di un film permselectivo utilizzabile su di un biosensore enzimatico amperometrico

L'elettropolimerizzazione dei fenoli è avvenuta su elettrodi Pt/Ir riprendendo il lavoro di Milczarek e Ciszewski, 2003. Il lavoro è stato qui ampliato estendendo il numero di

molecole con fenoli e bifenoli naturali e aggiungendo alla già studiata polimerizzazione in voltammetria ciclica (CV) quella in amperometria a potenziale costante (CPA). Inoltre i diversi film polimerici sono stati paragonati direttamente con la PPD, ad oggi uno dei polimeri permselectivi più conosciuti (Killoran e O'Neill, 2008). La caratterizzazione è stata condotta tramite calibrazioni *in vitro* ai giorni 1 e 14 dopo la polimerizzazione e attraverso la microscopia a scansione elettronica (SEM). I dati ottenuti dalle calibrazioni hanno permesso il calcolo di un importante parametro di permselectività, S%, descritto in Rothwell e O'Neill nel 2011.

### **Studi di permselectività**

I primi picchi di ossidazione, qui determinati attraverso esperimenti di CV, concordano con la letteratura (Milczarek e Ciszewski, 2003) e riflettono l'ordine di ossidazione (partendo dal più ossidabile): *isoeugenolo* < *deidrodieugenolo* < *magnololo* < *eugenolo*. Inoltre, per tutti i fenoli selezionati, questi picchi collasano tra il primo e secondo ciclo, indicando la formazione di un film non-conduttivo elettrodepositato sulla superficie del platino. Dal decadimento di tipo esponenziale durante la polimerizzazione tramite CPA si può dedurre un isolamento dell'elettrodo dovuto alla formazione del polimero.

Le permselectività hanno mostrato una chiara differenza tra le due tecniche: tutti i valori per film derivanti da CV sono risultati migliori ( $p < 0.05$ ) rispetto a quelli polimerizzati in CPA. Probabilmente le condizioni fortemente ossidative applicate durante i 15 minuti della polimerizzazione avvenuta in CPA possono aver sovraossidato i polimeri. In CV il potenziale è variabile per definizione e l'esposizione degli elettrodi a potenziali sovraossidanti rimane limitata per un tempo molto minore rispetto alla CPA. Il CV-poli-magnololo mostra valori migliori sia per AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% che per DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%, ma il CPA-PPD con valori di AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% di  $0.16 \pm 0.02$  e DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% di  $9.78 \pm 1.01$  rimane ancora il migliore tra i film studiati.

Anche la stabilità nel tempo è stata studiata ripetendo le calibrazioni al giorno quattordici dopo la polimerizzazione. Tutti i polimeri peggiorano moderatamente, aumentando la S%. L'unica eccezione è stato il poli-eugenolo che ha migliorato la sua permselectività col tempo in CV e in CPA.

## **Analisi al SEM**

La deposizione di film polimerici è stata osservata in microscopia a scansione elettronica ai giorni uno e quattordici dalla polimerizzazione. La superficie dei sensori appare diversa rispetto alla superficie del platino nudo e tali modifiche rimangono inalterate nel tempo. Una superficie liscia e compatta può essere osservata per il poli-eugenolo e il poli-*isoeugenolo*. Invece le maggiori dimensioni del magnololo e deidrodieugenolo possono ostacolare l'orientamento delle molecole sul trasduttore, dando luogo apparentemente a un film meno compatto rispetto ai più piccoli eugenolo and isoeugenolo.

## **Conclusioni e prospettive**

Tutti i fenoli naturali studiati sono stati elettrosintetizzati con successo su elettrodi di Pt-Ir. Attraverso i vari protocolli applicati è stata investigata l'influenza delle diverse tecniche di elettropolimerizzazione impiegate (CV e CPA) sulle proprietà permselective dei diversi film. Gli elettrodi rivestiti dai polimeri sono stabili e responsivi per almeno due settimane. Tra questi il poli-magnololo risulta il candidato migliore quale alternativa all'*ortofenilendiammina*. Il poli-magnololo derivato dalla CV ha mantenuto le sue caratteristiche di permselectività quando utilizzato come film permselectivo per la costruzione di un biosensore basato sulla glucosio ossidasi. I risultati ottenuti suggeriscono di poter migliorare le caratteristiche dei film esplorando potenziali di polimerizzazione più bassi (Capitolo 3).



Cite this: *Analyst*, 2015, **140**, 3607

## Electropolymerized phenol derivatives as permselective polymers for biosensor applications†

Giammario Calia,<sup>a,b</sup> Patrizia Monti,<sup>c</sup> Salvatore Marceddu,<sup>d</sup> Maria A. Dettori,<sup>c</sup> Davide Fabbri,<sup>c</sup> Samir Jaoua,<sup>e</sup> Robert D. O'Neill,<sup>f</sup> Pier A. Serra,<sup>\*b</sup> Giovanna Delogu<sup>c</sup> and Quirico Migheli<sup>a</sup>

Amperometric biosensors are often coated with a polymeric permselective film to avoid electroactive interference by reducing agents present in the target medium. Phenylenediamine and phenol monomers are commonly used to form these permselective films in the design of microsensors and biosensors. This paper aims to evaluate the permselectivity, stability and lifetime of polymers electrosynthesized using either constant potential amperometry (CPA) or cyclic voltammetry (CV) from naturally occurring phenylpropanoids in monomeric and dimeric forms (eugenol, isoeugenol, dehydrodieugenol and magnolol). Sensors were characterized by scanning electron microscopy and permselectivity analysis. Magnolol formed an electro-deposited polymer with a more defined three-dimensional texture in comparison with the other films. The phenol-derived films showed different permselectivity towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over ascorbic acid and dopamine, likely to be related to the thickness and compactness of the polymer. The CV-derived films had a better permselectivity compared to the CPA-corresponding polymers. Based on these results, the permselectivity, stability and lifetime of a biosensor for glucose were studied when a magnolol coating was electro-deposited. The structural principles governing the permselectivity of the magnolol-derived film are suggested to be mainly related to the conformational flexibility of this monomer. Newly designed biosensors, coated with electropolymerized natural phenol derivatives, may represent promising analytical devices for different application fields.

Received 24th February 2015,

Accepted 31st March 2015

DOI: 10.1039/c5an00363f

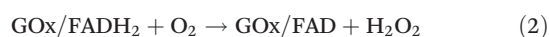
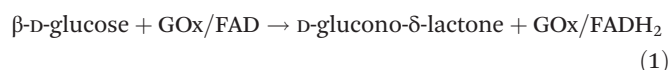
www.rsc.org/analyst

## Introduction

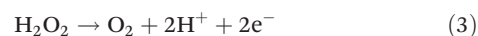
Over the last 20 years, efforts have been made to improve biosensor selectivity and specificity by reducing the signals derived from interfering molecules.<sup>1</sup> The global interest in biosensors is increasing significantly in many diverse areas (e.g. health care, industrial process control, military applications,

and environmental monitoring) with a concomitant need for molecular detection at ever lower concentration limits.<sup>2</sup>

Most first-generation enzyme biosensors are based on an oxygen-related electrochemical signal transduction pathway, involving a covalently bonded FAD oxidase (Ox) as the sensitive biological element. One example is the following multi-step oxidation (reactions (1) and (2)) catalyzed by glucose oxidase (GOx):



The enzyme is usually immobilized onto the surface of a signal transducer (often platinum for electrochemical biosensors), and produces hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is commonly oxidized directly (reaction (3)) on the transducer (electrode) surface:



In amperometric mode, these biosensors are often characterized by a simple design and fast kinetics (response times of

<sup>a</sup>Dipartimento di Agraria and Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy

<sup>b</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/b, I-07100 Sassari, Italy. E-mail: paserra@uniss.it

<sup>c</sup>Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100 Sassari, Italy

<sup>d</sup>Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100 Sassari, Italy

<sup>e</sup>Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box 2713, Doha, Qatar

<sup>f</sup>UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5an00363f

~1 s are not uncommon<sup>3</sup>) when nanometer thin permselective layers are used, because of the short electron-transfer chain. Unfortunately, the relatively high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation potential necessitates biosensor applied potentials of >0.4 V vs. the Ag/AgCl reference electrode,<sup>4</sup> making these devices very sensitive to electrochemical interferent species present in the analytical matrix that could compromise their specificity for the substrate. In order to minimize electrochemical interference in complex matrices such as brain extracellular fluid (where ascorbic acid, uric acid, and dopamine and its acid metabolites are among the main interferent neurochemicals), permselective polymers may be directly electrosynthesized on the transducer surface.<sup>5–7</sup> Furthermore, for *in vitro* applications, this approach helps to simplify or eliminate the sample preparation procedure<sup>8,9</sup> and allows the direct exposure of the biosensor to the unprocessed matrix material. An alternative approach of electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide using, *e.g.*, Prussian Blue shows promise in the design of biosensors, but can suffer from long-term stability issues, especially in neutral media containing sodium ions,<sup>10</sup> although these problems can be mitigated by the incorporation of certain surfactants or an electrochemical post-treatment procedure.<sup>11,12</sup>

Polyphenylenediamines (PPDs) are commonly used as electro-deposited thin films in the design of microsensors and, as an enzyme-entrapping membrane, in the preparation of biosensors.<sup>5,8,13</sup> These polymers form a good permselective barrier on the transducer surface able to ameliorate significantly electroactive interference by reducing agents present in the target medium.<sup>14</sup> The search for new materials is in progress<sup>2,7,15,16</sup> with a focus on improving the permselectivity, the lifetime of the electrodeposited thin-film and adhesion to the metal surface. The grafting quality of the electrodeposited thin film on the metal surface is a critical feature since only small quantities of enzyme are needed to fabricate a biosensor that can be used repeatedly for measurements. In fact, entrapment of enzymes and proteins on different transducer surfaces is paramount for the stability, reproducibility and sensitivity of the biosensor.<sup>17</sup>

Alternative polymerized natural compounds would be highly desirable in the packaging of a biosensor where miniaturization, running costs, permselectivity and mass production could be achieved. In addition, for preventing fouling, eliminating interference, and controlling the operating regime of the biosensor, the coating materials should be biocompatible since the sample host system must not be contaminated by the biosensor itself. Moreover, the use of biosensors in large areas of health care and food has generated global interest in the development of safer alternatives to conventional permselective polymers.<sup>18</sup>

Besides aromatic diamines, it is acknowledged that thin films formed by hydroxylated aromatic polymers are highly specific in the detection of small analytes such as hydrogen peroxide, while access to larger molecules is suppressed.<sup>19</sup>

2-Methoxyphenols are naturally occurring compounds that are widely used in the cosmetic and food industries. These

compounds and their corresponding dimers are noteworthy for their anti-inflammatory and chemopreventive properties, resulting from antioxidant activity.<sup>20</sup> For example, eugenol, a well-known antioxidant and a common food spice, has been electropolymerized on different transducers, and its permselective properties toward small solutes of analytical interest (*e.g.* dopamine, DA) have been studied.<sup>21–25</sup>

Often, symmetric dimerization of 2-methoxyphenols, generating hydroxylated biphenyls, enhances their antioxidant activity. Moreover, the higher ability of hydroxylated biphenyls to bind a wide range of proteins compared to other aromatic structures has been demonstrated.<sup>26</sup> Several hydroxylated biphenyls such as magnolol and honokiol, the main constituents of *Magnolia officinalis*, are promising pharmacological leads. Magnolol and honokiol have been electropolymerized on different transducers with the aim to detect both natural biphenyls with high precision and accuracy.<sup>27–31</sup> Recently, interactions of magnolol with DNA have been studied by electrochemical and spectral methods.<sup>32</sup> Considering the wide interest in naturally occurring compounds as starting monomers to prepare new thin films with improved biosensor properties and acceptable metabolic profiles, we selected some phenols belonging to natural 2-methoxyphenols and hydroxylated biphenyls for further study. In this work the permselectivity and stability of eugenol, isoeugenol, dehydrodieugenol (a natural C<sub>2</sub>-symmetric dimer of eugenol) and magnolol in the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were evaluated upon electropolymerization by cyclic voltammetry (CV) and constant potential amperometry (CPA) on a Pt/Ir electrode. After electro-deposition, polymeric films were also characterized by scanning electron microscopy (SEM).

In addition, permselectivity towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, stability and lifetime of a glucose-based biosensor were studied when magnolol–Pt/Ir coating was used as the transducer.

## Experimental

### Chemicals and solutions

All chemicals were of analytical reagent grade or higher purity and dissolved in bidistilled deionized water (MilliQ®). Ascorbic acid (AA), dopamine (DA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), D-(+)-glucose, glucose oxidase (GOx) from *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4), bovine serum albumin (BSA), *o*-phenylenediamine (*o*PD), glutaraldehyde (GA), dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, eugenol (>98%), ethanol (EtOH, >99.5%), ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH), sodium hydroxide (NaOH), potassium hexacyanoferrate(III) (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), hydrochloric acid (HCl) and isoeugenol (*cis-trans* mixture) were purchased from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Magnolol was purchased from Chemos GmbH (Regenstauf, Germany). The naturally occurring compound dehydrodieugenol was synthesized as described in the section “Synthesis of dehydrodieugenol”. The phosphate-buffered saline (PBS, 50 mM) solution was prepared using 0.15 M NaCl, 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.04 M NaOH from Sigma-Aldrich and then adjusted to pH 7.4. Phosphate buffer



(50 mM, pH range 5–8) was used for studying the pH effect on permselectivity. A GOx solution was prepared by dissolving 180 units of enzyme in 10  $\mu$ L of PBS and stored at  $-20$   $^{\circ}$ C. The *o*PD monomer (300 mM for CPA polymerization and 10 mM for CV polymerization) was dissolved in PBS, whereas eugenol and isoeugenol (phenol monomers, 10 mM) and magnolol and dehydrodieugenol (phenol dimers, 10 mM) were dissolved in NaOH (100 mM) immediately before use. Stock solutions of DA (100 mM),  $H_2O_2$  (100 mM) and AA (100 mM) were prepared in water immediately before use, while the stock solution of glucose (1 M) was prepared in water 24 hours before use and stored at room temperature. Solutions were kept at 4  $^{\circ}$ C when not in use. All *in vitro* calibrations were performed using freshly prepared solutions under standard conditions of pressure and temperature. GA (0.1% w/v) and BSA (2% w/v) solutions were prepared in bidistilled water. Teflon-coated platinum (90% Pt, 10% Ir;  $\varnothing = 125$   $\mu$ m) and silver wires ( $\varnothing = 250$   $\mu$ m) were purchased from Advent Research Materials (Eynsham, England).

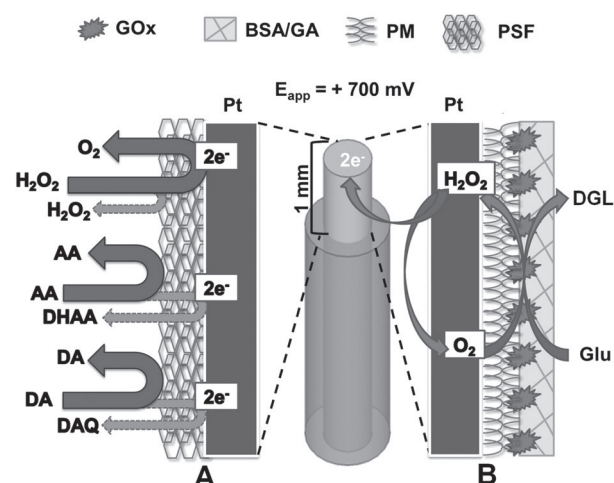
### Synthesis of dehydrodieugenol

Although dehydrodieugenol is present in natural sources for practical purpose it was prepared according to de Farias Dias.<sup>33</sup> Briefly, the oxidative coupling of 4 g of eugenol (24.36 mM) was carried out in a 110 ml 2 : 1 acetone–water solution alkalized with 81 mL of an aqueous solution of 25%  $NH_4OH$ . After 10 minutes of magnetic stirring, 7.51 g of  $K_3Fe(CN)_6$  were dropped in over 4.5 hours, after which another 81 mL of 25%  $NH_4OH$  were added. The reaction proceeded at room temperature (25  $^{\circ}$ C) with continuous stirring for 16 hours. Then the solution was acidified with the appropriate quantity of a 10% HCl solution and the precipitate was filtered under vacuum. The solid was washed with water and then purified by recrystallization from EtOH to achieve dehydrodieugenol in 90% yield as white crystals (mp: 96–8  $^{\circ}$ C).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.33 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H), 3.79 (s, 6H), 4.96–5.18 (m, 4H), 5.80–6.17 (m, 2H), 6.69 (s, 2H), 6.73 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CHCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 40.02, 56.02, 110.84, 115.59, 123.28, 131.82, 137.79, 141.23, 147.44. See Fig. S5 ESI $^{\dagger}$  for  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra of the synthesized dehydrodieugenol detected in  $CDCl_3$  at 399.93 MHz and 100.57 MHz, respectively (Varian Mercury Plus, Palo Alto, USA).

### Platinum microsensors and glucose biosensor construction

All the working electrodes were prepared by removing the Teflon $^{\circ}$  insulation from the platinum wires in order to expose 1 mm of bare metal (Fig. 1 and 3I–J).

Electropolymerization and calibration were carried out using the four-channel equipment (eDAQ QuadStat, e-Corder 410, eDAQ, Australia), Ag/AgCl as the reference electrode (RE) and a length of platinum wire (25 mm) as the auxiliary electrode (AE). The electro-deposition of the polymeric layers was performed by either cyclic voltammetry (CV) or constant potential amperometry (CPA) in 0.1 M NaOH (pH = 12.85) containing 10 mM of phenol.<sup>23</sup> *o*PD (10 mM) was dissolved in PBS (pH 7.4) as was described by Killoran and O'Neill<sup>1</sup> (Fig. S1,



**Fig. 1** Schematic representation of a hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) permselective microsensor obtained by the electropolymerization of natural (-like) guaiacol derivatives (A) and drawing of a first-generation glucose biosensor made on top of the electrosynthesized poly-magnolol film (B). D-Glucono- $\delta$ -lactone (DGL); AA (ascorbic acid); DHAA (dehydro-ascorbic acid); DA (dopamine); DAQ (dopamine quinone); GOx (glucose oxidase); BSA (bovine serum albumin); GA (glutaraldehyde); Glu (glucose); PM (poly-magnolol); PSF (permselective film);  $E_{App}$  (applied potential vs. Ag/AgCl).

ESI $^{\dagger}$ ). CV parameters used for each phenol and *o*PD are reported in Table 1.

The CPA was carried out for 15 minutes in the same buffer used for CV; the applied potential for the electropolymerization was fixed at 2 V for phenols (10 mM) and at +0.7 V for *o*PD (300 mM).<sup>1</sup>

Among the microsensors studied, the most promising in terms of  $H_2O_2$  permselectivity was selected as the transducer for glucose biosensor construction (Fig. 1A). The preparation of the glucose biosensor consisted of dipping (5 times) a working electrode (previously electro-coated with the specific monomer) in a solution of GOx and allowing it to dry for 5 minutes after each dip. The final enzyme-containing net was made by dipping the biosensor in BSA (2%) and GA (0.5%) solutions to promote the cross-linking and immobilization of the enzyme (Fig. 1B).

### Microsensor and biosensor *in vitro* characterization

Permselectivity studies were conducted at days 1, 7 and 15 after construction in 20 mL PBS at room temperature. A constant potential of +0.7 V was applied and a calibration was performed after a period of stabilization. The currents generated by different concentrations of DA (50 and 100  $\mu$ M),  $H_2O_2$  (500 and 1000  $\mu$ M) and AA (500 and 1000  $\mu$ M) were recorded for bare Pt electrodes, microsensors (obtained with different phenols) and the glucose biosensor. The pH effect on permselectivity has been studied at day 1 in a pH range between 5 and 8. Considering the pH-related shift of the oxidation peaks (vs. Ag/AgCl) and after preliminary CVs on bare Pt for  $H_2O_2$ , AA

**Table 1** Cyclic voltammetry (CV) parameters and the resulting oxidation peak potentials of the four phenols (monomers and dimers) used in this study in comparison with *o*PD. All the CV experiments were performed at room temperature using freshly-made solutions (10 mM) and 20 mL electrochemical cell; the phenols were dissolved in 0.1 M NaOH (pH = 12.85) while *o*PD was dissolved in PBS (pH = 7.4). The lower and upper applied potentials ( $E_{\text{App}}$ ) are referred to the Ag/AgCl electrode

Monomer	Cyclic voltammetry (CV) parameters and oxidation peak potentials						
	Rate (mV s <sup>-1</sup> )	Lower $E_{\text{App}}$ (mV)	Upper $E_{\text{App}}$ (mV)	Oxidation peaks (mV $\pm$ standard error <sup>a</sup> ) {cycle $N$ }			
				1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>
1- <i>o</i> PD	20	0	+800	+267 $\pm$ 7 {1}	—	—	—
2-Eugenol	100	0	+2000	+313 $\pm$ 2 {1}	+1760 $\pm$ 10 {1-5}	—	—
3-Isoeugenol	100	0	+2000	+74 $\pm$ 13 {1}	+1647 $\pm$ 13 {1-5}	—	—
4-Dehydrodieugenol	100	-300	+2200	+185 $\pm$ 4 {1}	+1671 $\pm$ 6 {1-5}	+2193 $\pm$ 2 {1-5}	—
5-Magnolol	100	-300	+2000	+217 $\pm$ 13 {1}	+653 $\pm$ 5 {2-5}	+1567 $\pm$ 3 {1-2}	+1944 $\pm$ 7 {1-3}

<sup>a</sup> Standard error of the mean.

and DA, the applied potentials for CPA analysis were corrected for each pH point (5, 6, 7 and 8). Calibration with glucose was performed on the glucose biosensor in order to investigate the biosensor performance ( $K_M$ ,  $V_{\text{max}}$ , linear region slope, AA blocking, LOD and LOQ). Separate groups of sensors were used for scanning electron microscopy (SEM) studies at days 1 and 15 after polymerization to evaluate the aging-related surface changes.

### Statistical analysis

DA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AA concentrations were expressed in  $\mu\text{M}$  while glucose concentrations were given in mM. Oxidation currents were expressed in nanoamperes (nA) and given as baseline-subtracted values  $\pm$  standard error of the mean. The AA  $\Delta I$  value represents the difference between the current resulting from the injection of 1 mM and 0.5 mM of AA in the electrochemical cell.<sup>34</sup> The percent permselectivity ( $S\%$ ), eqn (1) and (2) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versus AA (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $S\%$ ) or DA (DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $S\%$ ), was calculated after calibrations using the following equations:<sup>35</sup>

$$(\text{AA/HP})S\% = \frac{I_{\text{AA}} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{\text{H}_2\text{O}_2} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}} \times 100 \quad (1)$$

$$(\text{DA/HP})S\% = \frac{I_{\text{DA}} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{\text{H}_2\text{O}_2} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}} \times 100 \quad (2)$$

The limit of detection [LOD, eqn (3)] and the limit of quantification [LOQ, eqn (4)] were determined using a statistical method based on the standard deviation ( $\sigma$ ) of the response and the linear region slope (LRS) of the calibration curve according to Rocchitta *et al.*<sup>17</sup>:

$$\text{LOD} = 3.3\sigma/\text{LRS} \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = 10\sigma/\text{LRS} \quad (4)$$

Statistical significance ( $p < 0.05$ ) between groups was evaluated by an unpaired *t*-test, while differences within groups were evaluated by a paired *t*-test.

## Results and discussion

### CV and CPA electrosynthesis of polymeric films

Polymeric films were electro-deposited using CV or CPA. Cyclic voltammograms illustrate the redox processes on the Pt-Ir surface of the four phenols used in this study (eugenol, isoeugenol, dehydrodieugenol and magnolol) (Fig. 2).

The oxidation peaks are indicated in Table 1.

In phenol structures, the first oxidation potential was found to vary in the range of 74 to 312 mV, depending on structural effects. Also the *o*PD monomer was studied (as a reference molecule) and its cyclic voltammograms are reported in Fig. S1 (ESI<sup>†</sup>). The CV parameters (Table 1) were set based on the existing literature for *o*PD<sup>1</sup> and eugenol,<sup>23</sup> while they were obtained experimentally for magnolol and the other phenols. The cycle-by-cycle reduction in the amplitude of the oxidation peaks, visible in the voltammograms of all the studied molecules, is indicative of the formation of non-conductive polymers. Different CV shapes have been observed among monomer and dimer phenols, affecting polymerization on the electrode surface likely due to a lower phenolic O–H bond dissociation enthalpy of the dimer with respect to the monomer.<sup>36,37</sup> Magnolol adsorbed on the electrode surface with the highest decrease of oxidation peak current on the second potential sweep, while, after the third potential sweep, the oxidation peak current was stable. Dehydrodieugenol formed a non-conductive polymer very rapidly, probably due to a better stabilization of the radical in dehydrodieugenol than in the magnolol structure. This is in accordance with the observed higher antioxidant activity of dehydrodieugenol compared to magnolol.<sup>38,39</sup> The presence of two methoxyl groups in the phenol ring (guaiacyl unit) of dehydrodieugenol has a positive influence on the formation and lifetime, through a stabilization effect (weak  $\pi$ -donor), of the corresponding phenoxyl radical. Eugenol and isoeugenol have comparable CV profiles, although the oxidation peak of isoeugenol is better shaped, confirming the different radical species described for these monomers.<sup>40</sup> Isoeugenol forms a reactive quinone

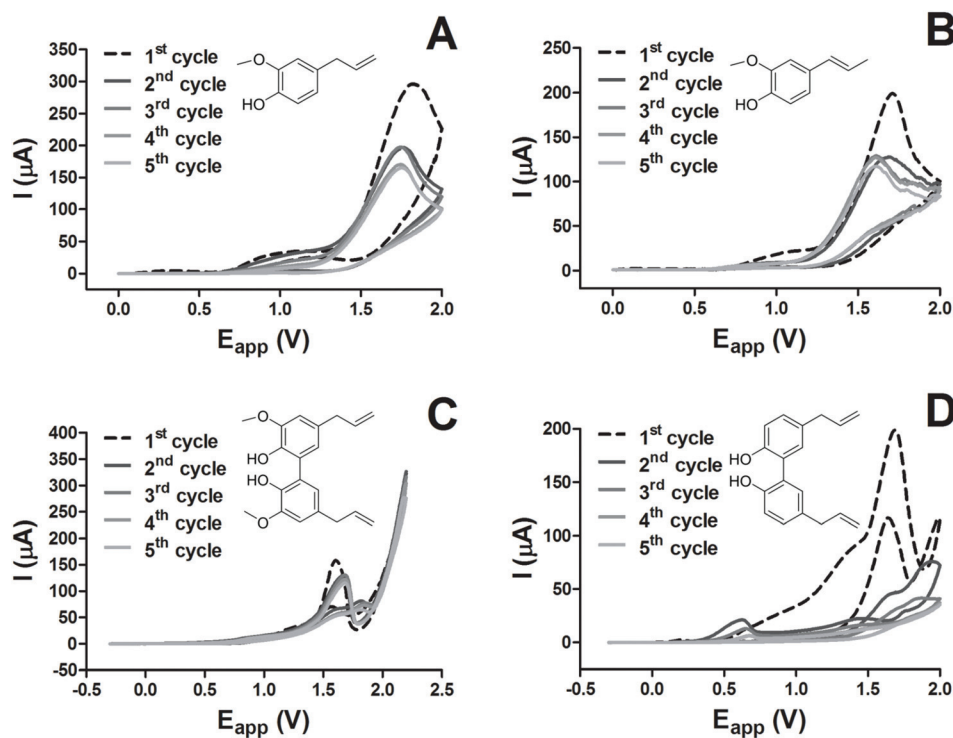


Fig. 2 Cyclic voltammograms of eugenol (A), isoeugenol (B), dehydrodieugenol (C) and magnolol (D) on Pt-Ir in NaOH 0.1 M ( $100 \text{ mV s}^{-1}$ ). A progressive lowering of the current is visible from the first to the fifth scan for all the tested molecules, as well as the formation of non-conductive polymers on the electrode surface.

methide radical likely responsible for the lowest first oxidation potential detected in the phenols studied, whereas phenoxyl/orthoquinone radicals have been estimated for eugenol. The large wave shape observed for eugenol could also be due to a higher superimposition of the peaks generated from both free and adsorbed forms. The different shapes of CV spectra of eugenol and dehydrodieugenol would exclude the coupling reaction of eugenol radicals in solution; thus polymerization occurs preferentially on the electrode surface. In general, the ability of phenols to form the phenoxyl radical and the stability of the radical species generated according to the phenol structure<sup>41</sup> influenced the degree of electropolymerization in the CV assays.

As seen in the literature,<sup>23</sup> the upper limit of a potential sweep used to deposit the polymer by cyclic voltammetry influences the permselectivity of a polyeugenol film. Negative charge formation observed applying high potentials can reject interferent molecules bearing anionic charge, such as AA. Nevertheless, the polyeugenol film for sensor applications has been electropolymerized using CV at lower potential.<sup>24</sup> In the present work the CPA electropolymerization (e-poly) has been carried out by setting the oxidation potential for each molecule on the basis of that previously reported and our present CV results (see section "Platinum microsensors and glucose biosensor construction"). Pivotal experiments, which are in progress in our laboratory, suggest that low polymerization potentials (ranging from 150 mV to 700 mV vs. SCE) improve

the permselectivity of a CPA-polyeugenol film (data not shown).

Exponential decay of the oxidation currents was observed during the entire period of the e-poly (data not shown), indicating, also in this case, the formation of non-conductive films on the surface of the Pt-Ir electrodes.

#### SEM study of polymeric films at day 1

SEM microphotographs illustrate the surface of the permselective sensors at day 1 (Fig. 3).

Polyeugenol (Fig. 3A,B) and poly-isoeugenol (Fig. 3C,D), electro-deposited by CV and CPA, respectively, exhibited a smooth and compact surface, while poly-dehydrodieugenol (Fig. 3E, F) showed a rough and granular surface particularly upon CPA electrodeposition (Fig. 3F). The different behaviors of electrodeposition might be due to the limited area available for orientation of hindered phenols on the electrode surface like dehydrodieugenol that limit the control of polymerization. It is acknowledged that Pt electrode absorption of eugenol involves the allyl chain.<sup>23</sup> Magnolol, structurally similar to dehydrodieugenol and eugenol but lacking in the guaiacyl moiety, is conformationally more flexible, allowing the generated conformer radicals to be oriented in the electrode surface in an easier manner. Magnolol formed an electropolymer with a more defined three-dimensional texture in comparison with the other films (Fig. 3G,H). In particular, the CV-obtained film was characterized by the formation of longitudinal ridges



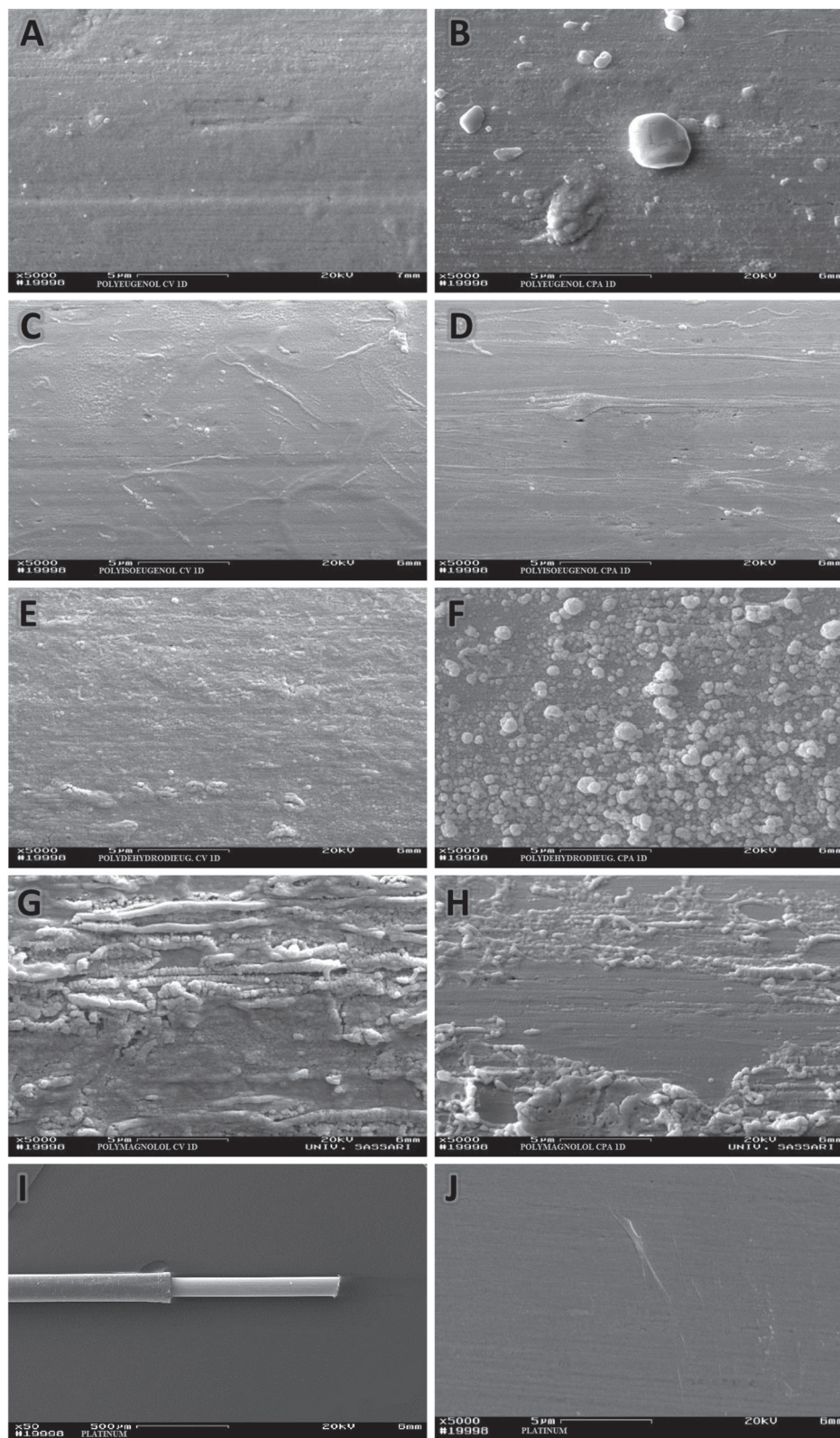


Fig. 3 Scanning electron microscopy (SEM) images at 5000 times magnification for polyeugenol, poly-isoeugenol, poly-dehydrodieugenol and poly-magnolol electrodeposited onto Pt-Ir (I, J) in CV (A, C, E and G) and CPA (B, D, F and H) at day 1.

(Fig. 3G) while CPA electro-synthesis resulted in the formation of a composite pattern in which smooth regions alternate with rough zones (Fig. 3H). Also the poly-*o*PD (PPD) film was characterized by SEM (Fig. S2, ESI†) and resulted in a quite compact and smooth surface, confirming previous observations.<sup>1</sup>

### Sensors sensitivity and selectivity studies at day 1

Table 2 summarizes the results concerning the electrochemical studies performed on day 1 on the new polymers in comparison with PPD (a widely used biosensor permselective polymer) (Table 2).

The parameters investigated were: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> linear slope (0–1 mM), LOD, LOQ and AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permselectivity. PPD obtained by CV exhibited the highest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity (0.97 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup>) while after CPA e-poly the sensitivity was 35% lower (0.63 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup>). The phenol-derived films showed different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeabilities, likely to be related to the thickness and compactness of the polymer; in particular CPA-obtained polydehydrodieugenol, polymagnolol, polyeugenol and polyisoeugenol sensors showed good H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity (0.41 ± 0.02 nA μM<sup>-1</sup>, 0.41 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup>, 0.32 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup> and 0.15 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup>, respectively) while CV-electrosynthesized films resulted in poor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity, ranging from 0.29 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup> (poly-dehydrodieugenol) to 0.08 ± 0.01 nA μM<sup>-1</sup> (polymagnolol). All the studied polymers showed a good hydrogen peroxide linearity with R<sup>2</sup> comprised between 0.992 and 0.999.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> LOD and LOQ analyses showed that, also in this case, PPD is the best polymer with a sensor LOD of 0.06 ± 0.01 μM l<sup>-1</sup> and a LOQ of 0.19 ± 0.02 μM l<sup>-1</sup> after CV electro-synthesis (similar results were obtained after CPA). CV obtained films resulted in a lower sensor LOD and LOQ compared to the corresponding CPA-electrosynthesized polymers; in particular CPA-polymagnolol exhibited a LOD of 0.12 ± 0.01 μM l<sup>-1</sup> and a LOQ of 0.35 ± 0.04 μM l<sup>-1</sup>; these values were similar in the other polymers except for poly-isoeugenol with higher LOD

and LOQ under CV polymerization (Table 2). AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> percent permselectivities (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% and DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%) were calculated as previously described (see the section “Statistical analysis”) by injecting into the electrochemical cell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), AA (1 mM) or dopamine (0.1 mM). CPA-PPD showed an AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% of 0.16 ± 0.02 and a DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% of 9.78 ± 1.01. CV-polymagnolol exhibited very good values of permselectivity (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% = 0.99 ± 0.08 and DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% = 4.53 ± 0.40) while CV-polyeugenol presented an AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% of 1.42 ± 0.15 and a DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% of 13.04 ± 1.12. All CPA-derived phenolic polymers exhibited very poor permselective properties (Table 2). In general, all the CV-derived films had a better S% compared to the CPA-corresponding polymers except for PPD.

During calibrations conducted in different pH phosphate buffers (range 5–8) permselectivity changes did not occur for the studied polymers with the only exception of CV-polyisoeugenol: the increase of pH resulted in a decrease of AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% (−1.71 ± 0.21 AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% per pH; R<sup>2</sup> = 0.97) and in a concomitant increase of DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% (9.95 ± 0.75 DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% per pH; R<sup>2</sup> = 0.99). The two trends (see Fig. S6, ESI†) were inversely related to a Pearson correlation coefficient (*r*) equal to −0.998 and a *p* value of 0.002 (R<sup>2</sup> = 0.99).

Since the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection on bare Pt was uninfluenced by pH changes (data not shown) and the dissociation grade of AA and DA is the same for all studied films (for each pH value), the described phenomenon seems to be related to the polyisoeugenol film. As previously reported,<sup>40</sup> isoeugenol is the only monomer that forms a reactive quinone–methide radical. This particular electropolymerisation mechanism could be responsible for the observed behaviour, suggesting pH-dependent ion-exchange properties. Further studies are necessary to validate this hypothesis.

### Aging studies on the permselectivity of polymeric films

Fig. S3 (ESI†) summarizes the results from electrochemical studies with the new polymers compared to the standard PPD

**Table 2** *In vitro* sensitivity characterization of new polymers in terms of linear slope, LOD and LOQ and permselectivity compared with PPD (*n* = 4 for each group)

Design of a Pt/Ir cylinder coated with permselective films		<i>In vitro</i> electrochemical characterisation at day 1					
		Linear regression		Limit of detection and quantification		Permselectivity	
		LRS (nA μM <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	LOD (μmol l <sup>-1</sup> )	LOQ (μmol l <sup>-1</sup> )	AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)	DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)
1-Pt <sub>c</sub> /PPD	CV	0.97 ± 0.01	0.999	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.02	6.11 ± 0.55	9.03 ± 0.87
	CPA	0.63 ± 0.01	0.992	0.07 ± 0.06	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.02	9.78 ± 1.01
2-Pt <sub>c</sub> /polyeugenol	CV	0.26 ± 0.01	0.999	0.28 ± 0.03	0.86 ± 0.08	1.42 ± 0.15	13.04 ± 1.12
	CPA	0.32 ± 0.01	0.999	0.18 ± 0.02	0.54 ± 0.06	7.58 ± 0.70	24.03 ± 2.20
3-Pt <sub>c</sub> /polyisoeugenol	CV	0.22 ± 0.01	0.998	0.19 ± 0.02	0.58 ± 0.06	4.81 ± 0.50	33.10 ± 2.99
	CPA	0.15 ± 0.01	0.996	0.26 ± 0.03	0.80 ± 0.08	145 ± 15	65.57 ± 7.02
4-Pt <sub>c</sub> /poly dehydrodieugenol	CV	0.29 ± 0.01	0.999	0.17 ± 0.02	0.52 ± 0.05	7.56 ± 0.70	18.10 ± 1.67
	CPA	0.41 ± 0.02	0.992	0.13 ± 0.01	0.38 ± 0.04	26.17 ± 2.44	19.95 ± 2.12
5-Pt <sub>c</sub> /polymagnolol	CV	0.08 ± 0.01	0.998	0.58 ± 0.05	1.76 ± 0.15	0.99 ± 0.08	4.53 ± 0.40
	CPA	0.41 ± 0.01	0.994	0.12 ± 0.01	0.35 ± 0.04	51.1 ± 5.0	16.0 ± 1.5

after 15 days. The studied parameters are a linear region slope and permselectivity ( $S\%$ ). Both CPA-PPD and CV-PPD showed an excellent  $H_2O_2$  slope; under the first conditions (CPA-PPD), the  $H_2O_2$  slope was relatively constant ( $0.63 \pm 0.01 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$  on day 1 vs.  $0.69 \pm 0.04 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$  on day 15), whereas in CV-PPD there was a 40% decrease (from  $0.97 \pm 0.01 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$  on day 1 to  $0.59 \pm 0.02 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$  on day 15,  $p < 0.05$ ). The permselectivity (AA/ $H_2O_2$   $S\%$  and DA/ $H_2O_2$   $S\%$ ) was calculated as described previously on days 1, 7 and 15. The ratio AA/ $H_2O_2$   $S\%$  of CPA-PPD was  $0.16 \pm 0.02$  on day 1, whereas it was  $0.24 \pm 0.02$  on day 15; DA/ $H_2O_2$   $S\%$  decreased by almost 9 times from  $9.78 \pm 1.01$  on day 1 to  $1.10 \pm 0.12$  on day 15 ( $p < 0.05$ ). For CV-PPD, values of AA/ $H_2O_2$   $S\%$  of  $6.11 \pm 0.55$  on day 1 vs.  $2.92 \pm 0.31$  on day 15 were observed ( $p < 0.05$ ); the DA/ $H_2O_2$   $S\%$  value was constant ( $9.03 \pm 1.01$  on day 1 and  $7.97 \pm 0.82$  on day 15). SEM images taken on day 1 and on day 15 (Fig. S2; ESI†) confirm PPD as a compact and smooth polymer, with small craters, as observed previously after both CV and CPA electropolymerization.

Polymeric films derived from phenols displayed different permeability towards  $H_2O_2$ , probably depending on the thickness and compactness of the polymer. Each phenol was oxidized and polymerized on the electrode surface soon after the reaction started and the electrode became coated with the oxidized film. CPA-polydehydrodieugenol, poly-magnolol, poly-eugenol and polyisoeugenol microsensors were sensitive towards  $H_2O_2$  on day 1 (Table 2 and the section "Sensors sensitivity and selectivity studies at day 1"), but displayed a linear region slope decrease over time ( $p < 0.05$  vs. day 1). Polymeric films electrosynthesized in CV have demonstrated a low sensitivity to  $H_2O_2$  already on day 1 (Table 2), confirming the same trend on day 7 and on day 15 ( $p < 0.05$  vs. day 1). Only CV-poly-magnolol microsensors maintained a constant slope up to day 7, increasing in sensitivity at day 15 (30% increase from day 1 ( $p < 0.05$ )).

Fig. S3 (ESI†) illustrates the excellent permselective properties of CV-polymagnolol already on day 1 (Table 2), day 7 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 1.36 \pm 0.12$  and DA/ $H_2O_2$   $S\% = 3.56 \pm 0.40$ ) and day 15 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 1.57 \pm 0.11$  and DA/ $H_2O_2$   $S\% = 4.57 \pm 0.60$ ).

Also the CV-polyeugenol, compared to other polymers, maintained an excellent permselectivity on day 7 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 2.17 \pm 0.20$  and DA/ $H_2O_2$   $S\% = 7.31 \pm 0.70$ ) and on day 15 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 0.79 \pm 0.08$  and DA/ $H_2O_2$   $S\% = 4.31 \pm 0.40$ ).

All the new polymers electrosynthesized by CPA showed a low permselectivity from day 1 to day 15. The CPA-polyeugenol, while showing an improvement of the AA/ $H_2O_2$   $S\%$  value from day 1 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 7.58 \pm 0.70$ ) to day 15 (AA/ $H_2O_2$   $S\% = 0.42 \pm 0.04$ ), displayed high  $S\%$  values for dopamine from day 1 (DA/HP  $S\% = 24.03 \pm 2.20$ ) to day 15 (DA/ $H_2O_2$   $S\% = 13.59 \pm 1.34$ ).

SEM analyses (Fig. S4, ESI†) did not provide evidence for any structural change in the new polymers after 15 days.

Polymeric films obtained in CV presented a better  $S\%$  compared to the corresponding polymers electrosynthesized in CPA, with the only exception of CPA-PPD.

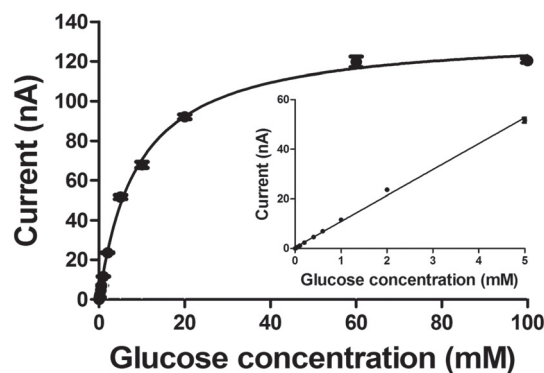


Fig. 4 *In vitro* calibration of a glucose biosensor showing Michaelis-Menten kinetics and linear regression (inset).

### Glucose biosensor characterization

Based on the electrochemical results, a glucose biosensor was constructed with poly-magnolol electrosynthesized by CV. *In vitro* sensitivity of the glucose biosensor (Fig. 4) has been determined by injecting into the electrochemical cell known amounts of glucose (ranging from 0 to 140 mM) (Fig. 4).

The calibration curve shows a classical Michaelis-Menten kinetics, with  $R^2 = 0.997$  ( $n = 3$ ),  $V_{\text{max}}$  and  $K_M = 134 \pm 5 \text{ nA}$  and  $9.03 \pm 0.81 \text{ mM}$ , respectively. The linear region slope was evaluated by considering concentrations included between 0 and 5 mM, with  $R^2 = 0.997$  ( $n = 3$ ) and a slope at  $10.46 \pm 0.19 \text{ nA mM}^{-1}$ . LOD and LOQ values were  $4.3 \pm 0.4 \mu\text{M L}^{-1}$  and  $13 \pm 2 \mu\text{M L}^{-1}$ , respectively. To evaluate the shielding effect of poly-magnolol towards potentially interfering molecules such as ascorbic acid (AA) and dopamine (DA), two distinct calibrations were carried out: the first one with AA (within a 0–1000  $\mu\text{M}$  range), and the second one with DA (0–100  $\mu\text{M}$  range). Based on these calibrations, two values were calculated:  $\Delta I \text{ AA} = -0.13 \text{ nA}$ , representing the difference between the current produced by injection of 1 mM AA and the current produced by 0.5 mM AA; and  $\Delta I \text{ DA} = 5.39 \text{ nA}$ , representing the difference between the current generated by injection of 100  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  DA. The aging studies on the glucose biosensor (data not shown) showed  $H_2O_2$  sensitivity and permselectivity similar to the microsensors prepared with CV-poly-magnolol, and previously described.

## Conclusions

A small collection of polymeric films derived from compounds belonging to natural 2-methoxy phenols and hydroxylated biphenyls was synthesized in the present study using two electrosynthesis protocols. Structural features of the phenols were found to influence their reactivity in the formation of the film and some general trends have been observed.

The structural principles governing the permselectivity of the magnolol-derived film are supposed to be in accord with the conformational flexibility of magnolol rather than the



resonance-effective guaiacyl unit common to the other phenols. By virtue of the biphenylic structure of magnolol, a better interaction with the enzyme is possible compared to the phenol monomers. The final effect would be a stronger grafting of the enzyme to the electropolymerized thin film.

The electrodes coated with phenols both in CV and CPA are stable and responsive. They are still functional and may be used even though they do not any longer meet the starting electrode specifications. Taking into account the known electrochemical behavior of natural phenols,<sup>42,43</sup> sustainable coatings that may represent an effective alternative to PPD can be designed.

## Acknowledgements

This publication was made possible by NPRP grant no. NPRP 4-259-2-083 from the Qatar National Research Fund (a member of Qatar Foundation). The statements made herein are solely the responsibility of the authors.

## Notes and references

- 1 S. J. Killoran and R. D. O'Neill, *Electrochim. Acta*, 2008, **53**, 7303–7312.
- 2 J. Tian, Q. Liu, A. M. Asiri, A. H. Qusti, A. O. Al-Youbi and X. Sun, *Nanoscale*, 2013, **5**, 11604–11609.
- 3 R. D. O'Neill, J. P. Lowry, G. Rocchitta, C. P. McMahon and P. A. Serra, *Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 78–88.
- 4 Y. Q. Dai and K. K. Shiu, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 1806–1813.
- 5 G. Rocchitta, O. Secchi, M. D. Alvau, D. Farina, G. Bazzu, G. Calia, R. Migheli, M. S. Desole, R. D. O'Neill and P. A. Serra, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 10282–10288.
- 6 S. Vaddiraju, D. J. Burgess, F. C. Jain and F. Papadimitrakopoulos, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 1557–1562.
- 7 H. Matsuhisa, M. Tsuchiya and Y. Hasebe, *Colloids Surf., B*, 2013, **111**, 523–529.
- 8 G. Calia, G. Rocchitta, R. Migheli, G. Puggioni, Y. Spissu, G. Bazzu, V. Mazzarello, J. P. Lowry, R. D. O'Neill, M. S. Desole and P. A. Serra, *Sensors*, 2009, **9**, 2511–2523.
- 9 A. Rasooly and K. E. Herold, *J. AOAC Int.*, 2006, **89**, 873–883.
- 10 P. Salazar, M. Martin, R. Roche, J. L. Gonzalez-Mora and R. D. O'Neill, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 748–753.
- 11 P. Salazar, M. Martin, R. D. O'Neill, R. Roche and J. L. Gonzalez-Mora, *J. Electroanal. Chem.*, 2012, **674**, 48–56.
- 12 Z. Wang, H. Yang, B. Gao, Y. Tong, X. Zhang and L. Su, *Analyst*, 2014, **139**, 1127–1133.
- 13 X. Jing-Juan and C. Hong-Yuan, *Anal. Biochem.*, 2000, **280**, 221–226.
- 14 S. A. Rothwell, M. E. Kinsella, Z. M. Zain, P. A. Serra, G. Rocchitta, J. P. Lowry and R. D. O'Neill, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 3911–3918.
- 15 Y. L. Yang, T. F. Tseng and S. L. Lou, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2007, 6625–6628.
- 16 M. Ma, Z. Miao, D. Zhang, X. Du, Y. Zhang, C. Zhang, J. Lin and Q. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **64**, 477–484s.
- 17 G. Rocchitta, O. Secchi, M. D. Alvau, R. Migheli, G. Calia, G. Bazzu, D. Farina, M. S. Desole, R. D. O'Neill and P. A. Serra, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 7072–7079.
- 18 Y. Oztekin, Z. Yazicigil, A. Ramanaviciene and A. Ramanavicius, *Sens. Actuators, B*, 2011, **152**, 37–48.
- 19 G. Milczarek and A. Ciszewski, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 529–532.
- 20 S. Fujisawa, T. Atsumi, Y. Murakami and Y. Kadoma, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2005, **53**, 28–38.
- 21 B. A. Patel, M. Arundell, K. H. Parker, M. S. Yeoman and D. O'Hare, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7643–7648.
- 22 G. Milczarek and A. Ciszewski, *Electroanalysis*, 1998, **10**, 791–793.
- 23 A. Ciszewski and G. Milczarek, *Electroanalysis*, 2001, **13**, 860–867.
- 24 R. Toniolo, N. Dossi, A. Pizzariello, S. Susmel and G. Bontempelli, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 628–636.
- 25 G. Milczarek and A. Ciszewski, *Colloids Surf., B*, 2012, **90**, 53–57.
- 26 P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard and S. W. Fesik, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3443–3447.
- 27 T. Liu, X. Zheng, W. Huang and K. Wu, *Colloids Surf., B*, 2008, **65**, 226–229.
- 28 X. Yao, X. Xu, P. Yang and G. Chen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 3233–3242.
- 29 X. Yang, M. Gao, H. Hu and H. Zhang, *Phytochem. Anal.*, 2011, **22**, 291–295.
- 30 W. Huang, T. Gan, S. Luo and S. Zhang, *Ionics*, 2013, **19**, 1303–1307.
- 31 J. Zhao, W. Huang and X. Zheng, *J. Appl. Electrochem.*, 2009, **39**, 2415–2419.
- 32 C. Zhou, Y. Dong, Z. Li, X. Xu and Z. Liu, *J. Electroanal. Chem.*, 2010, **642**, 115–119.
- 33 A. De Farias Dias, *Phytochemistry*, 1988, **27**, 3008–3009.
- 34 M. R. Ryan, J. P. Lowry and R. D. O'Neill, *Analyst*, 1997, **112**, 1419–1424.
- 35 S. A. Rothwell and R. D. O'Neill, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 5413–5421.
- 36 Y. Kadoma, S. Ito, I. Yokoe and S. Fujisawa, *In Vivo*, 2008, **22**, 289–296.
- 37 Y. Murakami, A. Kawata, Y. Seki, T. Koh, K. Yuhara, T. Maruyama, M. Machino, S. Ito, Y. Kadoma and S. Fujisawa, *In Vivo*, 2012, **26**, 941–950.
- 38 S. Fujita and J. Taira, *Free Radicals Biol. Med.*, 1994, **17**, 273–277.
- 39 J. Taira, T. Ikemoto, K. Mimura, A. Hagi, A. Murakami and K. Makino, *Free Radicals Res. Comms*, 1993, **19**, S71–S77.
- 40 F. Bertrand, D. A. Basketter, D. W. Roberts and J. P. Lepoittevin, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 335–343.
- 41 M. Lucarini, G. F. Pedulli, L. Valgimigli, R. Amorati and F. Minisci, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 5456–5462.
- 42 J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado and J. M. Rodríguez-Mellado, *Molecules*, 2012, **17**, 5126–5138.
- 43 A. Simić, D. Manojlović, D. Segan and M. Todorović, *Molecules*, 2007, **12**, 2327–2340.

## Electropolymerized phenol derivatives as permselective polymers for biosensor applications

Giammaria Calia,<sup>a,b</sup> Patrizia Monti,<sup>c</sup> Salvatore Marceddu,<sup>d</sup> Maria A. Dettori,<sup>c</sup> Davide Fabbri,<sup>c</sup> Samir Jaoua,<sup>c</sup> Robert D. O'Neill,<sup>f</sup> Pier A. Serra,<sup>\*b</sup> Giovanna Delogu,<sup>c</sup> and Quirico Migheli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Agraria and Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.

<sup>b</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/b, I-07100 Sassari, Italy.

<sup>c</sup> Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.

<sup>d</sup> Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.

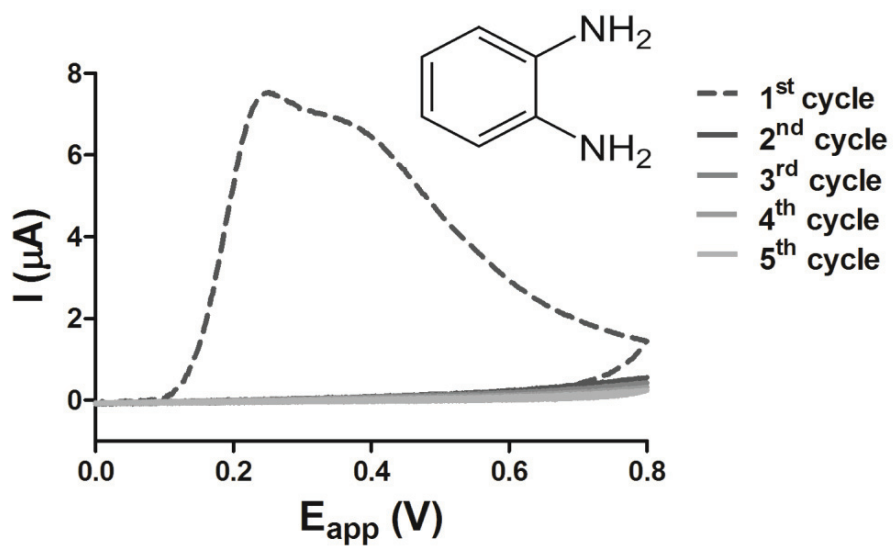
<sup>e</sup> Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.

<sup>f</sup> UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

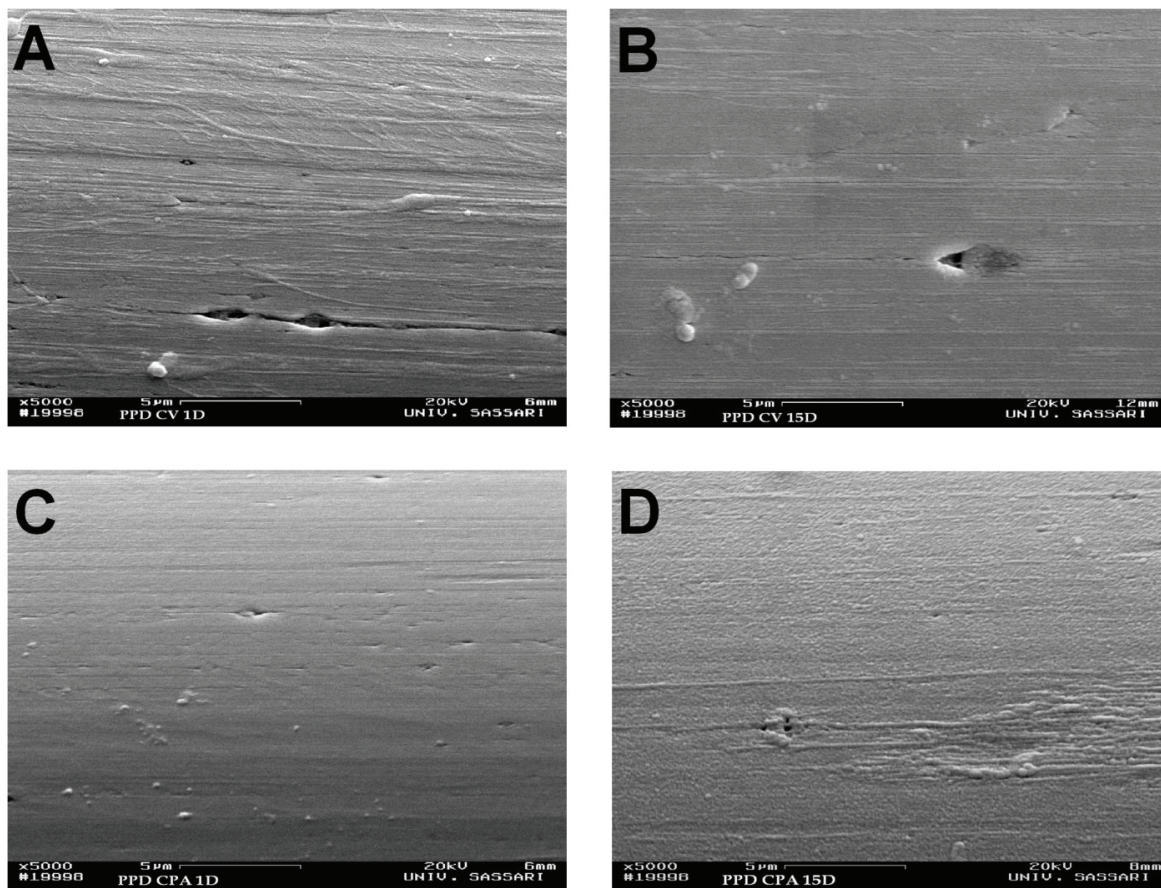
\*Corresponding author: E-mail Address: [paserra@uniss.it](mailto:paserra@uniss.it)

In the electronic supplementary information there are a cyclic voltammetry of *o*PD polymerized as described in the experimental section in the text; scanning electron microscope (SEM) at 5000 magnification of PPD electrodeposited onto Pt-Ir in CV and CPA at day1 and day 15; graphics of the linear slope of new polymers and permselectivity compared with PPD by day 1 to day 15; scanning electron microscope (SEM) at 5000 magnification for poly-eugenol, poly-isoeugenol, poly-dehydrodieugenol and poly-magnolol electrodeposited onto Pt-Ir in CV and CPA at day 15; NMR spectra of synthesised dehydrodieugenol; effect of pH on the AA / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DA / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permselectivities (S%) of polyisoeugenol film electrosynthesised by means of CV.

**Figure S-1.** Cyclic voltammetry of *o*PD (10 mM) dissolved in PBS (pH 7.4) with scan speed of 20 mV/sec. A progressive lowering of the current is observed from the first to the fifth scan, as well as the formation of non-conductive polymers on the Pt-Ir surface.

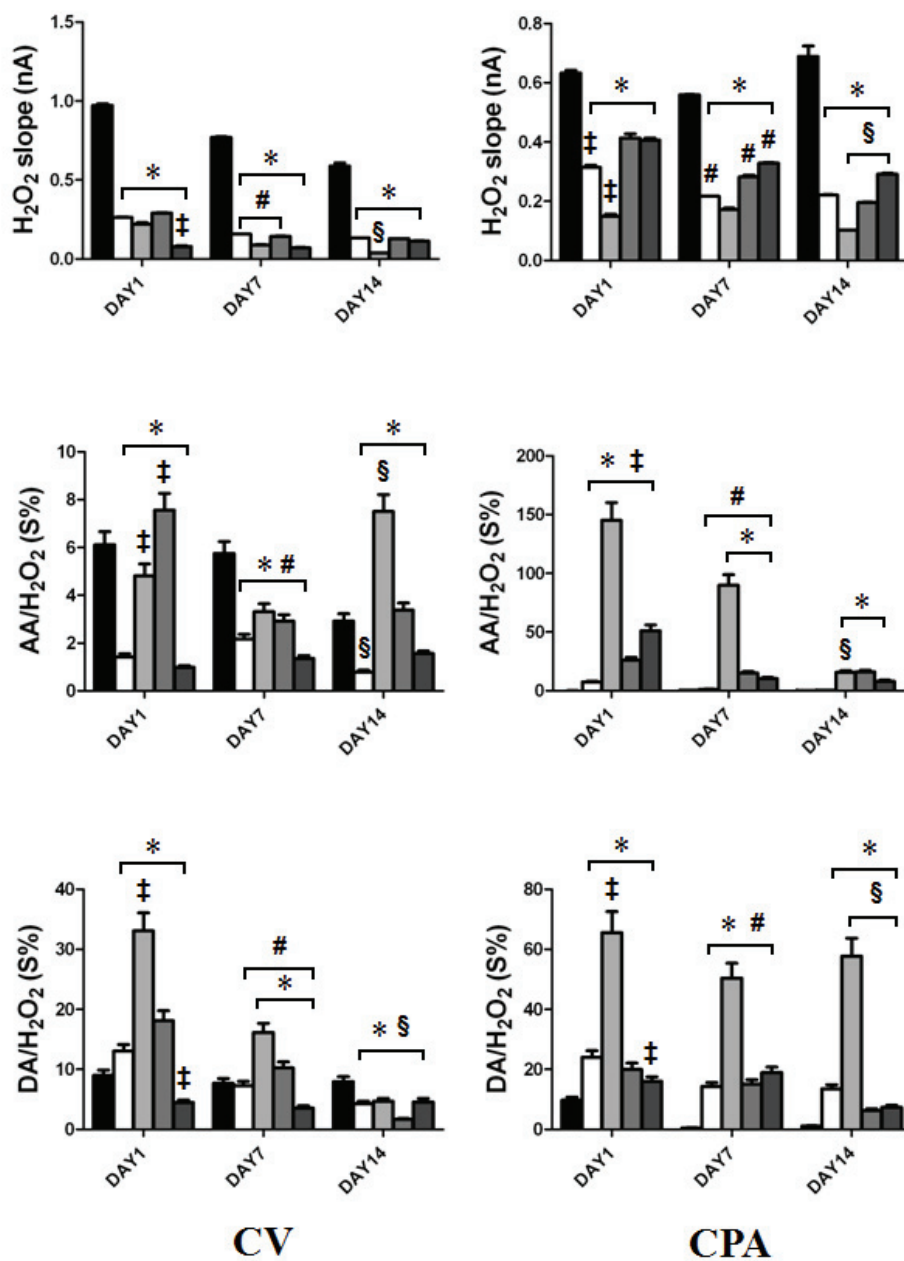


**Figure S-2.** Scanning electron microscope (SEM) at 5000 magnification of PPD electrodeposited onto Pt-Ir in CV (A-B) and CPA (C-D) at day1 (A-C) and day 15 (B-D).



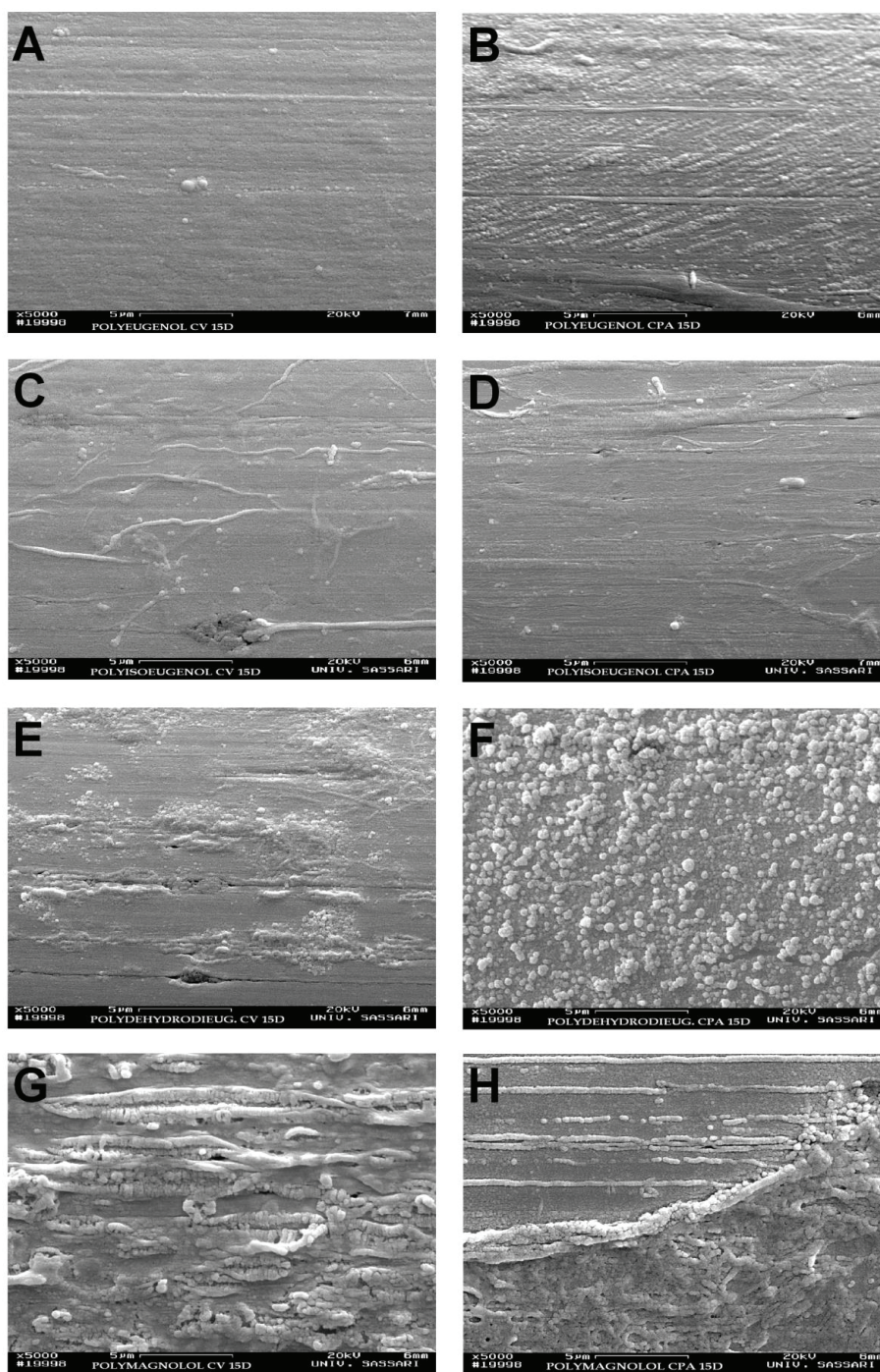
**Figure S-3.** The linear slope of new polymers and permselectivity compared with PPD by day 1 to day

Pt<sub>c</sub>/PPD  
  Pt<sub>c</sub>/polyeugenol  
  Pt<sub>c</sub>/polydehydrodieugenol  
 \* P < 0.05 vs the PPD group at series days  
 Pt<sub>c</sub>/polyisoeugenol  
  Pt<sub>c</sub>/polymagnolol  
 ‡ P < 0.05 vs the corresponding group  
 # P < 0.05 vs the corresponding group at day1  
 § P < 0.05 vs the corresponding group at day7

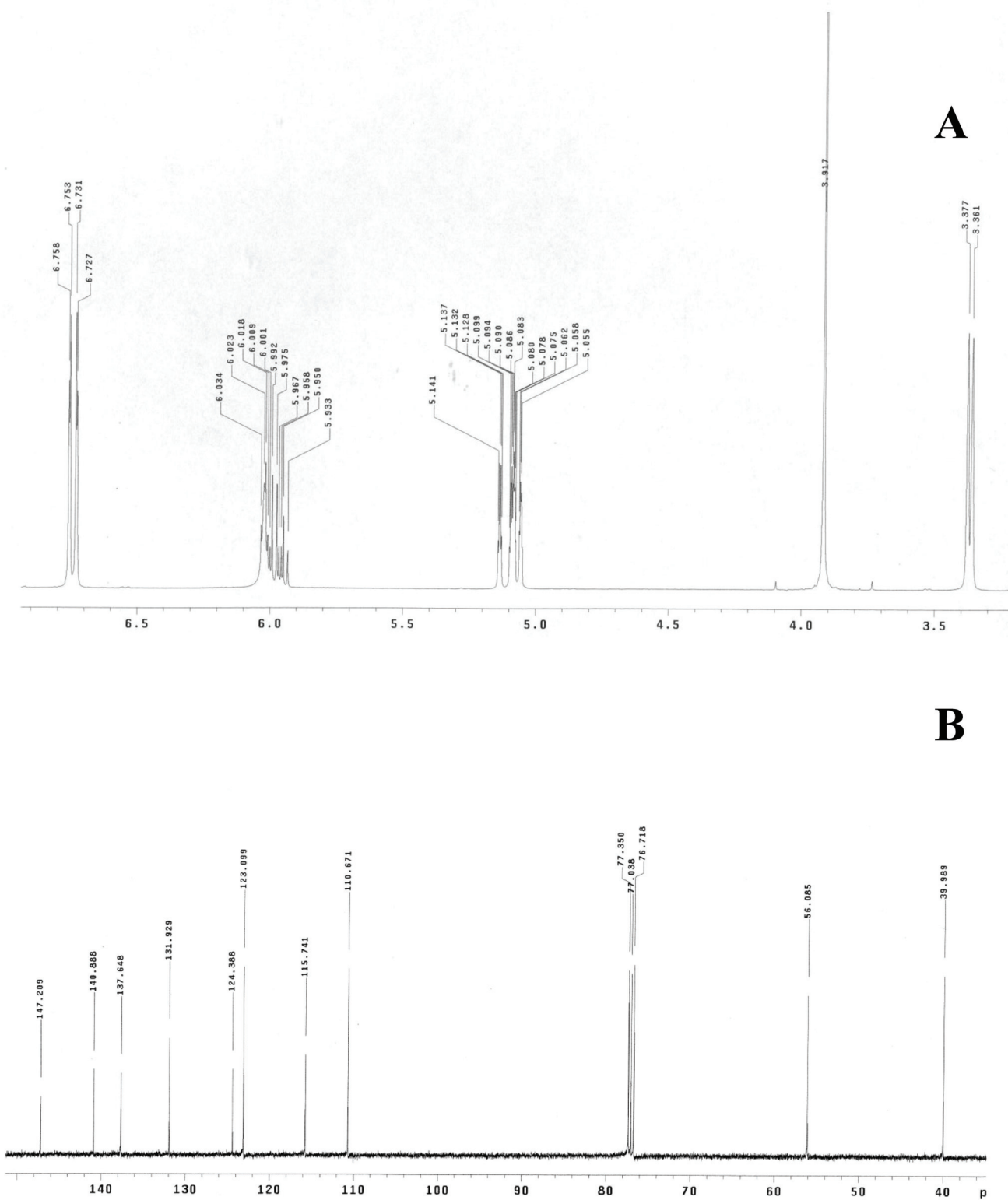




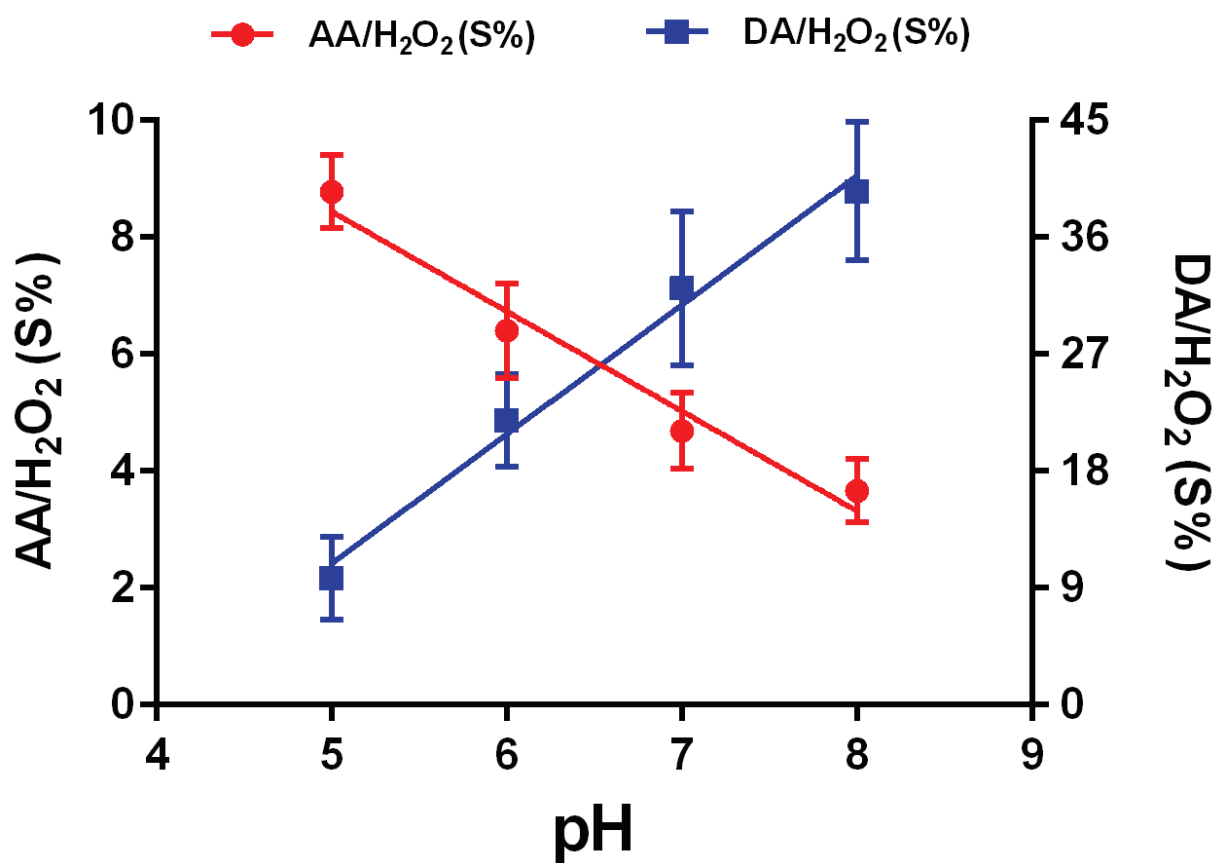
**Figure S-4.** Scanning electron microscope (SEM) at 5000 magnification for poly-eugenol, poly-isoeugenol, poly-dehydrodieugenol and poly-magnolol electrodeposited onto Pt-Ir in CV (A,C,E and G) and CPA (B,D,F and H) at day 15.



**Figure S-5.**  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of synthesised dehydrodieugenol recorded in  $\text{CDCl}_3$  solution at 399.93 MHz and 100.57 MHz, respectively (Varian Mercury Plus, Palo Alto, USA).a Varian VXR 5000 spectrometer.



**Figure S-6.** Effect of pH on the AA / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DA / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permselectivities (S%) of polyisoeugenol film electrosynthesised by means of CV.



**CAPITOLO  
III**

**Controllo delle caratteristiche di permselectività di  
polimeri derivati da fenoli naturali:  
influenza del potenziale**

## SINTESI

I biosensori amperometrici di prima generazione sono basati su reazioni di ossidoriduzione che portano alla produzione di  $H_2O_2$ . Nelle condizioni comunemente utilizzate per determinare l' $H_2O_2$  (potenziale applicato di +700 mV vs Ag/AgCl) anche altre molecole presenti ubiquitariamente in natura possono essere ossidate. L'acido ascorbico (AA) e la dopamina (DA) sono tra queste e dal punto di vista del funzionamento di un biosensore rappresentano dei comuni interferenti. Per ovviare a questo problema, sugli elettrodi viene elettrosintetizzato un polimero che forma una membrana permselectiva. I polimeri derivati dall'*ortofenilendiammina* (PPD) sono usati comunemente e hanno dimostrato una grande permselectività nei confronti dell'AA. In un nostro precedente lavoro (Calia *et al.*, 2015) 2-metossi fenoli naturali quali eugenolo e isoeugenolo e i bifenili idrossilati deidrodieugenolo e magnololo sono stati elettropolimerizzati con successo su elettrodi di Pt. Il poli-magnololo polimerizzato in CV è risultato il migliore tra i fenoli naturali, ma le sue prestazioni non eguagliano quelle del PPD. Per poter migliorare le caratteristiche di permselectività dei fenoli in questo studio sono state scelte condizioni di elettropolimerizzazione differenti.

### **Strategia per migliorare la permselectività: scelta dei potenziali di polimerizzazione**

Il precedente lavoro suggeriva che la sovraossidazione dei polimeri determina una peggiore permselectività, pertanto i monomeri sono stati polimerizzati a potenziali più bassi. Inoltre è stata aggiunta una nuova molecola, il guaiacolo. Quest'ultimo possiede una unità guaiacilica comune agli altri fenoli ma manca di una catena alifatica in posizione para. Vista l'influenza dei sostituenti dell'anello sulle capacità ossidative si è ritenuto interessante inserire il guaiacolo nello studio.

I bassi potenziali sono stati applicati tramite CPA a -50, 0, +100, + 500 mV calcolati rispetto al loro primo picco di ossidazione determinato precedentemente in Calia *et al.*, 2015; i potenziali riferiti all'elettrodo di riferimento Ag/AgCl sono riportati in Tabella 1. L'elettropolimerizzazione tramite CPA è avvenuta per 15 minuti ai quattro differenti potenziali applicati immergendo gli elettrodi in una soluzione di NaOH 100 mM contenente 10 mM di monomero. Come confronto il PPD è stato polimerizzato secondo Killoran e O'Neill, 2008.

Monomeri Naturali	Bassi potenziali (mV)			
	CPA			
	-50*	0* 1 <sup>st</sup> E <sub>Ox</sub>	+100*	+500*
Guaiacolo	+130	+180	+280	+680
Eugenolo	+273	+313	+413	+813
<i>isoeugenolo</i>	+25	+75	+175	+575
Deidrodieugenolo	+135	+185	+285	+685
Magnololo	+170	+220	+320	+720

Tabella 1 - Potenziali applicati per l'elettropolimerizzazione delle molecole: i potenziali sono riferiti all'elettrodo di riferimento Ag/AgCl, ad esclusione di quelli con \* che si riferiscono al loro primo picco di ossidazione ( $1^{st}E_{Ox}$ ) dei monomeri come determinato in Calia et al., 2015.

I polimeri sono stati caratterizzati in termini di permselectività, stabilità nel tempo e tramite microscopia a scansione elettronica (SEM). Tutte le calibrazioni sono state condotte amperometricamente in 20 mL di tampone fosfato (PBS), ad un potenziale di 700 mV vs Ag/AgCl, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel range di 0–1 mM, AA (0–1 mM) e DA (range di 0-0.1 mM). I dati sono stati raccolti con Chart (v5.2 dalla AD Instruments Ltd., Oxford, UK) e analizzati con Prism (v5.01, GraphPad Software, San Diego, CA). Tutti i sensori sono stati conservati a 4 °C a secco.

### Caratterizzazione dei polimeri: studi di permselectività al giorno 1

I primi picchi di ossidazione, qui determinati attraverso esperimenti di CV, concordano con la letteratura (Milczarek e Ciszewski, 2003) e riflettono l'ordine di ossidazione (partendo dal più ossidabile): *i*EU<GU<DEU<MA<EU. Inoltre, per tutti i fenoli selezionati, questi picchi collassano tra il primo e secondo ciclo, indicando la formazione di un film non-conduttivo elettrodepositato sulla superficie del platino. Dal decadimento di tipo esponenziale durante la polimerizzazione tramite CPA si può dedurre un'isolamento dell'elettrodo dovuto alla formazione del polimero.

La strada scelta per migliorare la permselectività è stata quella di limitare la sovraossidazione ricorrendo a bassi potenziali. Per poter compensare le differenti reattività dei fenoli all'ossidazione, i potenziali di polimerizzazione sono stati applicati in



base al primo picco di ossidazione del monomero. Come si può vedere nella Tabella 2 tutte le S% sono significativamente più basse ( $p < 0.05$ ) ai bassi potenziali tranne per GU, EU e *i*EU per l'AA. Da notare come la DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% mostra un miglioramento più marcato rispetto alla AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%, evidenziando come il potenziale applicato influenzi in misura maggiore la permeabilità verso la dopamina. Inoltre, riducendo la presenza di cariche negative sul polimero grazie a condizioni di polimerizzazione meno ossidanti, tutti i valori migliori per la DA sono stati ottenuti al più basso potenziale applicato.

Polimeri	Bassi potenziali					
	Polimerizzazione in CPA vs Potenziale Applicato ( $E_{app}$ )					
	$E_{app}$ (mV) vs:		AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	$E_{app}$ (mV) vs:		DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%
1 <sup>st</sup> $E_{Ox}$	Ag/AgCl	1 <sup>st</sup> $E_{Ox}$		Ag/AgCl		
p-GU	+100	+180	$0.72 \pm 0.06$	-50	+130	$0.63 \pm 0.07$
p-EU	+500	+813	$0.74 \pm 0.22$	-50	+273	$2.00 \pm 0.33$
p- <i>i</i> EU	+500	+575	$0.86 \pm 0.07$	-50	+25	$0.90 \pm 0.21$
p-DEU	-50	+135	$0.38 \pm 0.04$	-50	+135	$0.45 \pm 0.06$
p-MA	-50	+170	$0.13 \pm 0.02$	-50	+170	$0.27 \pm 0.01$

Tabella 2 - Valori migliori di permselectività per ogni monomero studiato al giorno 1. I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard della media.

La repulsione elettrostatica non sembra essere però l'unica ragione, perché anche la permselectività nei confronti dell'AA (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%) migliora a bassi potenziali ma solo per i bifenili DEU e MA mentre per i fenoli GU, EU, *i*EU la sovraossidazione è un elemento chiave per ottenere la migliore permselectività nei confronti dell'AA. L'AA a pH neutro è deprotonato e quindi una sovraossidazione dovrebbe migliorare la permselectività. I valori migliori di AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% per i due polimeri derivanti dal DEU e MA sono stati ottenuti con il potenziale applicato meno ossidante (-50). Verosimilmente, la permselectività verso l'AA dipende da svariati fattori tra i quali l'esclusione dell'interferente per ridotte dimensioni del reticolo polimerico. A -50 mV sotto il 1<sup>st</sup>  $E_{Ox}$  la velocità di polimerizzazione è più bassa e questo può aiutare la disposizione spaziale dei monomeri, favorendo la formazione di interazioni inter- e intra-molecolari ordinate specialmente per le molecole ad alta dimensionalità come i due bifenili studiati, DEU e MA, entrambi provvisti di un legame C-C tra i due anelli aromatici e libero di ruotare.

Una rete più stretta escluderebbe quindi l'AA, più grande, ma permetterebbe alla più piccola  $H_2O_2$  di attraversare il polimero e raggiungere il trasduttore. Sebbene i meccanismi che governano la permselectività non siano stati studiati approfonditamente, gli studi a bassi potenziali hanno portato ad un miglioramento della prestazione del micro sensore. Il MA polimerizzato tramite CPA a 170 mV vs Ag/AgCl dimostra una AA/ $H_2O_2$  S% significativamente non differente ( $p < 0.05$ ) e una DA/ $H_2O_2$  S% addirittura 36 volte migliore rispetto al PPD.

### **Studi di permselectività al giorno quattordici**

Anche la stabilità nel tempo è stata indagata ripetendo le calibrazioni al giorno quattordici dopo la polimerizzazione. L'AA/ $H_2O_2$  S% della PPD polimerizzata in CPA è  $0.24 \pm 0.02$  al giorno 14, DA/ $H_2O_2$  S% diminuisce di quasi nove volte dal giorno 1, arrivando a un valore di  $1.10 \pm 0.12$  al giorno 14 ( $p < 0.05$ ). Il poli-eugenolo rimane stabile per quanto riguarda la AA/ $H_2O_2$  S% ( $0.76 \pm 0.30$ ,  $p > 0.05$ ) e la DA/ $H_2O_2$  S% migliora fino a  $1.19 \pm 0.09$ . Anche per il poli-guaiacolo è stato osservato un invecchiamento simile. Sorprendentemente il poli-*isoeugenolo* a -50 mV mostra la migliore permselectività per l'AA al giorno 14 dell'intero set di dati (AA/ $H_2O_2$  S% giorno14 =  $0.06 \pm 0.01$ ) e una invariata DA/ $H_2O_2$  S% ( $0.90 \pm 0.07$ ). L'*isoeugenolo* è il fenolo più ossidabile, pertanto il potenziale, misurato dopo quattordici giorni a partire da un elettrodo sul quale è stata polimerizzata la molecola in condizioni di sovraossidazione ( $E_{app} + 575$  mV), ha obbligato il polimero a riorganizzare il reticolo nel tempo e, dopo 14 giorni, ottenere a bassi potenziali applicati, un marcato aumento di permselectività nei confronti dell'AA grazie ad una migliore distribuzione delle cariche negative. Questa distribuzione delle cariche non inficia nel tempo la permselectività nei confronti della DA. Questo discorso vale anche per il bifenile magnololo che, a differenza dell'*isoeugenolo* ha bisogno di bassi potenziali per ottenere un film polimerico permselectivo nei confronti dell'AA. Il maggior ingombro sterico dovuto alla struttura bifenilica rispetto a quella di un semplice fenolo richiede maggior tempo per riorganizzare un film polimerico più permselectivo nei confronti dell'AA e che si evidenzia, sempre a bassi potenziali, dopo quattordici giorni. In conclusione il poli-magnololo si è confermato come il polimero permselectivo migliore anche al giorno 14. Il poli-magnololo a -50 mV migliora, infatti, la sua AA/ $H_2O_2$  S%



fino a un valore estremamente basso ( $0.07 \pm 0.01$ ), anche se aumenta lievemente la sua DA/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% arrivando a  $0.73 \pm 0.06$  ( $p < 0.05$ ) al giorno 14.

## **Conclusioni**

Attraverso i vari protocolli applicati è stata investigata l'influenza del potenziale di polimerizzazione sulle proprietà permselective dei diversi film. Le analisi al SEM hanno evidenziato la presenza di un rivestimento polimerico, liscio e omogeneo. Le immagini del SEM non evidenziano differenze particolari tra i polimeri.

I dati derivanti dalle calibrazioni evidenziano come l'over ossidazione rappresenti un punto chiave nel respingere interferenti anionici come l'acido ascorbico e quindi dovrebbe essere evitata in presenza d'interferenti carichi positivamente come la dopamina. Gli studi condotti hanno rilevato come migliori proprietà permselective possono essere ottenute scegliendo il potenziale più adatto alla polimerizzazione di ciascun fenolo studiato. Un differente comportamento della permselectività rispetto alla sovra ossidazione è stato evidenziato tra fenoli e bifenili dove, in quest'ultimi, l'effetto derivante dall'ingombro sterico della struttura gioca un ruolo chiave nella formazione del film polimerico. Gli elettrodi rivestiti dai polimeri sono stabili e responsivi per almeno due settimane. Tra questi il poli-*isoeugenolo* e il poli-magnololo sono permselectivi quanto i film derivati dall'*ortofenilendiammina* per quanto riguarda l'AA/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% e addirittura migliori per la DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%. Questi due fenoli, polimerizzati secondo le condizioni studiate, possono rappresentare un'efficace alternativa alla polifenilendiammina.

Similmente al precedente lavoro, il poli-magnololo utilizzato nella costruzione di un biosensore a base di acetilcolinesterasi e colina ossidasi ha mantenuto le sue caratteristiche di permselectività.

# IMPROVING PERMSELECTIVITY OF ELECTROPOLYMERIZED NATURAL PHENOLS CHOOSING POLYMERIZATION POTENTIAL

PATRIZIA MONTI,<sup>a,c</sup> GIAMMARIO CALIA,<sup>a,b</sup> SALVATORE MARCEDDU,<sup>d</sup> MARIA A. DETTORI,<sup>c</sup> DAVIDE FABBRI,<sup>c</sup> SAMIR JAOUA,<sup>c</sup> Robert D. O'Neill,<sup>f</sup> QUIRICO MIGHELI,<sup>a</sup> GIOVANNA DELOGU,<sup>c</sup> and PIER A. SERRA,<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup> *Dipartimento di Agraria and Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/b, I-07100 Sassari, Italy.*

<sup>c</sup> *Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.*

<sup>d</sup> *Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.*

<sup>e</sup> *Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.*

<sup>f</sup> *UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.*

<sup>\*</sup> *Corresponding author: E-mail Address: [paserra@uniss.it](mailto:paserra@uniss.it)*

## ABSTRACT

**Often first-generation amperometric biosensor designs are based on Red-Ox reactions that commonly generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Unfortunately, at this potential other naturally occurring molecules such as ascorbic acid (AA) or dopamine (DA) can be oxydized. Phenylendiamines (PPD) are commonly used to avoid this problem: when these compounds are electro-deposited on the transducer surface, a highly selective membrane is formed. The electrosynthesis over Pt-Ir electrodes of natural 2-methoxy phenols such as guaiacol, eugenol and *isoeugenol*, and hydroxylated biphenyls like dehydrodieugenol and magnolol were fully assessed. They showed quite good values of permselectivity for biosensor application, but not as good as PPDs. In order to improve permselectivity of films derived from natural phenol several electropolymerization potentials were applied by means of constant potential amperometry. Our experiments highlight how better permselective properties can be obtained by choosing the most suitable polymerization potential for each molecule. The electrodes coated with phenols were stable and responsive throughout**

two weeks. Among the tested compounds, poly-*isoeugenol* and poly-magnolol proved as permselective as PPD films and may represent a natural and effective alternative to PPD. Also a biosensor based on acetylcholine esterase and choline oxidase enzymes was electrocoated with a poly-magnolol film in order to prove feasibility of this newly electrosynthesized films in a first generation amperometric biosensor.

**KEY WORDS: BIOSENSORS, ELECTRODEPOSITION, MAGNOLOL, PERMEABILITY, PERMSELECTIVITY.**

## INTRODUCTION

As any other analytical device, biosensors suffer of interference problems. In an amperometric biosensor the electrodeposition of polymeric film is a common and effective way to minimize such inconvenience: the task of these films is to prevent interferences reaching the transducer surface. In order to improve the electrodeposited film many parameters can be explored. For example, among the three isomers *ortho*, *meta* and *para*, the *ortho*-phenyldiamine-derived film (PPD) have the best permselective performances (Killoran and O'Neill, 2008). Also the background electrolyte in which electropolymerization occurs can influence permselectivity (Rothwell *et al.*, 2010; Rothwell *et al.*, 2008). Another variable that can strongly influence polymerization and permselectivity of electrosynthesized polymers is the applied polymerization potential, as observed for *ortho*-phenyldiamine (Rothwell *et al.*, 2010). In our previous work (Calia *et al.*, 2015) natural occurring compounds like eugenol (EU), *isoeugenol* (*i*EU), dehydrodieugenol (DEU) and magnolol (MA) demonstrated their abilities to electropolymerize on a platinum surface by means of relatively high potential (2 volts vs Ag/AgCl). The comparison between a polyphenyldiamine (PPD) film obtained by electrodeposition of *ortho*-phenyldiamine and our polymers showed that an improvement of permselective properties of these polyphenols is needed. As observed by Ciszewski and Milczarek (2001) the upper limit potential applied during the electropolymerization of eugenol by means of cyclic voltammetry can strongly determine the permselectivity properties of the polymer. A combination of molecular size exclusion, ionic interaction and hydrophobic/hydrophilic balance were proposed for eugenol

polymerized under cyclic voltammetry (Ciszewski and Milczarek, 2001). Small and non-charged molecules, as  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO and  $\text{O}_2$ , can easily permeate p-EU but charged molecules of approximately of the same size as  $\text{NO}_2^-$  and larger ascorbic acid (AA) and dopamine (DA) can be rejected/attracted by the presence of charges of the same sign. The amount of negative charge on p-EU depends on potential applied during polymerization. At potential higher than +700 mV polymer oxidation starts, leading to the formation of carboxylic group, supposedly due to oxidation of C=C bond (Ciszewsky and Milczarek, 1998). The increase of the overall negative charge can better reject interferences like AA. A poly-EU showed good properties for sensor application polymerized by CV either with a very wide potential range from 0 to 2 Volts (Calia *et al.*, 2015; Ciszewski and Milczarek, 2001) even from 0 until +0.7 Volts (Toniolo *et al.*, 2011). Taking into account that potential applied can hugely influence permselectivity of phenol-derived film the present investigation explored the effect of lower applied potentials in the electropolymerization of 2-methoxyphenols as guaiacol (GU), *isoeugenol* (*i*EU) and eugenol (EU), symmetric dimer of eugenol (dehydrodieugenol, DEU) and magnolol (MA), the latter two being hydroxylated biphenyls. All these molecules, belonging to the natural pool, are electropolymerizable monomers that form promising permselective self-assembling thin films. These naturally occurring compounds are less toxic than *o*PD and have other useful chemical features. Despite in our previous work we obtained the best results with CV (Calia *et al.*, 2015) we decided to carry on polymerization by means of constant potential amperometry (CPA), in order to apply a unique, fixed potential during the polymerization. We preferred this technique also because it permits the polymerization of four electrodes at once, hence saving time, materials and increasing reproducibility. Additionally, best performing coating was used as permselective film in a acetylcholine esterase and choline oxidase based biosensor.

## **EXPERIMENTAL**

### **Chemicals and solutions**

All chemicals were analytical reagent grade or higher purity and dissolved in bidistilled deionized water (MilliQ<sup>®</sup>). Ascorbic acid (AA), dopamine (DA),

hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimethyl sulfoxide (DMSO), guaiacol, acetone, eugenol (>98%), sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl) and *isoeugenol* (*cis-trans* mixture) were purchased from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Magnolol was purchased from Chemos GmbH (Regenstauf, Germany). The naturally occurring compound dehydrodieugenol was synthesized as described by Calia *et al.* (2015). The phosphate-buffered saline (PBS, 50 mM) solution was prepared using 0.15 M NaCl, 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.04 M NaOH from Sigma-Aldrich and then adjusted to pH 7.4. Guaiacol, eugenol and *isoeugenol* (phenol monomers, 10 mM) and magnolol and dehydrodieugenol (phenol dimers, 10 mM) were dissolved in NaOH (100 mM) immediately before use. Stock solutions of DA (100 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) and AA (100 mM) were prepared, respectively, in: bidistilled water, 0.01 M HCl and 0.01 M *ortho*-phosphoric acid immediately before use. Solutions were kept at 4 °C when not in use. All *in vitro* calibrations were performed using fresh solutions under standard conditions of pressure and temperature. Teflon-coated platinum (90% Pt, 10% Ir; Ø = 125 µm) and silver wires (Ø = 250 µm) were purchased from Advent Research Materials (Eynsham, England).

### **Platinum microsensor and AChE/ChOx biosensor construction**

All the working electrodes were prepared removing the Teflon<sup>®</sup> insulation from the platinum wires in order to expose 1 mm of bare metal.

CV were performed in 10 mM of phenol and in 0.1 M NaOH (pH=12.85) in order to determine their first oxidation peak. Potential swept for 0 to 2 V for 10 cycles at a scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup>.

The electro-deposition of the polymeric layers was performed by means of constant potential amperometry (CPA) using the same background electrolyte of CV for 15 minutes.

Electropolymerization and calibration were made using the four-channel equipment (eDAQ QuadStat, e-Corder 410, eDAQ, Australia), Ag/AgCl as reference electrode (RE) and a stainless steel wire as auxiliary electrode (AE).

The best performing polymer was included in the design of a biosensor based on the two enzymes acetylcholine esterase (AChE) and choline esterase (COx). The

AChE/COx biosensor construction started with the adsorption of enzymes on the electropolymerized electrodes by simple dipping. The enzyme mix was obtained from 10  $\mu\text{L}$  of COx solution (1 U/ $\mu\text{L}$ ) and 10  $\mu\text{L}$  of AChE (10 U/ $\mu\text{L}$ ) solution. After few seconds, electrodes were quickly dipped in a 1% solution of polyethylenimine (PEI). Enzymes-PEI dipping was repeated for 5 times with a drying time of 5 minutes between dips. Then electrodes were dipped into a 2% bovine serum albumine (BSA) solution and a quick dip into a 1% glutaraldehyde solution. The immobilization occurred by placing the electrode at 37°C for 15 minutes. Biosensors were stored at +4°C partially immersed in PBS until use.

### **Microsensor and biosensor *in vitro* characterization**

Permeability studies were conducted at day 1 and repeated at day 14 after polymerization in 20 mL PBS at room temperature. A constant potential of +0.7 V was applied and a calibration was performed after a period of stabilization. The currents generated by different concentrations of DA (0-100  $\mu\text{M}$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-1000  $\mu\text{M}$ ) and AA (0-1000  $\mu\text{M}$ ) were recorded for bare Pt electrodes and microsensors (obtained with different phenols at different polymerization potential applied). Separate group of sensors were used for scanning electron microscopy (SEM) studies at day 15 after polymerization.

### **Statistical analysis**

DA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AA concentrations were expressed in  $\mu\text{M}$ . Oxidation currents were expressed in nanoampere (nA) and given as baseline-subtracted values  $\pm$  standard error of the mean.

According to the theory of Rothwell *et al.* (2009) percent permeability (P%) was calculated as:

$$P\% (\text{H}_2\text{O}_2) = \frac{I_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{slope}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{slope}) \text{ at bare Pt}} \times 100 \quad (1)$$

$$P\% (\text{AA}) = \frac{I_{\text{AA}} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{\text{AA}} (1 \text{ mM}) \text{ at bare Pt}} \times 100 \quad (2)$$

$$P\% (DA) = \frac{I_{DA} (0,1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{DA} (0,1 \text{ mM}) \text{ at bare Pt}} \times 100 \quad (3)$$

Where I-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, I-AA and I-DA means current intensity (nA) registered for, respectively, hydrogen peroxide, ascorbic acid and dopamine.

Because the thickness in which molecule permeate is unknown P% is an apparent permeability.

The percent permselectivity (S%), Eqs. (4) and (5) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *versus* AA (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%) or DA (DA/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S%) was calculated after calibrations by using the following equations (Rothwell and O'Neill, 2011):

$$(AA/HP) S\% = \frac{I_{AA} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{H_2O_2} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}} \times 100 \quad (4)$$

$$(DA/HP) S\% = \frac{I_{DA} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}}{I_{H_2O_2} (1 \text{ mM}) \text{ at Pt/polymer}} \times 100 \quad (5)$$

Total Area and Plateau current can be obtained from polymerization curve. Total Area is the area under the curve during polymerization time, it is a measure of the total electronic exchange (nCoulomb); Plateau current is the current (nA) registered at the end of polymerization, giving a measure of the monomer permeability throughout the polymeric film.

Statistical significance (p<0.05) between groups was evaluated by calculating unpaired t-test. Correlation was evaluated calculating Pearson's coefficient.

## RESULTS AND DISCUSSION

A further molecule was tested in addition to those reported in our previous work (Calia *et al.*, 2015): guaiacol (GU). This molecule is the simplest of the entire phenols set; it contains only the guaiacyl unit, lacking in other substituents on the phenolic ring. Its electropolymerization has been assessed in only one paper

(Milczarek and Ciszewski, 2003). In Table 1 poly-GU permselectivities are compared with those of the other phenols, polymerization conditions were applied as described in Calia *et al.* (2015).

Table 1 - Permselectivities (S%) of the previously-studied phenols compared to guaiacol at day 1. Polymerization conditions are the same as Calia *et al.* (2015).

		p-GU	p-EU	p- <i>i</i> EU	p-DEU	p-MA
AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	CV	1.73 ± 0.10	1.44 ± 0.13	5.10 ± 0.58	7.36 ± 0.73	1.00 ± 0.07
	CPA	148.9 ± 4.2	7.41 ± 0.73	149.2 ± 16.0	24.3 ± 2.4	52.8 ± 5.7
DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	CV	25.0 ± 0.6	13.5 ± 1.2	31.3 ± 3.4	17.7 ± 1.8	4.36 ± 0.38
	CPA	55.3 ± 5.4	25.5 ± 2.4	69.9 ± 7.6	18.5 ± 2.1	15.3 ± 1.68

Considering the promising AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% in CV, close to p-EU, and the dramatic effect of a overpotential during CPA, guaiacol has been selected for polymerization at lower potentials.

### Electropolymerization of phenols at low applied potentials

We choosed the applied potential in relation with the individual first oxidation peak (<sup>1st</sup>E<sub>Ox</sub>) of each phenol instead against a reference electrode. In order to determine the first oxidation peak of the new-entered guaiacol, a cyclic voltammetry was performed in the same condition as for other phenols. <sup>1st</sup>E<sub>Ox</sub> peaks of phenols are reported in Figure 1 with the <sup>1st</sup>E<sub>Ox</sub>-related applied potentials.



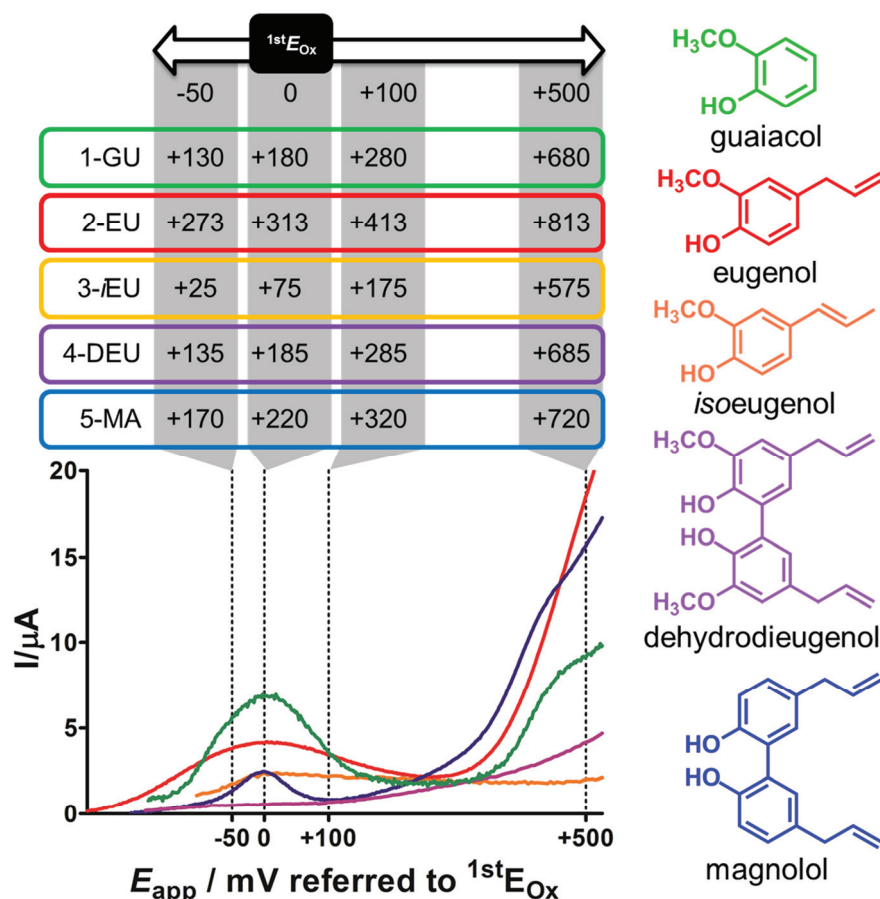


Figure 1 – First oxidation peak potentials ( $^{1st}E_{Ox}$ ) and potential referred to Ag/AgCl reference electrode are reported in the table. The graphic shows the CV first cycle of each phenol setting the  $^{1st}E_{Ox}$  as 0, only the forward part is reported. Structures of studied phenols are at the right part of the figure.

We applied four different polymerization potentials ( $E_{App}$ ) for each phenol. Relative  $E_{App}$  is calculated setting  $^{1st}E_{Ox}$  as 0. In this way we applied a potential lower of 50 mV, and higher of +100 mV and +500 mV, with respect to  $^{1st}E_{Ox}$ ; also a  $E_{App}$  corresponding to  $^{1st}E_{Ox}$  was included. Our purpose was to choose a  $E_{App}$  that would respect the easiness of oxidation typical of each phenol. In fact there is a 238 mV span between the lowest oxidation peak of iEU and the highest EU. At the relative underpotential of -50 mV, oxidation and polymerization are slowed, while at a relative overpotential of 100 mV, reactions are faster, at +500 mV even a further oxidation of polymers can occur.

The corresponding applied potential referred to Ag/AgCl reference electrode can be seen in Figure 1.

During CPA polymerization every phenol at every potential follow a very rapid decay; the amount of oxidation current generated by monomers oxidation

decreased during polymerization due to an electrode passivation; at the end of polymerization time a stable, negligible oxidation current (plateau) was reached. Oxidation currents decay indicates a non conductive polymer deposition for almost all phenols. In fact, p-DEU at +500 and p-EU at +500 the initial current decay is followed by an increase in oxidation current; differently from other polymerization a plateau current is not reached (Supplementary material figure 1 – SEM microphotographies). Polymerization curves were analyzed with two mathematical models (one-phase exponential decay or two-phase exponential decay) but registered currents do not fitted, showing a very low statistical significance. This peculiar behavior does not prevent the presence of a compact film, confirmed by *in vitro* calibration and physically observed at scanning electron microscopy performed over polymerized electrodes (Figure 3 - scanning microphotographies; Supplementary Material figure 1 – scanning microphotographies).

### **Effect of CPA low applied potential on permeability and permselectivity at day 1**

All S% were significantly lower ( $p < 0.05$ ) at low potential than previously reported (Calia *et al.*, 2015). In Table 2 only the best permselectivities shown by each phenol-derived film compared with values from PPD are reported.

Notably, the best DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% values were obtained at the lowest  $E_{app}$ ; DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% gets worst at increasing potential for guaiacyl-containing molecules guaiacol, eugenol, *isoeugenol* and dehydrodieugenol. The permeabilities studies at day one (Figure 2) suggest that the lack of permselectivity towards DA depends in a larger extent on increased apparent permeability (P(DA)%) for DA than a decrease in apparent permeability towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The increase in P(DA)% may be due to an increase of the polymer oxidation indicated by the higher Total Area registered during electropolymerization.

Table 2 - The electropolymerization potential with the best permselectivity values at day 1 and 14 of phenols in comparison with PPD as determined in Calia et al. (2015). \* significant different from PPD, unpaired t test.

	PPD	p-GU	p-EU	p-iEU	p-DEU	p-MA
<b>Day 1</b>						
AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)	0.16 ± 0.02	0.72 ± 0.06*	0.74 ± 0.22*	0.86 ± 0.07*	0.38 ± 0.04*	0.13 ± 0.02
Potential group	as Calia et al. 2015	+100	+500	+500	-50	-50
DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)	9.78 ± 1.01	0.63 ± 0.07*	2.00 ± 0.33*	0.90 ± 0.21*	0.45 ± 0.06*	0.27 ± 0.01*
Potential group	as Calia et al. 2015	-50	-50	-50	-50	-50
<b>Day 14</b>						
AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)	0.24 ± 0.02	0.81 ± 0.18*	0.76 ± 0.30	0.056 ± 0.014*	1.16 ± 0.03*	0.07 ± 0.01*
Potential group	as Calia et al. 2015	-50	-50	-50	-50	-50
DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)	1.10 ± 0.12	0.89 ± 0.10	1.19 ± 0.09	0.90 ± 0.07	7.24 ± 0.03*	0.73 ± 0.06*
Potential group	as Calia et al. 2015	-50	-50	-50	0	-50

In fact, Total Area and P(DA)% strongly correlate (Supplementary material table 2 – plateau and total area correlation). Ciszewski and Milczarek (2001) proposed for p-GU and p-EU permeabilities a model based on hydrophobic interactions. The films are able to concentrate the relatively hydrophobic non-protonated dopamine. Magnolol films seem not to be influenced by this phenomenon, maintaining its P(DA)% quite stable (Figure 2). This feature may be due to the different structure of magnolol, bearing a phenolic ring in place of a guaiacolic unit (shared by the other phenols).

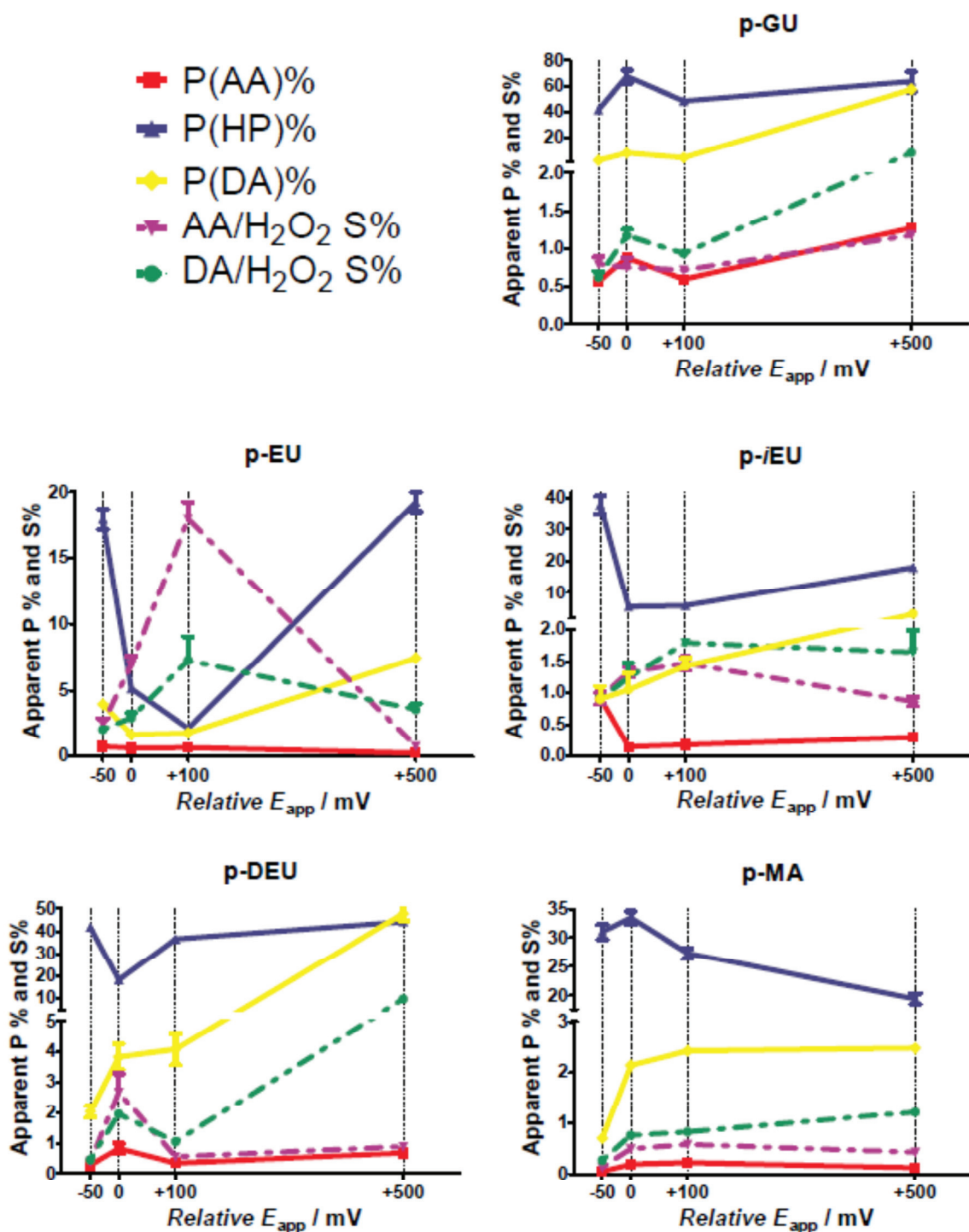


Figure 2 – Selectivities (S%) and apparent permeabilities (P%) of phenol-derived polymeric film versus relative polymerization potential (Relative  $E_{app}$ ) at day 1.

The S(AA)% behavior seems not so strongly dependent from  $E_{app}$ , except for p-EU which will deserve a separate discussion. Generally, permselectivities towards AA are quite low, indicating a good selective exclusion for this interferent. The most

impermeable film to AA, having the lowest P(AA)% ( $0,051 \pm 0,007$ ) and the best AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (S%) is -50 mV p-MA. These values are not significantly different from PPD ( $p < 0.05$ ). Also a -50 mV p-DEU shows a very good AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (S%) (Table 2). Differently from EU, *i*EU and GU, when dissolved in a basic media DEU does not form a phenoxyl radical (Fujisawa *et al.*, 2002); although a phenoxyl radical derived from magnolol can be hypothesized, there is no experimental evidence of this. Phenoxyl radical is an oxidation product that may represent the starter of polymerization. The high pH of the background electrolyte may induce a phenoxyl radical formation for EU, *i*EU and GU, that readily triggers polymerization; on the other hand, oxidizing DEU and MA into their corresponding radicals involves an extra-time and can subtract a part of oxidative power needed for electropolymerization. This example underlines the different reactivities and pathway that monomers can possess.

Electrostatic repulsion does not seem to be the only reason for AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% improvement at low potentials. Since AA in neutral pH is deprotonated, an overoxidation should improve the permselectivity but the best AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% of the two dimers p-DEU and p-MA was obtained with the less oxidating (lowest) potential applied (-50). Most likely, permselectivity towards AA depends on many factors like size exclusion and different conformational features of the electropolymerized film. At -50 mV under the 1<sup>st</sup> $E_{Ox}$  polymerization rates are slowed. This could help the spatial disposition of assembling monomer, especially for molecules provided with a free C-C rotation bond like the two hydroxylated biphenyls studied. A tighter net excludes the larger AA but allows the smaller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to move throughout the polymer and reach the transducer.

The influence of  $E_{app}$  on permselective properties of eugenol deserves a separate discussion. All permeabilities towards AA, DA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reach the minimum when electropolymerized at a *relative*  $E_{app}$  of 0. A 0 p-EU seems to be an impermeable membrane. Furthermore it is the only monomer that has a negative correlation between P%(AA) versus plateau and Total Area.

The reason needs to be found in the different chemical species involved in the polymerization mechanism. In alkaline solution (pH>9.5) eugenol and *isoeugenol* easily form their corresponding phenoxyl radicals that improves solubility of these

hydrophobic compounds (Fujisawa *et al.*, 2002). A highly reactive quinone methide stabilization was proposed for eugenol, meanwhile *isoeugenol* can stabilize into a benzyl radical (Atsumi *et al.*, 2005). Also a pathway involving O-demethylation in *ortho* position of phenolic ring has been proposed for these two isomers leading to a *ortho*quinone radical formation (Bertrand *et al.*, 2007). The different experimental condition used here can differently affect radicals and intermediate involved in polymerization. Radicals from eugenol might be polymerized into a very tight net, almost impenetrable at *relative*  $E_{app}$  of 0. Meanwhile at a lower potential (-50 mV) radical formation is slowed, leading to short chain oligomers that may lead to a loose network. This allow molecules to assume a favourable tridimensional orientation on the transducer surface during eletrodeposition and, by time, within polymer matrix. At higher potentials a further oxidation may lead to different radicals and loss of methylgroup, gaining also a charge exclusion property. Furthermore, it is acknowledged that eugenol can be adsorbed on Pt electrode involving the allyl chain (Milczarek and Ciszewski, 2001): this could help eugenol to strictly compacting on surface, giving place to an impermeable film.

#### **Effect of CPA applied potential on permeability and permselectivity at day 14**

Aging studies revealed for each polymer the best results in S%AA for -50 mV (Table 2). The best S%DA for p-DEU was found under a *relative*  $E_{app}$  of 0, but this value is not statistically different ( $p>0.05$ ) for S%DA at a *relative*  $E_{app}$  of -50 (Supplementary material table 1). The lowest electropolymerization potential generated a polymer whose properties were improved by aging.

It is possible that a lower polymerization rate leads to the formation of oligomers that can precipitate on the transducer and adjust their spacial disposition by time. At high polymerization rate, triggered by a higher  $E_{app}$ , oligomers can be readily oxidized and radicals generated react in a longer, hindered and randomized chain. Unlikely p-MA, p-DEU gets worst by time although to a different extent. In fact, p-MA permselectivity decreases only for DA, whereas improved permselectivity was observed for AA reaching a S% DA of  $0.07 \pm 0.01$ . p-DEU permselectivity decreased significantly for DA ( $0.45 \pm 0.06$  at day 1,  $7.24 \pm 0.03$  at day 14) and to



a lesser extent for AA ( $0.38 \pm 0.04$  at day 1,  $1.16 \pm 0.03$  at day 14). Maybe the hindering due to the *ortho* methoxylic groups on the phenolic ring prevent molecule stabilizing in the right conformation during time.

Previously mentioned p-MA and p-*t*EU at -50 improved their permselectivities, even by reaching the excellent performance of oPD. This improvement is mainly due to an increase in their P% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (compare Figure – 2 with Supplementary material figure 2 – Permeabilities and permselectivities at day 14).

### **SEM microphotographies**

In our previous work (Calia *et al.*, 2015) electropolymerization technique seemed to determine a rough and granular surface particularly clear upon CPA electrodeposition for dimers. Similar differences could not be distinguished for polymers obtained at lower potential (Supplementary material figure 1 – SEM microphotographies).

SEM analysis at day one shows a smooth and compact surface, clearly different from the surface of Pt-Ir. Orientation of hindered phenols like MA or DEU did not determine any particular three-dimensional texture. As a representative group, Figure 3 reports SEM images from phenols polymerized at a *relative*  $E_{app}$  of 0. Although a 0 p-EU is characterized by very peculiar values in permselectivity and permeability (Figure 2), this individual features cannot be distinguished observing visual aspect of the film. A p-EU film shown in figure 3 part B seems to be quite similar to the film obtained from its symmetric dimer DEU (Figure 3, part D).



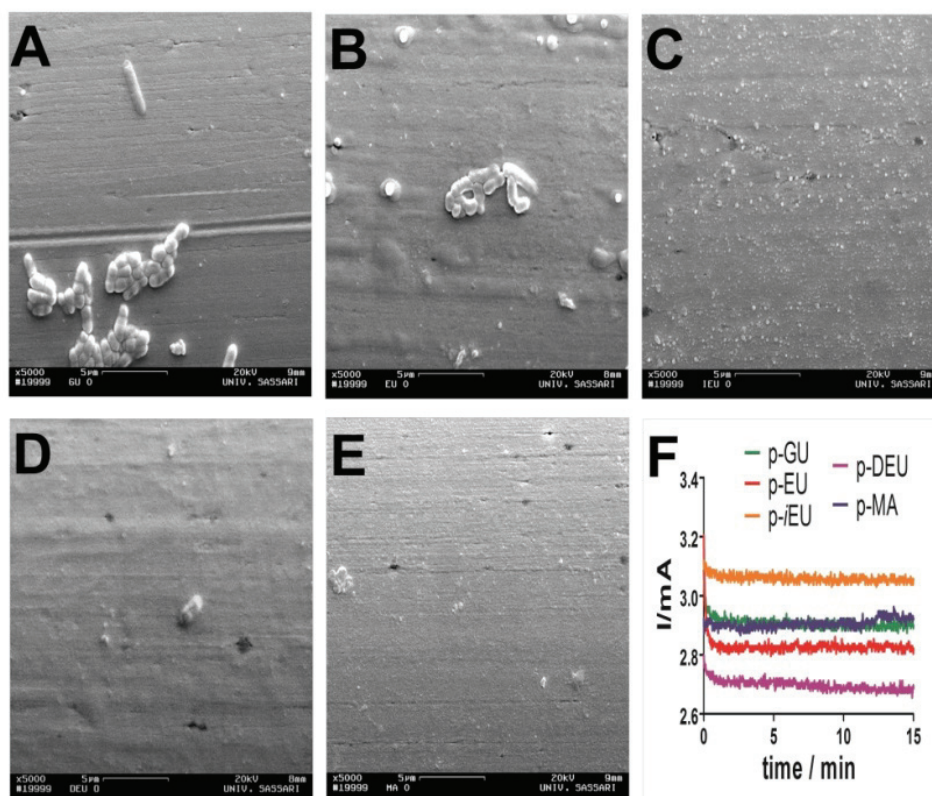


Figure 3 – SEM microphotographies at 5000x magnification of phenol polymerized at a relative  $E_{app}$  of 0. A: poly-guaiacol; B: poly-eugenol; C: poly-isoegenol; D: poly-dehydrodieugenol; E: poly-magnolol; F: time line of polymerizations of phenols at relative  $E_{app}$  of 0.

### Biosensor AChE/COx prototype

The p-MA usefulness was assessed in a biosensor design based on Cox/ACE enzymes. A poly-magnolol was electrosynthesized in CPA at +170 mV vs Ag/AgCl (-50 mV relative  $E_{app}$ ). Then four biosensors were constructed as described previously and *in vitro* calibrations were performed on day 1 after polymerization. *In vitro* sensitivity of the AChE/COx biosensor (Figure 4) has been determined by injecting in the electrochemical cell known amounts of acetylcholine (ranging from 0 to 2500  $\mu$ M) (Figure 4).

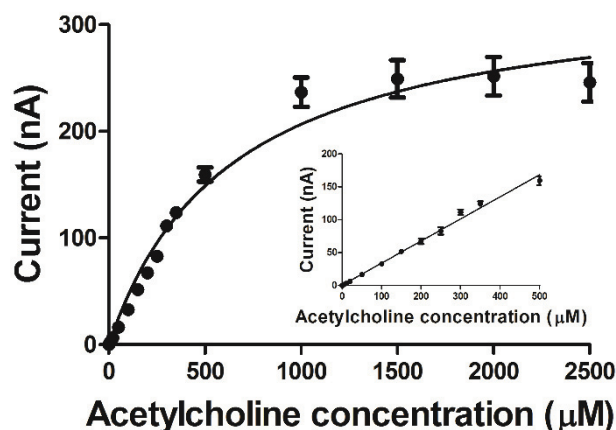


Figure 4 - *In vitro* calibration of Cox/ACE biosensor showing Michaelis-Menten kinetics and linear regression (inset).

The calibration curve shows a classical Michaelis-Menten kinetics, with  $R^2 = 0.961$  ( $n = 4$ ),  $V_{\max} = 337.5 \pm 13.0$  nA and  $K_M = 634.5 \pm 60.5$  mM. The linear region slope is between 0 and 500  $\mu\text{M}$ , presenting a slope of  $0.336 \pm 0.0076$  nA  $\mu\text{M}^{-1}$  with  $R^2 = 0.994$  ( $n = 4$ ). Behaviour of p-MA towards interfering molecules was observed carrying out two distinct calibrations for AA and DA. AA rejection was evaluated calculating  $\Delta I$  AA: which is the difference between the current produced by injection of 1 mM AA and the current produced by 0.5 mM.  $\Delta I$  was determined also for DA, in that case the difference was calculated between the current generated by injection of 100  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$  DA. Finally  $\Delta I$  values are: 1.79 nA for  $\Delta I$  AA and 1 nA  $\Delta I$  DA.

## Conclusions

Although mechanisms governing permselectivity are not clear, low potential studies led to an improved permselectivity for each phenol studied. Although *in vitro* calibration underlined significant differences in permselective films, SEM microimages showed a quite similar compact film for all phenols. The reasons why lower polymerization potentials can help monomer forming a highly permselective film might be due to their structural and physico-chemical properties, a lowered polymerization rate and avoiding overoxidation. Magnolol polymerized by CPA at 170 mV vs Ag/AgCl showed a AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% not significantly different ( $p < 0.05$ ) and a DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% even 36 times better than PPD. Aging studies confirm - for the

first time in the case of p-iEU - that p-MA and p-iEU can be regarded as effective and green alternatives to PPD film in AA or DA rejection.

## REFERENCES:

Atsumi, T., Fujisawa, S. and Tonosaki, K. (2005) A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenolo with various concentrations and oxidant conditions. *Toxicol in vitro* 19, 1025-1033.

Bertrand, F., Basketter, D.A., Roberts, D.W. and Lepoittevin, J.P. (1997) Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving *ortho*-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol* 10, 335-343.

Calia, G., Monti, P., Marceddu, S., Dettori, M.A., Fabbri, D., Jaoua, S., O'Neill, R.D., Serra, P.A., Delogu, G. and Migheli, Q. (2015) Electropolymerized phenol derivatives as permselective polymers for biosensor applications. *Analyst* 140, 3607-15.

Ciszewski, A. and Milczarek, G. (2001) Preparation and general properties of chemically modified electrodes based on electrosynthesized thin polymeric films derived from eugenol. *Electroanalysis* 13, 860-867.

Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y. and Sakagami, H. (2002) Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177, 39-54.

Killoran, S.J. and O'Neill, R.D. (2008) Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochim Acta* 53, 7303-7312.

Milczarek, G. and Ciszewski, A. (2003) Permselective properties of electropolymerized guaiacol derivatives. *Electroanalysis* 15, 529-532.

Rothwell, S.A., Killoran, S.J. and O'Neill, R.D. (2010) Enzyme immobilization strategies and electropolymerization conditions to control sensitivity and selectivity parameters of a polymer-enzyme composite glucose biosensor. *Sensors* 10, 6439-6462.

Rothwell, S.A., Killoran, S.J., Neville, E.M., Crotty, A.M. and O'Neill, R.D. (2008) Poly(*o*-phenylenediamine) electrosynthesized in the absence of added background

electrolyte provides a new permselectivity benchmark for biosensor applications. *Electrochem Commun* 10, 1078–1081.

Rothwell, S.A., McMahon C.P. and O'Neill, R.D. (2010) Effects of polymerization potential on the permselectivity of poly(*o*-phenylenediamine) coatings deposited on Pt-Ir electrodes for biosensor applications. *Electrochim Acta* 55, 1051-1060.

Toniolo, R., Dossi, N., Pizzariello, A., Susmel, S. and Bontempelli, G. (2011) Simultaneous detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide by flow-injection analysis with a thin layer dual-electrode detector. *Electroanalysis* 23, 628-636.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL:

### IMPROVING PERMSELECTIVITY OF ELECTROPOLYMERIZED NATURAL PHENOLS

#### CHOOSING POLYMERIZATION POTENTIAL

Patrizia Monti,<sup>a,c</sup> Giammario Calia,<sup>a,b</sup> Salvatore Marceddu,<sup>d</sup> Maria A. Dettori,<sup>c</sup> Davide Fabbri,<sup>c</sup> Samir Jaoua,<sup>e</sup> Robert D. O'Neill,<sup>f</sup> Quirico Migheli<sup>a</sup>, Giovanna Delogu,<sup>c</sup> and Pier A. Serra,<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Agraria and Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.

<sup>b</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/b, I-07100 Sassari, Italy.

<sup>c</sup> Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.

<sup>d</sup> Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy.

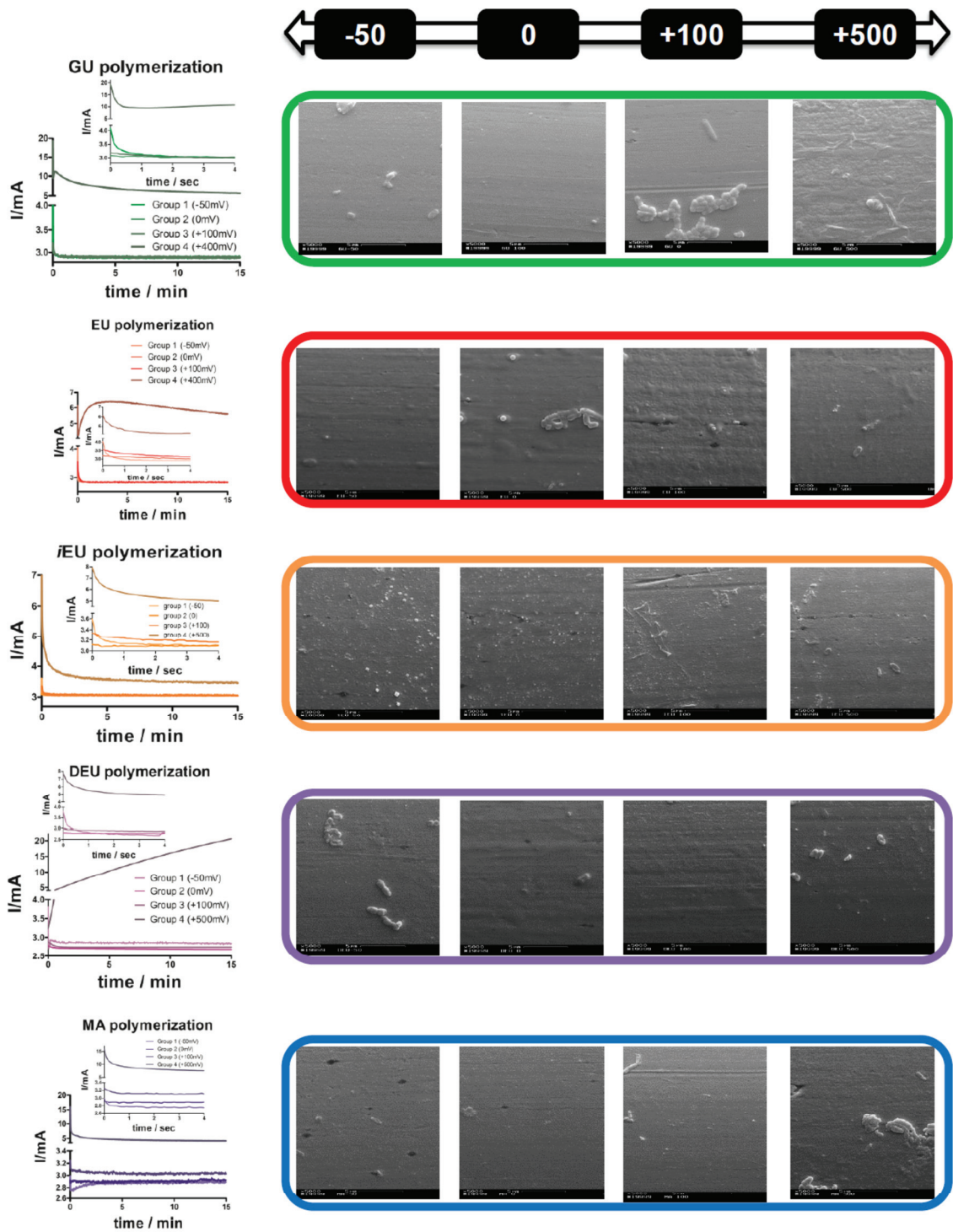
<sup>e</sup> Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.

<sup>f</sup> UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

\*Corresponding author: E-mail Address: [paserra@uniss.it](mailto:paserra@uniss.it)

In the electronic supplementary information there are: time course of polymerization currents during CPA polymerizations at low potentials and day 15 scanning electron microphotographies (SEM) at 5000 magnification of electrodeposited films onto Pt-Ir for poly-guaiacol (p-GU), poly-eugenol (p-EU), poly-*isoeugenol* (p-*i*EU), poly-dehydrodieugenol (p-DEU) and poly-magnolol (p-MA); permselectivities *versus* ascorbic acid and dopamine at day 1 and day 14 with statistical analysis; correlation analysis for permeabilities and permselectivities with plateau and total area; permselectivities (S%) and permeabilities P(%) at day 14.





Supplementary material Figure 1 – time course of currents during electropolymerizations and scanning microphotographies at day 14.

Supplementary material table 1 part A - (=) no significative difference between mean (unpaired t test); significative increase ↑ or decrease ↓ of the means; unpaired t test within day 1 group was calculated between values at 0 polymerization potential (Ref) versus other polymerization potential; unpaired t test was conducted between day 1 and day 14 values.

		AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)									
		p-GU		p-EU		p-iEU		p-DEU		p-MA	
-50	Day 1	0.80 ± 0.10	=	2.41 ± 0.44	↓	0.92 ± 0.92	↓	0.38 ± 0.04	↓	0.13 ± 0.02	↓
	Day 14	0.81 ± 0.18	=	0.76 ± 0.30	↓	0.056 ± 0.014	↓	1.16 ± 0.03	↑	0.07 ± 0.01	↓
0	Day 1	0.75 ± 0.12	Ref	6.93 ± 0.65	Ref	1.33 ± 0.08	Ref	2.67 ± 0.61	Ref	0.49 ± 0.02	Ref
	Day 14	0.85 ± 0.18	=	3.60 ± 1.03	↓	1.67 ± 0.44	=	1.91 ± 0.03	=	0.24 ± 0.02	↓
+100	Day 1	0.72 ± 0.06	=	17.92 ± ± 1.32	↑	1.47 ± 0.11	=	0.55 ± 0.09	↓	0.58 ± 0.01	↑
	Day 14	0.85 ± 0.22	=	5.62 ± 1.96	↓	2.04 ± 0.34	=	2.84 ± 0.06	↑	0.30 ± 0.03	↓
+500	Day 1	1.17 ± 0.02	↑	0.74 ± 0.22	↓	0.86 ± 0.07	↓	0.88 ± 0.08	↓	0.42 ± 0.02	↓
	Day 14	1.19 ± 0.22	=	1.03 ± 0.43	=	1.00 ± 0.27	=	3.88 ± 0.05	↓	0.25 ± 0.02	↓

Supplementary material table 1 part B - (=) no significative difference between mean (unpaired t test); significative increase ↑ or decrease ↓ of the means; unpaired t test within day 1 group was calculated between values at 0 polymerization potential (Ref) versus other polymerization potential; unpaired t test was conducted between day 1 and day 14 values.

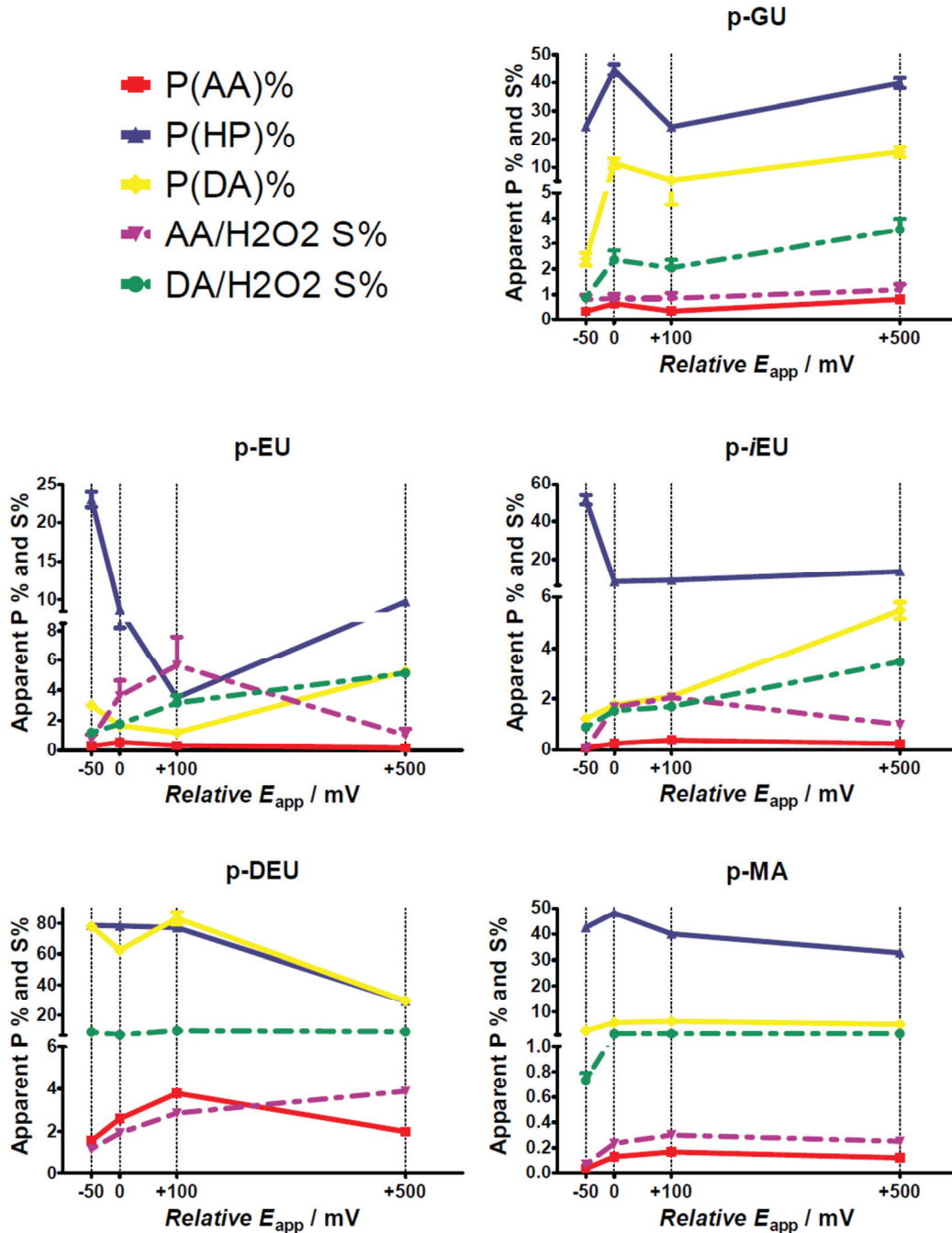
		DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (S%)									
		p-GU		p-EU		p-iEU		p-DEU		p-MA	
-50	Day 1	0.63 ± 0.07	=	2.00 ± 0.33	↑	0.90 ± 0.21	↓	0.45 ± 0.06	↓	0.27 ± 0.01	↓
	Day 14	0.89 ± 0.10	=	1.19 ± 0.09	=	0.90 ± 0.07	=	9.04 ± 0.05	↑	0.73 ± 0.057	↑
0	Day 1	1.17 ± 0.08	Ref	2.89 ± 0.36	Ref	1.24 ± 0.23	Ref	1.95 ± 0.29	Ref	0.76 ± 0.01	Ref
	Day 14	2.35 ± 0.37	↑	1.76 ± 0.14	↓	1.54 ± 0.17	=	7.24 ± 0.03	↑	1.40 ± 0.10	↑
+100	Day 1	0.94 ± 0.05	=	7.27 ± 1.77	↑	1.79 ± 0.05	=	1.04 ± 0.17	↑	0.83 ± 0.01	↑
	Day 14	2.04 ± 0.31	↑	3.15 ± 0.47	=	1.70 ± 0.11	=	9.82 ± 0.05	↑	1.46 ± 0.10	↑
+500	Day 1	8.53 ± 0.66	↑	3.51 ± 0.41	↓	1.64 ± 0.34	↓	9.87 ± 0.95	↓	1.21 ± 0.05	↓
	Day 14	3.55 ± 0.43	↑	5.11 ± 0.17	↑	3.44 ± 0.09	↑	9.15 ± 0.02	=	1.50 ± 0.13	=

Supplementary material table 2 – Correlation of permselectivities values at day 1 for natural phenols and plateau current and total area of polymerization. Pearson's *r* and *p* values are reported.

Correlation: Plateau vs permselectivities and permeabilities (Pearson's <i>r</i> and <i>p</i> )										
	p-GU		p-EU		p- <i>i</i> EU		p-DEU		p-MA	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	<b>0.99</b>	<b>0.012</b>	0.54	0.46	0.63	0.37	-0.16	0.84	0.15	0.85
P(AA)%	0.90	0.095	<b>0.97</b>	<b>0.03</b>	0.16	0.84	0.37	0.63	-0.11	0.89
P(HP)%	0.45	0.553	0.62	0.38	0.06	0.94	0.52	0.48	-0.93	0.07
DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	<b>0.998</b>	<b>0.002</b>	0.11	0.89	0.41	0.59	<b>0.99</b>	<b>0.01</b>	0.81	0.19
P(DA)%	<b>0.996</b>	<b>0.004</b>	0.92	0.08	<b>0.98</b>	<b>0.02</b>	<b>0.998</b>	<b>0.001</b>	0.50	0.50

Correlation: Total Area vs permselectivities and permeabilities (Pearson's <i>r</i> and <i>p</i> )										
	p-GU		p-EU		p- <i>i</i> EU		p-DEU		p-MA	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
AA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	<b>0.99</b>	<b>0.01</b>	-0.54	0.46	-0.51	0.49	-0.16	0.84	0.13	0,87
P(AA)%	0.91	0.10	<b>-0.97</b>	<b>0.03</b>	-0.31	0.69	0.37	0.64	-0.13	0.88
P(HP)%	0.45	0.55	0.62	0.38	-0.10	0.90	0.52	0.48	-0.94	0.06
DA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S%	<b>0.998</b>	<b>0.002</b>	-0.11	0.89	0.52	0.48	<b>0.99</b>	<b>0.01</b>	0.81	0.20
P(DA)%	<b>0.996</b>	<b>0.004</b>	0.92	0.08	<b>0.99</b>	<b>0.008</b>	<b>0.998</b>	<b>0.001</b>	0.49	0.51

**Apparent permeabilities (P%) and permselectivities (S%) on DAY-14**



Supplementary material Figure 2 – Permeabilities and permselectivities at Day 14

**CAPITOLO  
IV**

**Modifiche della  $\beta$ -ciclodestrina  
in condizioni e con reagenti sostenibili  
per applicazioni nella biosensoristica**



## SINTESI

La costruzione di un biosensore enzimatico comporta la presenza di altre molecole utili ad immobilizzare efficacemente l'enzima sul trasduttore e per stabilizzarne l'attività catalitica. Attualmente si impiegano numerosi stabilizzatori enzimatici e svariati metodi per l'ancoraggio. A tale proposito è stata selezionata la  $\beta$ -ciclodestrina ( $\beta$ CD), un macrociclo eptaamiloide derivato dall'amido possiede gruppi ossidrilici che hanno proprietà stabilizzanti e una cavità affine a molecole idrofobiche quali i residui amminoacidici dell'enzima. Inoltre è ottenibile a basso costo ad alto grado di purezza e dimostra una bassa tossicità. Sfortunatamente le ciclodestrine, di per sé, non possiedono gruppi chimici adatti per il graffaggio sulla superficie del trasduttore. Come agenti crosslinkanti sono stati selezionati il 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (BTCA), glicerol diglicidil etero (GDGE) e il dimetilcarbonato (DMC); tutti questi reagenti e le preparazioni sono state svolte nel rispetto delle linee guida della chimica sostenibile. I prodotti delle reazioni sono stati caratterizzati tramite spettroscopia NMR. Alternativamente, è possibile ottenere complessi di inclusione di  $\beta$ CD con molecole idrofobiche. Nel complesso di inclusione la molecola organica instaura forti interazioni con la cavità della  $\beta$ CD (biomatrice) senza alterare le caratteristiche dell'*host* ( $\beta$ CD) e del *guest* (molecola organica). L'inclusione determina una maggiore solubilità in acqua del guest e sembra non alterare in maniera significativa l'attività elettrochimica. Con lo scopo di poter immobilizzare la  $\beta$ CD su di un biosensore durante la elettropolimerizzazione sono state messe a punto delle preparazioni per l'inclusione dei composti fenolici naturali eugenolo, guaiacolo e magnololo.

### Reazioni $\beta$ CD-BTCA

In letteratura (Medronho *et al.*, 2013) il BTCA è in grado di esterificare l'OH primario presente sul C6 della  $\beta$ CD attraverso la formazione della sua anidride in presenza di un catalizzatore. L'anidride del BTCA è stata qui preventivamente ottenuta per riscaldamento in stufa. Sorprendentemente, sotto le condizioni sperimentali utilizzate, gli spettri NMR delle reazioni tra l'anidride del BTCA e la  $\beta$ CD non mostrano segnali di una avvenuta esterificazione. Gli spettri NMR mostrano un chiaro spostamento degli H1, H5 e

H6 della  $\beta$ CD dovuta alla formazione di un complesso stabile col BTCA. Evidenze sperimentali hanno accertato che l'anidride succinica, una molecola strutturalmente molto simile all'anidride del BTCA, ha una buona affinità per la  $\beta$ CD e che, a contatto col microambiente la cavità può catalizzare l'apertura dell'anello convertendo l'anidride nell'acido succino. I dati ottenuti concordano con l'ipotesi che BTCA e anidride succinica interagiscano con la  $\beta$ CD in maniera molto simile formando il complesso. Il complesso è stabilizzato da interazioni mediate dalle molecole d'acqua associate al macrociclo e dimostra interazioni sia all'interno della cavità, dove verosimilmente trovano posto i carboni metilenici del BTCA, che sul margine esterno, dove i gruppi carbossili dell'acido possono interagire con gli alcoli primari del macrociclo. Il complesso è stato ottenuto con diverse preparazioni e con ottime rese, risultando stabile e solubile in acqua.

### **Reazioni $\beta$ CD-GDGE e $\beta$ CD-DMC**

Le analisi suggeriscono una interazione tra la cavità della  $\beta$ CD e il GDGE, ma non ci sono evidenze di un legame etereo tra il gruppo C6OH della  $\beta$ CD e l'anello epossidico. Condizioni sperimentali più dure come un aumento degli equivalenti di NaOH e l'aumento della temperatura non hanno prodotto risultato.

Il GDGE si è però dimostrato in grado di reagire il gruppo fenolico-OH del creosolo, in condizioni basiche, del tutto simili a quelle utilizzate per la  $\beta$ CD. Gli spettri evidenziano la presenza di due diversi prodotti derivati dal creosolo e una significativa variazione dei segnali degli epossidi del GDGE epossido che suggeriscono l'apertura dell'anello. La mancanza di reattività della  $\beta$ CD può essere dovuta a le molecole d'acqua strettamente associate al bordo della  $\beta$ CD che possono aver reso il C6OH meno incline nell'attaccare l'anello epossidico.

Il dimetilcarbonato è un reagent perfettamente sostenibile, in grado di reagire con alcoli dando luogo alla formazione di un estere. Nonostante la grande varietà delle condizioni sperimentali gli spettri al  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  delle reazioni tra  $\beta$ CD e DMC hanno riportato solo i segnali del prodotto di partenza.

### **Reazioni $\beta$ CD e composti fenolici**

Guaiacolo e eugenolo sono stati inclusi nella  $\beta$ CD secondo una reazione di coprecipitazione con un rapporto iniziale host: guest pari a 1: 1.5. Il complesso  $\beta$ CD-

eugenolo, ottenuto in resa dell'85%, è stato caratterizzato tramite spettroscopia NMR; le analisi in D<sub>2</sub>O mostrano una modificazione del segnale del H5 della  $\beta$ CD e la presenza dei segnali ben risolti dell'eugenolo in soluzione; questa evidenza sperimentale supporta la formazione di un complesso di inclusione dal momento che questo composto è insolubile in acqua, quindi non determinabile attraverso spettri NMR in D<sub>2</sub>O. Ulteriori analisi in DMSO-*d*<sub>6</sub> hanno permesso di calcolare il rapporto host:guest, pari a 1:1.7  $\beta$ CD-eugenolo. Anche la formazione del complesso  $\beta$ CD-guaiacolo è stata confermata tramite NMR con un rapporto *host-guest* di 1:1.5 e una resa del 47%. Analisi NMR ripetute a distanza hanno confermato una stabilità nel tempo per almeno 2 settimane. Differenti condizioni di complessazione, tutte sostenibili, compresa la tecnologia alle microonde, non hanno avuto successo nell'ottenimento di un complesso d'inclusione  $\beta$ CD-magnololo.

# **β-CYCLODEXTRIN MODIFICATION WITH SUSTAINABLE REAGENTS AND CONDITIONS FOR BIOSENSOR APPLICATIONS**

PATRIZIA MONTI,<sup>a,c</sup> GIAMMARIO CALIA,<sup>b</sup> DAVIDE FABBRI,<sup>c</sup> MARIA ANTONIETTA DETTORI,<sup>c</sup> QUIRICO MIGHELI,<sup>a</sup> PIER ANDREA SERRA,<sup>b</sup> AND GIOVANNA DELOGU,<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100, Sassari, Italy*

<sup>b</sup>*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro, I-07100, Sassari Italy*

<sup>c</sup>*Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy*

## **ABSTRACT**

**β-cyclodextrin (β-CD), a natural, non-toxic cycloheptaamilose macrocycle, is currently used in biosensor preparation because of the low cost, low toxicity and inclusion properties of its cavity. Hydrophobic molecules as drugs, proteins and enzymes can positively interact with βCD cavity or hydroxylic group resulting in an immobilizing/stabilizing host-guest effect. Efficient anchoring of βCD on biosensor can be obtained enclosing the macrocycle in a network. The network can be obtained through covalent binding of βCD with crosslinking agent or enhancing host-guest interaction forces. βCD as itself bears several OH group suitable for esterification. Poly-carboxylic acids (PCAs), bisepoxides and dimethylcarbonate are currently used as crosslinkers agents.**

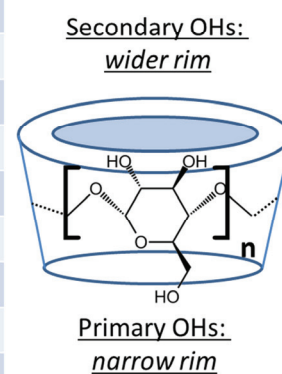
**Aiming at preparing new biosensors with reduced toxicity and improved permselectivity, βCD was treated with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid, glycerol diglycidyl ether and dimethyl carbonate. The selected compounds are greener reagents than epichlorohydrin, and preparations were conducted according to guidelines of Sustainable Chemistry. β-CD forms stable inclusion complexes, helping water solubilization of hydrophobic compounds. Natural phenols as guaiacol, eugenol and magnolol, are electropolymerized on biosensor surface and have a suitable size for βCD cavity. Eugenol and guaiacol βCD inclusion complex are obtained here in satisfactory yield with a coprecipitation preparation.**

**KEY WORDS: crosslinkers; sustainable chemistry; beta-cyclodextrin; electropolymerization.**

## INTRODUCTION

Cyclodextrines (CDs) are macrocyclic oligosugars with a variable size and number of glucosidic units linker by  $\alpha(1-4)$  glycosidic bonds.  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  CDS are composed by six, seven and eight units, respectively, and are commercially available in a high purity grade by a biotechnological process involving enzymatic cleavage of starch. The ring disposition of glucopyranosyl units delimitates a conical hollow cavity that can accommodate hydrophobic molecules (Szejtli, 1998; Pinho *et al.*, 2014). Cavity entrances are delimited by hydroxyl groups: at the narrower rim there are primary hydroxyls from position 6 of the glucopyranose ring, whose free rotation reduces the effective diameter of the cavity (see Scheme 1). At the wider entrance there are secondary hydroxyls, less prone to chemical transformation. Thus molecules often enter from the wider ring, but also a molecular interaction with hydroxyls from the narrow rim is possible (Castro and Barbiric, 2002).

	$\alpha$ CD	$\beta$ CD	$\gamma$ CD
Glucopyranose units number	6	7	8
Water solubility (g/100 mL at 25°C)	14.5	1.85	23.2
Cavity volume (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
External Diameter (Å)	14.6	15.4	17.5
Cavity Diameter (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Molecular weight (g/mol)	972	1135	1297
LD <sub>50</sub> oral in rat (mg/kg)	>10000	>5000	>> 8000
LD <sub>50</sub> intra vena in rat (mg/kg)	500-750	450-790	4000
European name as food additives	E-457	E-459	E-458



*Scheme 1 – Chemical and structural features of CDs; the side figure is a schematic representation of a CD ring with glucopyranosyl unit position, wider and narrow rims highlighted.*

The inclusive properties of CDs together with their very low toxicity and low cost contribute to their employment in pharmaceutical, cosmetic, agriculture and food fields (López-Nicolás *et al.*, 2014; Del Valle, 2004). CDs shared the same height (7.9 Å) due to glucopyranosyl unit but are characterized by diverse cavity dimensions and water

solubilities due to number of residues (Scheme 1).  $\beta$ -CD has been preferred in this work for its lower cost and appropriate dimensions of its cavity. Furthermore  $\beta$ CD have been used in biosensors for its immobilizer/stabilizer properties for proteins/enzymes (Díez *et al.*, 2013; Boscolo *et al.*, 2010; Franzoi *et al.*, 2010; Brondani *et al.*, 2009). In order to enhance its practical use  $\beta$ -CD can be included into a polymer matrix (Crini, 2005). Epichlorohydrin (EPC; Figure 1) is extensively used to obtain polymers containing  $\beta$ -CD. EPC can easily crosslink in alkaline media (Renard *et al.*, 1997), but it is a harmful compound for humans (Crini, 2005). Others cross-linking agents, less dangerous, are commonly used, including bis-epoxides (i.e. ethylene glycol, bis-epoxy(propyl) ether (Cserhati, 1992), butylene glycol bis(epoxypropyl)ether (Cserhati and Forgacs, 1994) and polycarboxylic acids (PCAs).

PCAs are frequently used as crosslinkers because their corresponding anhydrides can easily undergo to nucleophile attack by hydroxyl (Fukukawa and Ueda, 2008). The PCA 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (BTCA) has been characterized by FTIR and FT-Raman spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) (Yang *et al.*, 2002). BTCA is a green finishing agents for cotton grafting, commonly used with sodium hypophosphite ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ) as catalyst (Voncina and Majcen Le Marechal, 2005). The influence of different catalysts, stoichiometry and temperature over grafting were studied (Medronho *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2005). Grafting reaction mechanism involved a BTCA anhydride intermediate that can promote transesterification in polymers bearing ester groups (e.g. polyesters).  $\beta$ CD is currently esterified by BTCA anhydride in presence of pyridine (Kono and Nakamura, 2013) giving place to an hydrogel.

Also other natural PCA, like citric acid, and succinic anhydride (Figure 1) can be used as crosslinking agents for  $\beta$ CD and polyamide fibers (Girek and Ciesielski, 2011; El Ghouli *et al.*, 2007; Girek, 2005).

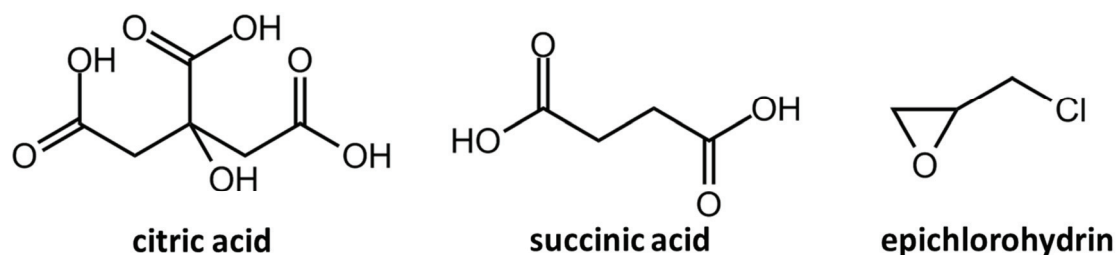


Figure 1 – chemical structure of PCAs citric acid and succinic acid and epoxide epichlorohydrin.

An alternative can also be found in dimethylcarbonate (DMC), a true green reagent, nontoxic and biodegradable (Tundo and Selva, 2002). DMC can react with alcohols in the presence of  $K_2CO_3$  as catalyst, giving transesterification products, preferentially on primary alcohols by stabilization of corresponding anion (Tundo *et al.*, 1988).

Further bifunctional linkers are based on epoxide reactivity (diglycidyl ethers; DGE); DGE were used to crosslink  $\beta$ CD (Komiyama and Hirai, 1987) and hydroxypropyl  $\beta$ CD (Rodriguez-Tenreiro *et al.*, 2006) under mild conditions. The hydroxyl ions ( $OH^-$ ), present in the basic solution, catalyze the ring opening of epoxide allowing reaction with  $\beta$ CD hydroxyl group.

Also activated  $\beta$ CD, as triazine- $\beta$ CD, have intrinsic group suitable for grafting (Shown and Murthy, 2009).

In this work BTCA, GDGE and DMC were chosen as green crosslinker for  $\beta$ CD modification (Figure 2) under sustainable conditions.

As an alternative to chemical bond formation, an oligomeric network can be obtained exploiting including properties of  $\beta$ CD (da Silva *et al.*, 2013).

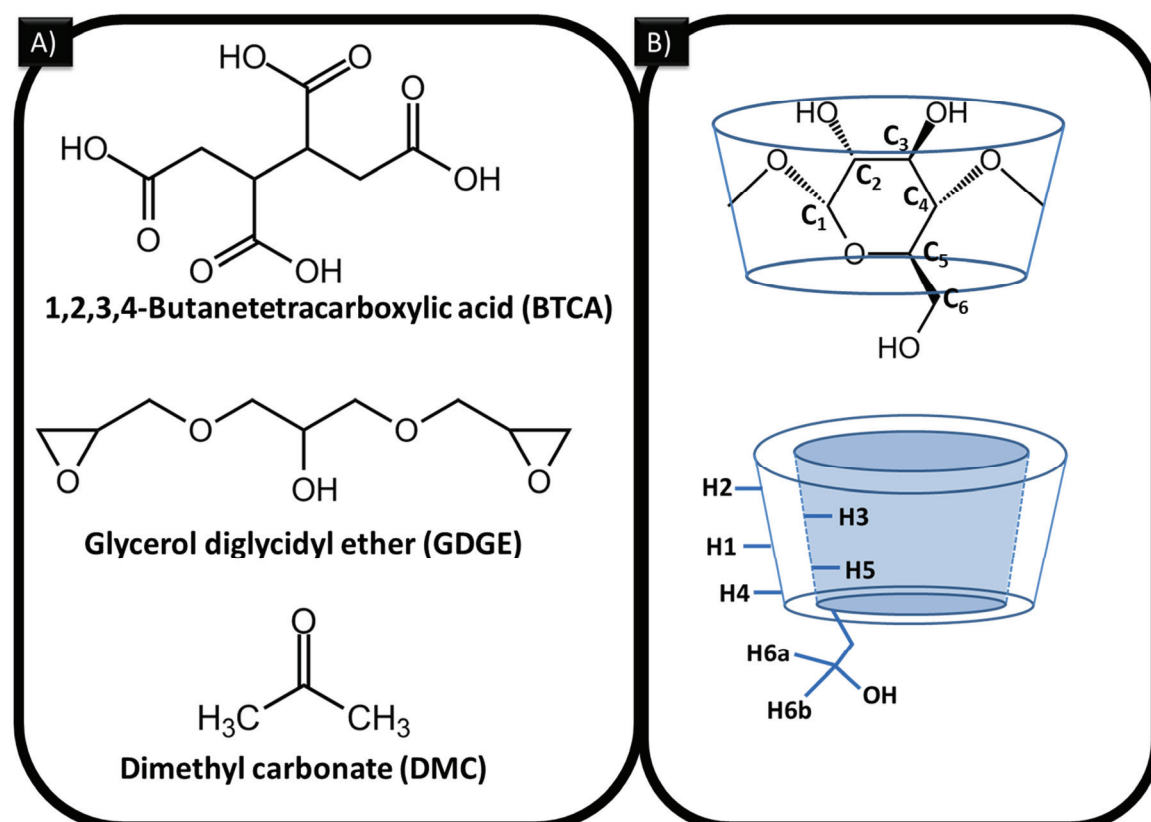


Figure 2 – part A) crosslinker used in the present work; part B)  $\beta$ CD schemes; upper: number of carbon atom of a glucopyransyl unit, below: proton NMR description.



$\beta$ CD can be included in the building up of a biosensor as permselective matrix during the electropolymerization step. As reported in the previous chapter, eugenol can electropolymerize forming a permselective film, that is useful in biosensor design targeted to avoid interferences. There is experimental evidence that inclusion of eugenol into  $\beta$ CD cavity only slightly changes the oxidative capacity (Garg *et al.*, 2010). This suggests that an electropolymerization starting from a  $\beta$ CD-eugenol inclusion complex may be achieved. The advantage of eugenol inclusion relies on incorporation of  $\beta$ CD in a single step during polymerization. Additionally, inclusion of eugenol in  $\beta$ CD can improve solubility of this lipophilic phenol in water, opening the possibility to perform an electropolymerization in aqueous solution. Since other natural phenols as guaiacol (Milczarek and Ciszewski, 2003) and magnolol (Calia *et al.*, 2015) are useful monomers for permselective film, in this work these naturally occurring compounds were used as a guest for  $\beta$ CD (Figure 3).

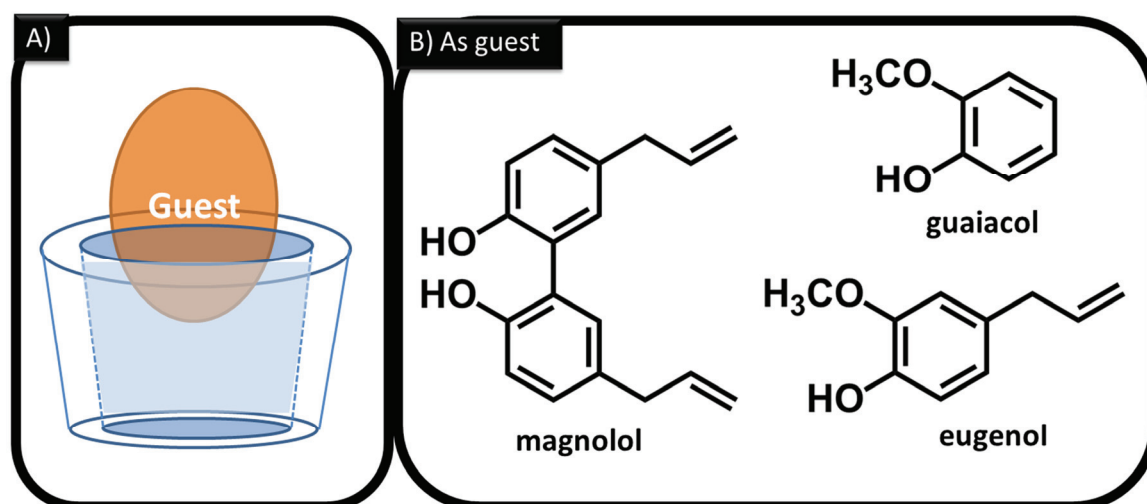


Figure 3 – part A) scheme of a  $\beta$ CD inclusion complex; part B) electropolymerizable monomers used as guest molecules.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.**  $\beta$ CD (CAVAMAX7 PHARMA) was obtained from Wacker Chemie Italia (Peschiera Borromeo, Italy). 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (BTCA), cyanamide (CYA) were from Alfa Aesar. HCl, NaOH, sodium hypophosphite ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ),

ammoniumdihydrogen phosphate (ADHF), dimethylcarbonate (DMC), carvacrol, eugenol and guaiacol were from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Magnolol was purchased from Chemos GmbH (Regenstauf, Germany). Microwave reactions were performed in a Discover SP apparatus from CEM Co. (North Carolina, USA).

BTCA anhydride (BTCAa) was obtained by oven drying BTCA (1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid) at 135 °C for 3 weeks (Figure 4); two possible structures can be obtained from BTCA, reported in Figure 4, although the five member ring structure is favoured (Voncina et al., 2005).

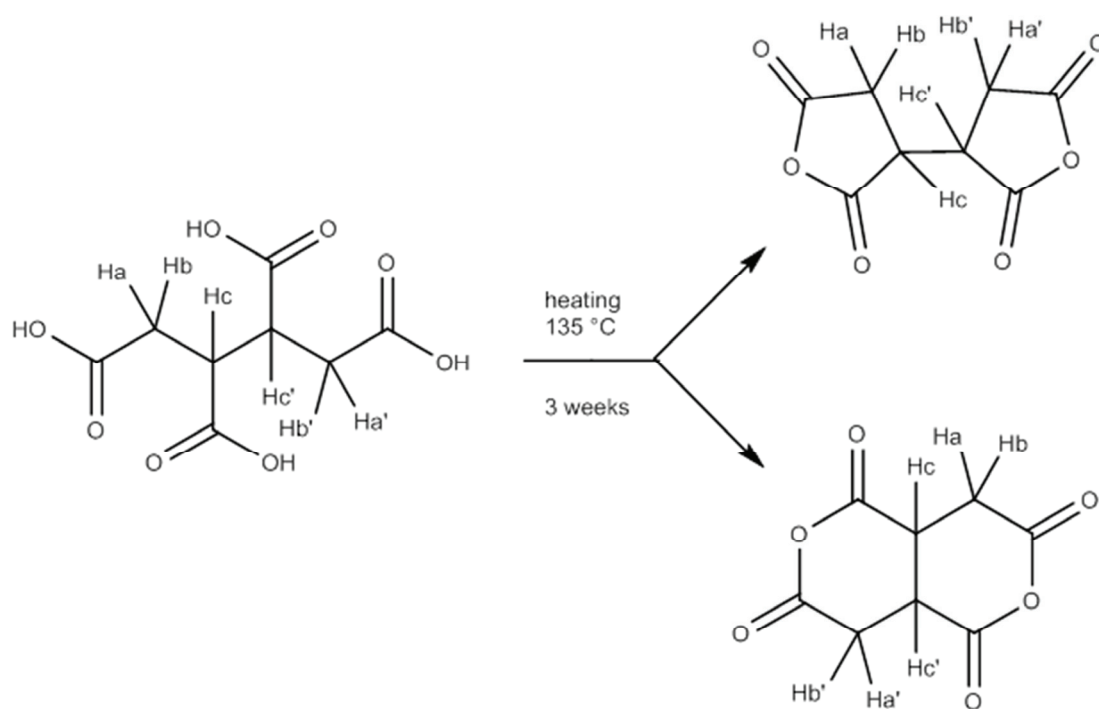


Figure 4 – The two possible anhydrides that can be obtained by oven heating BTCA acid; also proton assignment for NMR description is shown.

**NMR measurements.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $\beta\text{CD}$ ,  $\beta\text{CD}$ -complex, guests, were recorded with a Varian spectrometer Mercury Plus (Varian Inc., Palo Alto, CA) at 399.93 and 100.57 MHz, respectively. Deuterium water ( $\text{D}_2\text{O}$ ), deuterated dimethyl sulfoxide ( $\text{DMSO-}d_6$ ) and deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) were used as solvent according to the solubility product. Chemical shifts are given in parts per million ( $\delta$ ); multiplicities are indicated by s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet of doublet), or series of m (series of multiplets). Coupling constant (J) are

expressed in Herz (Hz).  $^1\text{H}$  chemical shifts were referred to  $\text{H}_2\text{O}$  signal and  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with a 5 mm tube without degassing.

### **NMR description of reagents and guests:**

$\beta\text{CD}$ :  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.46 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.53 (dd,  $J=4.0$ , 10.0 Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.74 (m, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.76 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.84 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 4.95 (d,  $J=4.0$ , 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{DMSO-D}_6$ ,  $\delta$ ) 3.30-3.44 (series of m, 14H,  $\beta\text{CD-H}_2\text{H}_4$ ), 3.55-3.74 (series of m, 28H,  $\beta\text{CD-H}_3\text{H}_5\text{H}_6$ ), 4.53 (t,  $J=6.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-OH}$ ), 4.86 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 5.72 (d,  $J=1.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-OH}$ ), 5.80 (d,  $J=7.2$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-OH}$ ).

BTCA:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.46 (dd,  $J=17.2$ , 4.0 Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{a-a'}}$ ), 2.52-2.64 (series of m, 2H,  $\text{H}_{\text{b-b'}}$ ), 3.13 (series of m, 2H,  $\text{H}_{\text{c-c'}}$ ).

BTCA anhydride:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.96-2.80 (series of m, 4H,  $\text{H}_{\text{a-a'}}$ ,  $\text{H}_{\text{b-b'}}$ ), 3.32 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{c-c'}}$ ).

GDGE:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 2.50-2.62 (m, 2H) 2.68-2.80 (m, 2H) 3.02-3.16 (m, 2H) 3.26-3.98 (series of m, 14H). GDGE:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.60-2.70 (m, 2H) 2.80-2.88 (m, 2H) 3.26-4.00 (series of m, 14H).

Creosol:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) 3.87 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ) 6.68 (broad d,  $J=8.8$  Hz H, aromatic) 6.69 (broad s, H, aromatic) 6.83 (broad d,  $J=7.6$  Hz H, aromatic).

Eugenol:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{DMSO-D}_6$ ,  $\delta$ ) 3.23 (d,  $J=6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.72 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.96-5.09 (series of m, 2H,  $=\text{CH}_2$ ), 5.91 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{}$ ), 6.54 (dd,  $J=2.00$ , 8.0 Hz, 1H, aromatic), 6.69 (dd,  $J=2.00$ , 8.0 Hz, 2H, aromatic).

Guaiacol:  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.68 (s, 3H, guaiacol,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.71-6.80 (series of m, 3H, guaiacol aromatic), 6.87 (m, 1H, guaiacol aromatic).

### **$\beta\text{CD}$ BTCA reactions:**

**Preparation of PM21 (via rotavapor).** Two equivalents (1.76 mmol) of  $\beta\text{CD}$ , 4 equivalents of  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  (2.69 mmol) and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  as catalyst (0.76 mmol) were dissolved in 25 mL of distilled water at  $90^\circ\text{C}$ . Then three equivalents (2.69 mmol) of BTCA anhydride were added. Water was evaporated under vacuum (Rotavapor) then reaction proceeded for 15 minutes at  $60^\circ\text{C}$ . The white solid powder obtained was washed

with 2-propanol in order to allow the inclusion complex to precipitate as a white solid (80 % yield; host:guest ratio  $\beta$ CD-BTCA 2:3).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.34-2.44 (series of d, 2H,  $\text{H}_{\text{a-a}}$ , BTCA), 2.56-2.70 (series of d, 2H,  $\text{H}_{\text{b-b}}$ , BTCA), 3.10 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{c-c}}$ , BTCA), 3.46 (t,  $J=9.2$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_4$ ), 3.47 (dd,  $J=3.6, 9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_2$ ), 3.65-3.75 (series of m, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_5$ ), 3.70 (s, 14H,  $\beta$ CD- $\text{H}_6$ ), 3.82 (t,  $J=9.2$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_3$ ), 4.91 (d,  $J=3.6$ , 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_1$ ).

**Preparation of PM27 (via water distillation).** In 12.5 mL of distilled water at  $90^\circ\text{C}$  were dissolved two equivalents (0.88 mmol) of  $\beta$ CD, 8 equivalents of  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  (4.2 mmol), 7 equivalents of BTCA anhydride (3.08 mmol) and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  as catalyst (0.94 mmol). Water is distilled away with Claisen apparatus, then reaction took place at  $105^\circ\text{C}$  for 50 minutes under vacuum. At the end a light beige gel-like product was obtained with a host:guest ratio of  $\beta$ CD-BTCA 2:3 (78 % yield).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.45-2.50 (series of m, 2H,  $\text{H}_{\text{a-a}}$ , BTCA), 2.58-2.71 (series of m, 2H,  $\text{H}_{\text{b-b}}$ , BTCA), 3.10 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{c-c}}$ , BTCA), 3.48 (t,  $J=6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_4$ ), 3.49 (dd,  $J=2.4, 6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_2$ ), 3.64-3.78 (series of m, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_5$ ), 3.70 (s, 14H,  $\beta$ CD- $\text{H}_6$ ), 3.83 (t,  $J=6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_3$ ), 4.93 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_1$ ).

**Preparation of PM42 (via  $\beta$ CD anhydrification).** Two equivalents (0.88 mmol) of  $\beta$ CD, previously dried at  $45^\circ\text{C}$  for six days under vacuum, 2 equivalents of  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  (1.6 mmol), 3 equivalents of BTCA anhydride (2.64 mmol) and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  as catalyst (0.38 mmol) were pulverized into a mortar and transferred into a round-bottom flask at  $155^\circ\text{C}$  under vacuum over-night (15 h). Then powder was washed with cold water and the complex (host:guest ratio  $\beta$ CD-BTCA 2:3) precipitate from acetone as white solid (82 % yield).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.42 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{a-a}}$ , BTCA), 2.64 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{b-b}}$ , BTCA), 2.80 (d, 2H,  $J=3.6$  Hz, BTCA anhydride), 2.99 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{a-a}}$ ,  $\text{H}_{\text{b-b}}$ , BTCA anhydride), 3.14 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{c-c}}$ , BTCA), 3.48 (t,  $J=6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_4$ ), 3.49 (dd,  $J=2.4, 6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_2$ ), 3.64-3.76 (series of m, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_5$ ), 3.69 (s, 14H,  $\beta$ CD- $\text{H}_6$ ), 3.83 (t,  $J=6.4$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_3$ ), 4.84 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD- $\text{H}_1$ ).

**Preparation of PM43 (via cyanamide and BTCA anhydride).** One equivalent (1.76 mmol) of  $\beta$ CD, 16.7 equivalents of CYA (29.49 mmol) and ADHF as catalyst (0.094 mmol) were added to 3.6 equivalents of BTCA anhydride. Then reagents were placed at  $120^\circ\text{C}$  under vacuum for 20 minutes. Acetone washing removed any unreacted reagents and product precipitated as a white solid (yield 86%).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.34-

2.48 (series of m, 2H, H<sub>a-a'</sub>, BTCA), 2.56-2.72 (series of m, 2H, H<sub>b-b'</sub>, BTCA), 3.20-3.18 (m, 2H, H<sub>c-c'</sub>, BTCA), 3.47 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>4</sub>), 3.49 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.60-3.75 (series of m, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>5</sub>), 3.69 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.82 (t,  $J=9.2$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), 4.91 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>).

**Preparation of PM45 (via cyanamide and BTCA acid).** One equivalent (1.76 mmol) of  $\beta$ CD, 16.7 equivalents of CYA (29.49 mmol) and ADHF as catalyst (0.094 mmol) were added to 3.6 equivalents of BTCA acid. Then reagents were placed at 120°C under vacuum for 20 minutes. Acetone washing removed any unreacted reagents and product precipitated as a white solid (yield 69%). <sup>1</sup>H NMR (unbuffered D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ) 2.42-2.52 (series of m, 2H, H<sub>a-a'</sub>, BTCA), 2.54-2.68 (series of m, 2H, H<sub>b-b'</sub>, BTCA), 3.00-3.10 (series of m, 2H, H<sub>c-c'</sub>, BTCA), 3.46 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>4</sub>), 3.48 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.60-3.75 (series of m, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>5</sub>), 3.69 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.81 (t,  $J=9.2$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), 4.91 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>).

**Preparation of PM103 (via microwave).** 1 Equivalent (0.44 mmol) of  $\beta$ CD was mixed to 3.6 equivalents of BTCA and the mixture lets to react in a microwave reactor at 300 W, 60°C for 10 minutes open vessel. The  $\beta$ CD-BTCA complex appeared as a white solid with a host:guest ratio of 1:3.5 (100% yield). <sup>1</sup>H NMR (unbuffered D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ) 2.42-2.50 (series of d,  $J=17.2$  Hz, 2H, H<sub>a-a'</sub>, BTCA), 2.55-2.66 (series of d,  $J=4.0, 17.2$ , 2H, H<sub>b-b'</sub>, BTCA), 3.05 (m, 2H, H<sub>c-c'</sub>, BTCA), 3.44 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>4</sub>), 3.47 (dd,  $J=3.6, 9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.62-3.78 (series of m,  $J=3.6$ , 7H,  $\beta$ CD-H<sub>5</sub>), 3.67 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.80 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), 4.89 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>).

**Preparation of carvacrol complexes.** 1.5 equivalents of PM43 or PM45 (0.88 mmol) were dissolved in 7.2 mL of distilled water at 85°C for 30 minutes. Then temperature was lowered until 65°C and 1 equivalent of carvacrol was added. After six hours of magnetic stirring, solution was left at 4°C to promote complex precipitation.

### **$\beta$ CD GDGE reactions:**

**Preparation of PM32.** 1 equivalent (0.6 mmol) of GDGE was dissolved in 6 mL of bidistilled water containing 1 equivalent (0.6 mmol) of NaOH. Then GDGE solution was added dropwise to 6 mL of water containing 3 equivalents (1.8 mmol) of  $\beta$ CD. Reaction proceeded at room temperature for 1 hour. The solution was acidified with cold HCl 0.3 N and filtered with a Buckner under vacuum in order to obtain a white precipitate (yield

88 %).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 2.58-2.68 (m, 2H, GDGE), 2.78-2.84 (m, 2H, GDGE), 3.14-4.00 (series of m, 11H, GDGE), 3.44 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.51 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.69 (m, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.72 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.79 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 4.93 (d, 10.0 Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ).

**Preparation of PM36.** 1 Equivalent (4.4 mmol) of creosol was added to a 25 mL of 0.2 M NaOH, the solution turned light orange. After 10 minutes, 25 mL of water solution containing 1.4 equivalent (6.22 mmol) of GDGE were added by a 20 minutes dropping. Solution became opaque and was left for 150 minutes at room temperature, then heated at  $50^\circ\text{C}$  for 30 minutes. A cold 0.3 M HCl solution was added until a yellow gel precipitated from solution (yield 86 %).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 2.28 (s, 3H, creosol), 2.29 (s, 3H, creosol), 2.56-2.68 (broad multiplets, 2H, GDGE), 2.74-2.84 (broad m, 2H, GDGE), 3.15 (m, 2H GDGE), 3.32-4.20 (series of m, 11H, GDGE), 3.83 (s, 3H creosol), 3.86 (s, 3H creosol), 6.62-6.72 (series of m, 4H aromatic, creosol), 6.80 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H aromatic, creosol), 6.83 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H aromatic, creosol).

#### **$\beta\text{CD}$ natural phenols reactions:**

**Preparation of Eugenol complex: PM115.** 3 Equivalents of  $\beta\text{CD}$  (3.5 mmol) were dissolved in 30 mL of bidistilled water at  $80^\circ\text{C}$  for 30 minutes to activate macrocycle. Then, a solution of eugenol (2.3 mmol) in 2-propanol (10 mL) was added under stirring. The solution turned light green. After 6 hours under stirring at  $60^\circ\text{C}$  the solution became slightly opaque.  $\beta\text{CD}$ -eugenol complex (host guest ratio 1:1.7) precipitate as a white solid after 1 night at  $4^\circ\text{C}$  (yield 85%).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.15 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H, eugenol  $-\text{CH}_2$ ), 3.41 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.47 (dd,  $J=3.2, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.61 (m, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.68 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.75 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 4.72 (d,  $J=16.8$  Hz 1H, eugenol  $=\text{CH}_2$ ), 4.72 (d,  $J=16.8$  Hz 1H, eugenol  $=\text{CH}_2$ ), 4.89 (d, 10.0 Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 4.92 (d,  $J=16.8$  Hz, 1H, eugenol  $=\text{CH}_2$ ), 5.84 (m, 1H, eugenol  $\text{CH}=\text{}$ ), 6.55 (broad s, 1H, eugenol aromatic), 6.57 (broad s, 1H, eugenol aromatic), 6.733 (d,  $J=7.6$  Hz 1H, eugenol aromatic).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered DMSO- $\text{D}_6$ ,  $\delta$ ) 3.22 (d,  $J=7.2$  Hz, 2H, eugenol  $-\text{CH}_2$ ), 3.24-3.38 (series of m, 14H,  $\beta\text{CD-H}_2\text{H}_4$ ), 3.50-3.68 (series of m, 28H,  $\beta\text{CD-H}_3\text{H}_5\text{H}_6$ ), 3.707 (s, 3H, eugenol  $-\text{OCH}_3$ ), 4.46 (t,  $J=5.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-OH}$ ), 4.85 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 4.960-5.060 (series of m, 2H, eugenol  $=\text{CH}_2$ ), 5.67 (d,  $J=2.4$  Hz,



7H,  $\beta$ CD-OH), 5.73 (d,  $J=6.8$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-OH), 5.905 (m, 1H, eugenol -CH=), 6.54 (dd,  $J=2.00$ , 8.0 Hz, 1H, eugenol aromatic), 6.67 (dd,  $J=2.00$ , 8.0 Hz, 2H, eugenol aromatic).

**Preparation of Guaiacol complex PM120.** 3 Equivalents of  $\beta$ CD (0.88 mmol) were solubilized in 7.2 mL of water at 80°C. After 30 minutes 2 equivalents of guaiacol (0.59 mmol) were added and stirring was prolonged for 6 hours at 60°C. Solution turned to be opaque, milk-like, and after 1 night at 4°C the complex precipitate as a solid white with a ratio host:guest of 1:1.5 (yield 47%).  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.422 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>4</sub>), 3.491 (dd,  $J=3.6$ , 10.0 Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.673 (m, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>5</sub>), 3.702 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.713 (s, 3H, guaiacol -CH<sub>3</sub>), 3.791 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), (d, 10.0 Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>), 6.773 (m, 3H, guaiacol aromatic), 6.876 (m, 1H, guaiacol aromatic).

## RESULTS AND DISCUSSION

*Characterization of BTCA reactions* The presence of several conformers of BTCA due to the free rotation of C-C bonds in the structure, does not allow a full assignment of BTCA protons. Chemical shift of  $\beta$ CD proton involved in complex are compared to free  $\beta$ CD signals in Table 1.

proton	PM21			PM27		PM42	
	$\beta$ CD	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$
H1	4.949	4.911	-0.039	4.926	-0.024	4.839	-0.110
H2	3.529	3.473	-0.056	3.492	-0.037	3.485	-0.044
H3	3.844	3.816	-0.028	3.834	-0.010	3.826	-0.018
H4	3.464	3.461	-0.003	3.484	0.020	3.476	0.012
H5	3.741	3.702	-0.039	3.710	-0.031	3.700	-0.041
H6	3.757	3.697	-0.060	3.701	-0.056	3.694	-0.063

Table 1 -  $^1\text{H}$  NMR shifts (part per million) of  $\beta$ CD and  $\beta$ CD-BTCA complexes obtained with  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$  and the corresponding complexation shifts ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$ ).

A significant negative shift for  $\beta$ CD H1, H2, H5 ad H6 proton is observed in each complex;  $\beta$ CD-H4 and  $\beta$ CD-H3 show a very weak shifting. The work of Lisnyak *et al.*, (2007) can be helpfull to clarify BTCA  $\beta$ CD interaction; they observed a higher affinity for  $\beta$ CD cavity of succinic anhydride respect to its corresponding acid; once succinic anydride entered, the microenviroment of  $\beta$ CD catalyzes a ring opening of



anhydride with formation of succinic acid- $\beta$ CD complex. In these complexes methylene groups of the guest are near to glycosidic oxygen (Lysniak *et al.*, 2007), meanwhile carboxylic groups are near the narrow rim. A disposition of BTCA anhydride into  $\beta$ CD cavity could be similar of that described for succinic anhydride because of structure similarity between these two anhydrides. Considering high shift of H1 $\beta$ CD, and H5 and H6, BTCA can be included into the cavity in a similar way of succinic acid: BTCA can interact with glycosidic oxygen on  $\beta$ CD, with the methylenic part included into the cavity and carboxylic groups outer the narrow rim.

NMR signals were used to calculate  $\beta$ CD-BTCA ratio; the high BTCA excess (4.5 times more than  $\beta$ CD) in PM27 can lead to high number of molecular interactions, responsible of the gel-like appearance of PM27 product.

A weaker transient inclusion-like interaction was observed at NMR analysis for a sample obtained by mixing  $\beta$ CD and BTCA anhydride in D<sub>2</sub>O before spectrum recording. On the contrary, BTCA does not formed an inclusion complex with  $\beta$ CD even when sodium hypophospite or cyanamide was used.

In presence of CYA, under our experimental conditions, either BTCA and its anhydride form inclusion complex with  $\beta$ CD; chemical shift reported in Table 2 confirmed this. The strenght of BTCA- $\beta$ CD complexes were tested with a carvacrol complexation; carvacrol have a very high affinity fo  $\beta$ CD cavity so can act as a guest competitor with included BTCA.

	$\beta$ CD		PM43		PM45		PM47 surnatant		PM103	
proton	free	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	
H1	4.949	4.913	-0.036	4.907	-0.042	4.708	-0.241	4.892	-0.057	
H2	3.529	3.478	-0.051	3.477	-0.052	3.461	-0.068	3.468	-0.061	
H3	3.844	3.822	-0.022	3.813	-0.031	3.794	-0.050	3.798	-0.046	
H4	3.464	3.470	0.006	3.459	-0.005	3.452	-0.012	3.444	-0.020	
H5	3.741	3.675	-0.066	3.675	-0.066	3.67	-0.071	3.700	-0.041	
H6	3.757	3.687	-0.070	3.688	-0.069	3.656	-0.101	3.67	-0.087	

Table 2 - <sup>1</sup>H NMR shifts (part per million) of  $\beta$ CD and  $\beta$ CD-BTCA complexes obtained with cyanamide in D<sub>2</sub>O and the corresponding complexation shifts ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$ ).

PM43 and PM45 have same experimental conditions, but PM43 started from anhydride, meanwhile PM45 started from BTCA. Then a carvacrol complexation was carried on via

coprecipitation. BTCA of PM45 was completely replaced by carvacrol, otherwise the BTCA- $\beta$ CD complex from PM43 can still be found in supernatant fraction after carvacrol complexation, with a further shifting at high fields (Table 2). Probably, reaction conditions of PM45 have permitted a low conversion of BTCA into its anhydride that included in  $\beta$ CD with a low inclusion complex constant. In PM43 the higher affinity of anhydride permitted a better inclusion. This suggests that BTCA anhydride can interact with  $\beta$ CD more strongly than its acid form, giving stable complexes.

As seen by Lisnyak *et al.* (2007), water is a trigger force in inclusion complex formation. In fact, only one direct interaction occurred between succinic acid and  $\beta$ CD; other interactions are mediated by H<sub>2</sub>O molecules present into the cavity or associated with the narrow rim. In a similar way, H<sub>2</sub>O can be necessary for inclusion of BTCA into  $\beta$ CD cavity. This could explain why a water subtraction due to a strong vacuum treatment can disrupt the BTCA- $\beta$ CD complex obtained by PM43.

A BTCA- $\beta$ CD complex can also be obtained in neat condition by microwave. PM103 NMR analysis showed proton shifting of  $\beta$ CD diagnostic of the interaction with BTCA, similar to previously described complexes. (Table 2).

*Characterization of GDGE reactions.* PM32 NMR analysis showed a high field shift of  $\beta$ CD protons, more significant ones being observed for H3 ( $\Delta\delta = -0,052$ ), H5 ( $\Delta\delta = -0,052$ ) and H6 ( $\Delta\delta = -0,034$ ). Almost all GDGE signals overlap in the same spectrum range of  $\beta$ CD signals hence diagnostic signals of putative complexed GDGE are hidden. Anyway, GDGE signals attributed to protons of epoxide rings, are not significantly changed respect to GDGE protons in net form. PM32 analysis suggested an interaction between the cavity of  $\beta$ CD and GDGE, with epoxide ring pending outer of macrocycle. There is no spectroscopic evidence of an ether bond between C6OH group of  $\beta$ CD and epoxide ring of GDGE. It is reasonable to anticipate that the water molecules associated with narrow rim of  $\beta$ CD, interacting with C6OH would make OH less prone to attack epoxide ring. Under harsh experimental conditions as increasing NaOH equivalents, changing  $\beta$ CD and GDGE stoichiometry and increasing temperature, reaction failed.

In order to verify the lack of reactivity of aliphatic OH group of  $\beta$ CD, GDGE was treated with a phenol under basic conditions. Reaction occurred between the phenol-OH group of creosol (PM37) and  $\beta$ CD in the presence of NaOH. The <sup>1</sup>H NMR of the reaction showed

the presence of two different products of creosol as result in the aromatic proton area; meanwhile protons from GDGE epoxide are negatively shifted, suggesting a ring opening. A quantitative yield cannot be obtained because no attempts were made in order to recover the mixture of products from the solution and the precipitate.

A GDGE correlated reagent as ethylen diglycidyl ether failed in crosslink  $\beta$ CD, meanwhile more soluble  $\beta$ CD derivatives successfully reacted (Rodriguez-Tenreiro *et al.*, 2007). The authors explained that an high concentration of reagents is needed; unfortunately low solubility of  $\beta$ CD did not allow high concentration. In order to completely dissolve the macrocycle a relative large amount of water is needed, leading to dilution of reagents and competitive reaction with solvent.

*Characterization of DMC reactions.* Dimethylcarbonate (DMC) is a sustainable reagent, commonly used for methylation and giving place to esterification in the presence of alcohol. We assayed DMC with  $\beta$ CD under a range of temperature, starting from 100°C until 160°C, and treatment was prolonged from 15 minutes until 1 hour, under microwave conditions at power of 300 W. Unfortunately, under our experimental condition,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of the crude of reaction confirmed the only presence of the starting materials. Considering the lack of any product, DMC reaction are not reported.

*Characterization of phenol complexes.* Guaiacol and eugenol were included in  $\beta$ CD according to a coprecipitation complexation reaction starting with a Host:Guest ratio of 1:1.5.  $\beta$ CD-complexes were characterized with  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  and  $\text{DMSO-}d_6$ .

Proton	$\beta$ CD	PM115		PM120	
		Eugenol complex	$\Delta\delta$	Guaiacol complex	$\Delta\delta$
H1	4.949	4.890	-0.059		-4.949
H2	3.529	3.474	-0.055	3.491	-0.038
H3	3.844	3.745	-0.099	3.791	-0.053
H4	3.464	3.412	-0.052	3.422	-0.042
H5	3.741	3.611	-0.130	3.673	-0.068
H6	3.757	3.681	-0.076	3.702	-0.055

Table 3 -  $^1\text{H}$  NMR shifts (part per million) of  $\beta$ CD and  $\beta$ CD complexes obtained with coprecipitation method in  $\text{D}_2\text{O}$  and the corresponding complexation shifts ( $\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$ ).

$\beta$ CD-eugenol complex NMR analysis in D<sub>2</sub>O showed the presence of an overall shifting of  $\beta$ CD protons (Table 3) and eugenol. The presence of sharp signals of eugenol and the significant shifting of diagnostic  $\beta$ CD protons H3-H5 supported the inclusion complex formation.; The exact host guest ratio was calculated from the proton integral of NMR spectra recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> where  $\beta$ CD-eugenol,  $\beta$ CD and eugenol are soluble. When the NMR spectrum was recorded in water, a light precipitate appeared in the NMR tube after detection. Ratio between protons of  $\beta$ CD and eugenol recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> revealed an host:guest ratio of 1:1.7.

$\beta$ CD-guaiacol complex formation was evaluated with the chemical shift of diagnostic proton of  $\beta$ CD. NMR spectra shows a high field shift of  $\beta$ CD protons, although at a minor extent in comparison to those of  $\beta$ CD-eugenol complex (Table 3). Compared to  $\beta$ CD-eugenol complex, a lower yield was calculated for  $\beta$ CD-guaiacol complex. This can be explained by the marked hydrophobicity of eugenol due to the presence of the side aliphatic unsaturated chain that pushed the equilibrium towards inclusion in  $\beta$ CD cavity, The host: guest interaction between guaiacol and  $\beta$ CD is affected by the moderate water solubility of guest (17 g/L at 15°C), in other words the solvent is a competitor for  $\beta$ CD cavity as well as the small size of the molecule. Any way repeated NMR analysis showed that both complexes are stable for at least one week when stored in D<sub>2</sub>O solution.

Different complexation condition by coprecipitation methods under aqueous solutions or using microwave technology did not succeeded in  $\beta$ CD-magnolol inclusion even when a larger cavity was used ( $\gamma$ CD). The negative result can be mainly due to the steric hindrance of the guest that probably needs more drastic conditions.

## CONCLUSIONS

Surprisingly, under our experimental conditions BTCA anhydride and  $\beta$ CD formed a stable complex under several experimental condition. The new complex was tested with carvacrol, a molecule that easily forms strong  $\beta$ CD complex. The BTCA- $\beta$ CD interaction prevented a  $\beta$ CD-carvacrol complex either the esterification between BTCAa and  $\beta$ CD. Experimental evidences from literature of a  $\beta$ CD inclusion complex of succinic anhydride

could explain how BTCA anhydride and BTCA interact with  $\beta$ CD under water mediation. Even if a true crosslink has not been achieved,  $\beta$ CD-BTCA complex has interesting properties for a biosensor application. Negative charge from carboxylic group of BTCA improved water solubility of  $\beta$ CD and can reject negative interferents like ascorbic acid by electrostatic repulsion. Moreover, carboxylic acid group can be useful for antibody immobilization in immune-based biosensors (Wajs *et al.*, 2014).

The gel-like product of GDGE and  $\beta$ CD can be a useful matrix for enzyme entrapping, helped by OH group from  $\beta$ CD and glycerol. Nonetheless the presence of epoxide ring could alter enzyme activity though the reactivity would be lowered by the presence of  $\beta$ CD.

$\beta$ CD complexes with natural phenols as guaiacol and eugenol will be tested onto a biosensor in the aim to investigate their effect on the polymer/modifier composite selectivity.

## REFERENCES

Anandam, S. and Selvamuthukumar, S. (2014) Optimization of microwave-assisted synthesis of cyclodextrin nanosponges using response surface methodology. *J Porous Mater* 21, 1015-1023.

Boscolo, B., Trotta, F. and Ghibaudi, E. (2010) High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges, *J Mol Catal B Enzym* 62, 155–161.

Brondani, D., Weber Scheeren, C., Dupont, J. and Cruz Vieira, I. (2009) Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. *Sens Actuators B Chem* 140, 252-259.

Castro, E.A. and Barbiric, D.A.J. (2002) Current theoretical methods applied to study cyclodextrins and their complexes. *J Arg Chem Soc* 90, 1-44.

Crini, G. (2005) Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog Polym Sci* 30, 38-70.

Cserhati, T. and Forgacs, E. (1994) Retention of some monoamine oxidase inhibitory drugs on a  $\beta$ -cyclodextrin polymer-coated silica column. *J Chromatogr* 660, 313-318.

Cserhati, T., Fenyvesi, E. and Szejti, (1992) Interaction of nonylphenyl and tributylphenyl ethylene oxide ionic surfactants with highly soluble cyclodextrin derivatives. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 14, 181-188.

da Silva, C.P., Franzoi, A.C., Fernandes, S.C., Dupont, J. and Vieira, I.C. (2013) Development of biosensor for phenolic compounds containing PPO in  $\beta$ -cyclodextrin modified support and iridium nanoparticles. *Enzyme Microb Technol* 52, 296– 301.

Del Valle, E.M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 39,1033-1046.

Díez, P., Piuleac, C.G., Martínez-Ruiz, P., Romano, S., Gamella, M., Villalonga, R. and Pingarrón, J.M. (2013) Supramolecular immobilization of glucose oxidase on gold coated

Dott.ssa Patrizia Monti – Sviluppo e studio di biosensori sostenibili e performanti dedicati alla determinazione di composti nutraceutici e contaminanti di interesse agroalimentare – Tesi di dottorato in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari – Indirizzo in Biotecnologie Microbiche Agroalimentari - Università degli studi di Sassari – Ciclo XXVIII Pag. 114

with cyclodextrin-modified cysteamine core PAMAM G-4 dendron/Pt nanoparticles for mediatorless biosensor design. *Anal Bioanal Chem* 405, 3773-3781.

El Ghoul, Y., Martel, B., Morcellet, M., Campagne, C., El Achari, A. and Roudesli, S. (2007) Mechanical and physico-chemical characterization of cyclodextrin finished polyamide fibers. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 57,47-52.

Franzoi, A.C., Vieira, I.C., Scheeren, C.W. and Dupont, J. (2010) Development of a quercetin biosensor through immobilizing laccase in a modified  $\beta$ -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. *Electroanalysis* 22, 1376-1385.

Fukukawa, K. and Ueda, M. (2008) Recent progress of photosensitive polyimides. *Polymer J* 40, 281-296.

Garg, A., Gupta, B., Prakash, R. and Singh, S. (2010) Preparation and characterization of hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and  $^1\text{H-NMR}$ . *Chem Pharm Bull* 58, 1313-1319.

Girek, T. and Ciesielski, W. (2011) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with succinic anhydride and thermogravimetric study of the polymers. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 69, 439-444.

Gorek, T., Kozłowski, C.A., Koziol, J.J., Walkowiak, W. and Korus, I. (2005) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with succinic anhydride. Synthesis, characterization, and ion flotation of transition metals. *Carbohydr Polym* 59, 211-215.

Komiyama, M. and Hirai, H. (1987) Preparation of immobilized  $\beta$ -cyclodextrins by use of alkanediol diglycidyl ethers as crosslinking agents and their guest binding abilities. *Polymer J* 19, 773-775.

Kono, H. and Nakamura, T. (2013) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride: synthesis, structural characterization, and bisphenol A adsorption capacity. *React Funct Polym*, 73 1096-1102.

Lisnyak, Y.V., Martynov, A.V., Baumer, V.N., Shishkin, O.V. and Gubskaya, A.V. (2007) Crystal and molecular structure of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with succinic acid. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 58, 367-375.



López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P. and García-Carmona, F. (2014) Cyclodextrins and antioxidants. *Crit Rev Food Sci* 54, 251-276.

Martel, B., Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y. and Morcellet, M. (2005) Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: a study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci* 97, 433-442.

Medronho, B., Andrade, R., Vivod, V., Ostlund, A., Miguel, M.G., Lindman, B., Voncina, B. and Valente, A.J.M. (2013) Cyclodextrin-grafted cellulose: Physico-chemical characterization. *Carbohydr. Polym* 93, 324-330.

Milczarek, G. and Ciszewski, A. (2003) Permselective properties of electropolymerized guaiacol derivatives. *Electroanalysis* 15, 529-532.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G. and Henriques, M. (2014) Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 101, 121-135.

Ramírez-Silva, M.T., Corona-Avenidaño, S., Alarcón-Angeles, G., Palomar-Pardavé, M., Romero-Romo, M. and Rojas-Hernández, A. (2014) Construction of supramolecular systems for the selective and quantitative determination of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Procedia Chem* 12, 55-61.

Renard, E., Barnathan, G., Deratani, A. and Sébille, B. (1997) Polycondensation of cyclodextrines with epichlorohydrine. Influence of reaction conditions on the polymer structure. *Macromol Symp* 122, 229-234.

Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodriguez-Perez, A., Concheiro, A. and Torres-Labandeira, J.J. (2006) New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability. *Pharm Res* 23, 121-130.

Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodriguez-Perez, A., Concheiro, A. and Torres-Labandeira, J.J. (2007) Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *Eur J Pharm Biopharm* 66, 55-62.

Shown, I. and Murthy, C.N. (2009) Grafting of cotton fiber by water-soluble cyclodextrin-based polymer. *J Appl Polym Sci* 111, 2056–2061.

Szejtli, J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev* 98, 1743–1754.

Toniolo, R., Dossi, N., Pizzariello, A., Susmel, S. and Bontempelli, G. (2011) Simultaneous detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide by flow-injection analysis with a thin layer dual-electrode detector. *Electroanalysis* 23, 628-636.

Tundo, P. and Selva, M. (2002) The chemistry of dimethyl carbonate. *Acc Chem Res* 35, 706-716.

Tundo, P., Trotta, F., Moraglio, G. and Ligorati, F. (1988) Continuous-flow processes under gas-liquid phase-transfer catalysis (GL-PTC) conditions: the reaction of dialkyl carbonates with phenols, alcohols, and mercaptans. *Ind Eng Chem Res* 27, 1565-1571.

Voncina, B. and Majcen Le Marechal, A. (2005) Grafting of cotton with  $\beta$ -cyclodextrin via poly(carboxylic acid). *J Appl Polym Sci* 96, 1323-1328.

Wajs, E., Caldera, F., Trotta, F. and Fragoso, A. (2014) Peroxidase-encapsulated cyclodextrin nanosponge immunoconjugates as a signal enhancement tool in optical and electrochemical assays. *Analyst* 139, 375-380.

Yang, C.Q., Lu, Y. and Lickfield, G.C. (2002) Chemical analysis of 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid. *Textile Res J* 72, 817-824.

**CAPITOLO  
V**

**Possibili applicazioni in biosensoristica  
di un derivato fenolico contenente atomi di zolfo  
usato nella concia delle pelli**

## SINTESI

Un fenolo derivato contenenti atomi di zolfo (S-PhOH) prodotto dalla Chemiplastica Specialties SpA utilizzato come conciante sostenibile è stato preso in considerazione per l'applicazione dei biosensori.

In una prima parte è stato caratterizzato il comportamento del prodotto di elettrodeposizione del S-PhOH su un elettrodo di Pt. Preliminarmente, tramite studi di voltammetria ciclica, ne è stato determinato il primo punto di ossidazione a 840 mV vs Ag/AgCl. In base a questi risultati l'elettrodeposizione è stata condotta a +900 mV vs Ag/AgCl e i sensori ottenuti sono stati saggiati per la loro risposta nei confronti dell'acido ascorbico. È stata dimostrata una migliore capacità repulsiva per l'acido ascorbico proprio quando i sensori subivano una esposizione duratura all'acido ascorbico. I sensori non conservati in acido ascorbico, ma in tampone fosfato (PBS) perdono questa capacità, diventando più sensibili all'acido stesso. Gli esperimenti successivi hanno confermato che il trattamento di conservazione a cui vengono sottoposti i sensori ne determina la risposta successiva all'acido. L'effetto di auto-repulsione è accentuato dall'assenza di potenziale applicato durante la conservazione; un effetto simile si ha conservando gli elettrodi in deidrodiascorbato, una molecola simile all'acido ascorbico per taglia, ma senza potere ossidante. I risultati portano a ipotizzare che le molecole di acido ascorbico o deidrodiascorbato presenti nelle soluzioni di conservazione in cui sono immersi i sensori, vadano a riempire gli spazi del polimero, saturandolo e decretandone successivamente la bassa permeabilità. Il mantenimento delle caratteristiche del polimero possono essere usate come indice della conservazione dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico in un campione.

Il S-PhOH ha dimostrato una grande affinità per la  $\beta$ CD. La formazione di un complesso di inclusione S-PhOH- $\beta$ CD è stata osservata tramite risonanza magnetica nucleare per preparazioni condotte in differenti condizioni (attraverso coprecipitazione, microne, sonicazione e rotavapor). Tutti i complessi hanno mostrato un significativo spostamento a campi alti di tutti i protoni della  $\beta$ CD. Il più drammatico spostamento è stato subito dall'H5, seguito dall'H3. Considerando che questi due protoni sono nella cavità interna e il significativo spostamento dell' H6 lascia si può presumere un ingresso del guest dal lato

stretto della cavità. L'inclusione di S-PhOH in  $\beta$ CD aumentato la solubilità di questo macrociclo in acqua (da 1.85/100 mL a 9.6 gr/100 ml) rendendo più facile il suo utilizzo.

## SENSOR APPLICATIONS OF A SULFUR-CONTAINING PHENOL USED FOR LEATHER CURING

PATRIZIA MONTI,<sup>a,c</sup> GIAMMARIO CALIA,<sup>b</sup> DAVIDE FABBRI,<sup>c</sup> MARIA ANTONIETTA DETTORI,<sup>c</sup> QUIRICO MIGHELI,<sup>a</sup> PIER ANDREA SERRA,<sup>b</sup> AND GIOVANNA DELOGU,<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100, Sassari, Italy*

<sup>b</sup>*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro, I-07100, Sassari Italy*

<sup>c</sup>*Istituto CNR di Chimica Biomolecolare - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100, Sassari, Italy*

**KEY WORDS:** ascorbic acid, rejection, sensor, inclusion complex

### INTRODUCTION

A common way to exclude interference in amperometric biosensor is the electrodeposition of a polymeric film (Cosnier and Holzinger, 2011). Recently, the use of sulfur containing polymers in the fabrication of sensors have been reviewed (Ciobanu *et al.*, 2009). These polymers are characterized by high strength, good electrical characteristics, transparency, resistance to greases, many solvents and chemicals. Their application broads from sensor application (Telipan *et al.*, 2006), for enzyme immobilization (Giorno *et al.*, 2007) until biosensors (Prieto-Simón *et al.*, 2007).

Effective and chemically friendly component for biosensor construction is  $\beta$ -cyclodextrin, a natural cycloheptaamylose derived from starch.  $\beta$ CD have a stabilizing effect on enzyme activity (Boscolo *et al.*, 2010; Franzoi *et al.*, 2010; Brondani *et al.*, 2009).

A phenol derivative containing sulfur atoms (S-PhOH) from Chemiplastica Specialties S.p.A. generally used as sustainable tanning agent was considered for biosensor application. Because of a potential pending patent request a detailed chemical definition of this compound cannot be provided. Anyway S-PhOH makes electrodeposition a feasible way to obtain a polymeric film on transducer surface. Studies about a sensor based on S-PhOH are presented in the first part of this chapter. Nonetheless S-PhOH interaction with  $\beta$ CD is described in the second part.

## PART A: SENSORS BASED ON S-PHOH

### MATERIALS AND METHODS

#### Chemicals and solutions

All chemicals were analytical reagent grade or higher purity and dissolved in bidistilled deionized water (MilliQ®). Ascorbic acid (AA), dehydroascorbate (DHA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydrochloric acid (HCl) were purchased from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). The phosphate-buffered saline (PBS, 50 mM) solution was prepared using 0.15 M NaCl, 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.04 M NaOH from Sigma-Aldrich and then adjusted to pH 7.4. Phenol-derivate containing S atoms (S-PhOH) was a gift from Chemiplastica Specialties S.p.A. (Buccino (SA), Italy). Stock solutions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) and AA (100 mM) were prepared respectively in bidistilled water and in 0.01 M HCl. DHA solutions (10 mM; 1 mM; 0,1 mM and 0,001 mM) for storage were prepared immediately before use. Solutions were kept at 4 °C when not in use. All *in vitro* calibrations were performed using freshly solutions under standard conditions of pressure and temperature. Teflon-coated platinum (90% Pt, 10% Ir; Ø = 125 µm) was purchased from Advent Research Materials (Eynsham, England).

#### Sensors construction

All the working electrodes were prepared removing the Teflon® insulation from the platinum wires in order to expose 1 mm of bare metal.

Electropolymerization, calibration and cyclic voltammetry were carried out using the four-channel equipment (eDAQ QuadStat, e-Corder 410, eDAQ, Australia); all potentials are referred to Ag/AgCl electrode (RE); a stainless steel wire was the auxiliary electrode (AE).

Preliminary Cyclic voltammeteries (CV) were performed in 10 mM of S-PhOH in PBS (pH=7.4) in order to investigate the electrochemical behavior. Potential swept for -1 to +1 V at a scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup>.

Sensor construction was performed immersing Pt electrodes in 10 mM solution of S-PhOH (0.595 gr of commercial solution) in 20 mL PBS and applying a +900 mV for 30 minutes by means of constant potential amperometry.



### **Storage effect characterization.**

*Assessing storage effect: under constant potential applied.* Two different sets of electrodes polymerized with S-PhOH (n=3) were subjected to four injection of 1 mM AA (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> after 1 day, 4<sup>th</sup> after a weekend), with a constant potential of +700 mV vs Ag/AgCl applied; as an internal negative control also a bare electrode was included. The current difference (nA) before AA injection and after AA injection was considered ( $\Delta I$ ). For better comparing two experimental sets,  $\Delta I$  is reported as percentage ( $\Delta I_{\%}$ ) assuming  $\Delta I$  of bare electrodes as 100%. In the first experiment the electroanalytical cell solution was replaced with new PBS after each injection; *vice versa*, solution was not changed in the other set, in order to leave sensors constantly immersed in ascorbic acid. The statistical significance between  $\Delta I_{\%}$  was calculated with a Mann-Whitney test, a non parametric test that do not assume a Gaussian distribution of percentage.

Each storage group was composed by 3 polymerized sensors and a bare Pt electrode ( as a negative control, stored in dry conditions at room temperature).

*Effect of storage: AA and DHA experiments.* Calibrations took place in 20 mL of PBS applying a constant potential of +700 mV, currents were registered in nA after a constant current intensity was reached. Ascorbic acid respond was registered for 500 and 1000  $\mu\text{M}$  of AA concentration into the electrochemical cell.

Different sets of electrodes (n=4) were electropolymerized and showed homogeneous responds to AA at day 1. Then sets were stored under different experimental conditions: immersed in different solutions, applying or not a constant potential applied of +700 mV vs Ag/AgCl reference electrode ( $\text{AA} + E_{\text{app}}$ ) for 5 consecutive days. In Table 1 are described different storage conditions and corresponding abbreviations used. Then sets were washed in bidistilled water and calibrated again in order to assess their respond to AA. Statistical significance was evaluated by an unpaired t test ( $p < 0.05$ ).

Table 1 - Different storage conditions used for exploring sensor behaviors; sensors set name correspond to figure legends.

Sensors Set (n=4)	5 days storage conditions:	
	Solution:	Potential applied +700 mV vs Ag/AgCl
PBS NO E <sub>app</sub>	PBS pH 7.4	NO
1 mM AA + E <sub>app</sub>	1 mM AA	YES
10 mM AA NO E <sub>app</sub>	10 mM AA	NO
1 mM AA NO E <sub>app</sub>	1 mM AA	NO
0.1 mM AA NO E <sub>app</sub>	0.1 mM AA	NO
1 mM DHA + E <sub>app</sub>	1 mM DHA	YES
1 mM DHA NO E <sub>app</sub>	1 mM DHA	NO

## RESULTS AND DISCUSSION:

In order to explore the electrochemical behavior of S-PhOH preliminary CV experiments were carried out. CVs did not show any reduction activity in the range from -1 until +1, otherwise a single oxidation peak was found around 850 mV. The CV results allowed to set an applied potential of +900 mV vs Ag/AgCl in order to oxidate and polymerized S-PhOH on sensors. It has been preferred not applying a higher polymerization potential because around 1 V occurs water dissociation on the Pt electrode, that may negatively affect electrodeposition.

In Figure 1 were reported results that assess a storage effect on sensor sensibility to AA. Two sets of sensors were subjected to different storage, one with a prolonged exposure to AA solution and the other one in PBS. Sensor from the two sets seems to respond to AA injection in a different way starting from 3<sup>rd</sup> injection. The longer exposure to AA determined a stable, lower response to AA, meanwhile a PBS permanence determined a loss of AA rejecting effect. The behavior of PBS sensors after the 4<sup>th</sup> AA injection approach that of a bare electrode; this means that PBS or potential applied can ruin sensors rejecting characteristics.

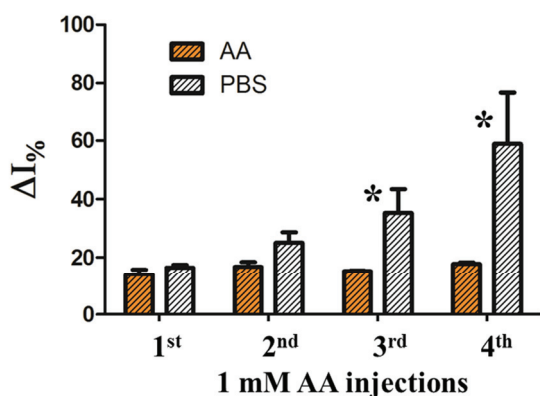


Figure 1 - Different response to AA of sensors conditioned with prolonged exposure to AA or PBS.  $\Delta I\%$  is the current difference pre- and post- injection of AA reported to  $\Delta I$  of bare electrode.) \* significant difference,  $p < 0.01$ .

In order to establish if the AA rejection ability is due to a joined effect of applied potential and AA or to the sole presence of ascorbic acid further experiments were performed.

Figure 2 shows the calibration curves after 5 days of different storages. Sensor sets calibrations at day 0 after calibrations – therefore without storage - exhibited an homogeneous respond to AA (data not shown). This experimental evidence confirmed that differences in AA sensibility at day 5 can be preferably due to storage conditions.

In Figure 2 part A) shows that an applied potential is not necessary to have an AA rejecting properties. Moreover AA storage with potential and PBS with no potential is not significant ( $p < 0.05$ ). This could be explained with a depletion of AA occurred with the constant potential applied during experiment. The AA rejecting properties were enhanced when sensors are stored with AA. This could be due to a filling of polymers holes with AA molecules of the storage solution favored by the small molecular size that would block access to electrode or reject negative charged AA with electrostatic repulsion. The presence of sulfur atoms (nucleophilic donor) in S-PhOH would enhance interactions with AA molecule of the storage solution making the filling tighter. DHA, the oxidation product of ascorbic acid, has no oxidative activity but is structurally similar to AA, so hypothetically, DHA can occupy the same space of AA, without oxidative depletion due to applied potential. Experiments conducted with DHA were reported in Figure 2 part B); DHA with potential applied seriously undermines AA rejection, likely oxidative forces can ruin sensors, as seen for PBS under potential.

DHA and AA storages demonstrate no difference, suggesting a self-rejecting mechanism. Moreover, DHA do not have charge, further supporting the hole-filling model.

In order to see if the AA rejection property depends on AA concentration during storage, further experiments were carried out. Figure 2 part C) show that there is no significant different between AA rejection ability among sensors stored in 0.1, 1 and 10 mM AA. It could be possible that widen AA concentration different results can be obtained.

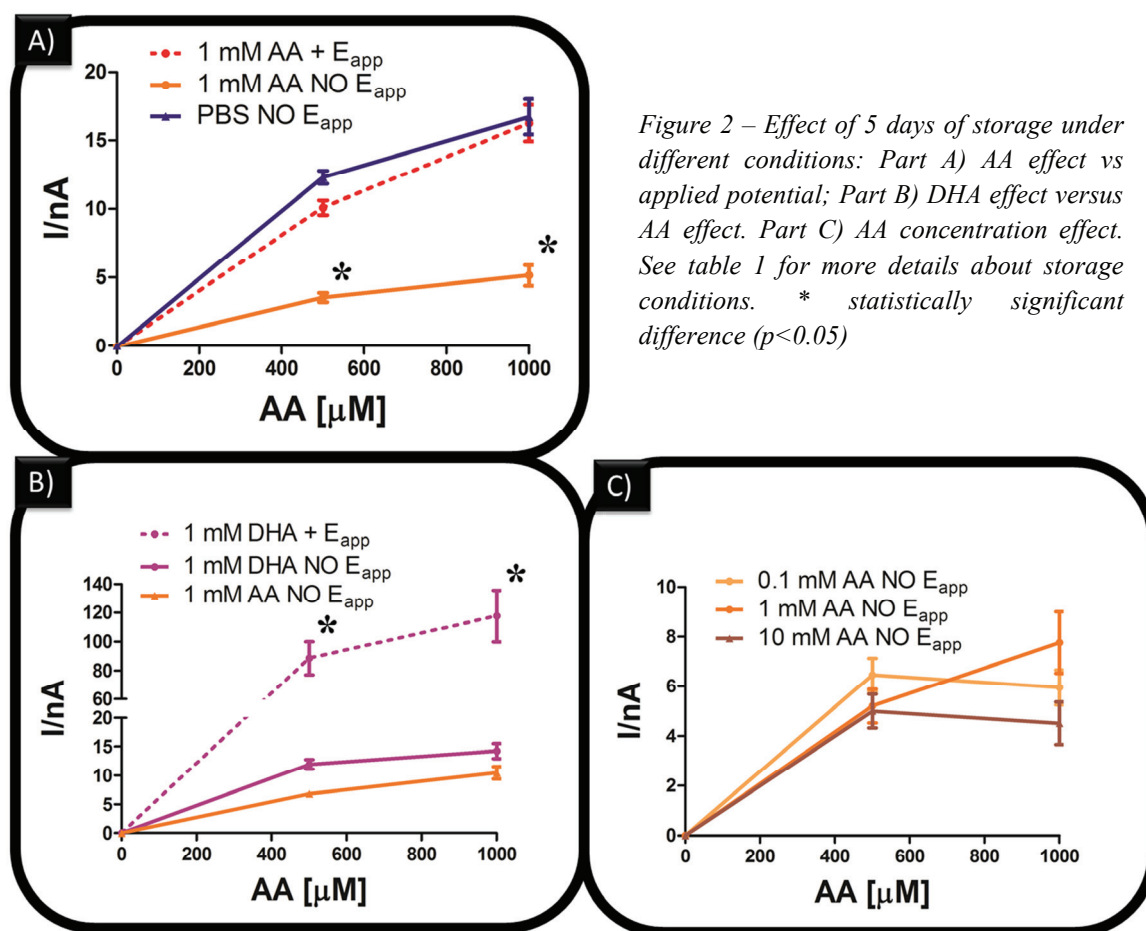


Figure 2 – Effect of 5 days of storage under different conditions: Part A) AA effect vs applied potential; Part B) DHA effect versus AA effect. Part C) AA concentration effect. See table 1 for more details about storage conditions. \* statistically significant difference ( $p < 0.05$ )

## PART B: S-PHOH AND B-CYCLODEXTRIN

### MATERIALS AND METHODS

#### Complex preparation:

**NMR measurements.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $\beta\text{CD-S-PhOH}$  complexes (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) were recorded with a Varian spectrometer Mercury Plus (Varian Inc., Palo Alto, CA) at 399.93 and 100.57 MHz, respectively.  $\text{D}_2\text{O}$  was used as solvent using residual water peak as reference. Chemical shifts are given in parts per million ( $\delta$ ); multiplicities are indicated by s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet of doublet), or series of m (series of multiplets). Coupling constant  $J$  is expressed in Hertz (Hz).  $^1\text{H}$  chemical shifts were referred to  $\text{H}_2\text{O}$  signal and  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with a 5 mm tube without degassing.

**PM91 (via coprecipitation).** 1 equivalents of  $\beta\text{CD}$  (0.34 mmol) were solubilized in 4 mL of water at  $85^\circ\text{C}$ . After 30 minutes 1 equivalents of S-PhOH (0.34 mmol) is added and stirring was prolonged for 6 hours at  $60^\circ\text{C}$ . The solution remain clear, and after 5 days at  $4^\circ\text{C}$  product did not precipitate. The solvent was evaporated by vacuum at rotavapor giving a light beige solid.  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.40 (s,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.42 (s, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.47 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.62 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.74 (m,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 3.90-4.26 (series of m, S-PhOH), 4.88 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 6.40-7.80 (series of m, aromatics, S-PhOH).

**PM108 (via rotavapor).** 1 equivalents of  $\beta\text{CD}$  (0.34 mmol) is added to 1 equivalents of S-PhOH (0.34 mmol). Solvent of the stock solution was evaporated at  $60^\circ\text{C}$  under vacuum at rotavapor giving a light beige solid. Then complexation took place in 10 minutes, at  $60^\circ\text{C}$  under vacuum.  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.37 (s, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.38 (s, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.43 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.59 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.71 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 3.88-4.24 (series of m, S-PhOH), 4.84 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 6.40-7.80 (series of m, S-PhOH).

**PM112 (via sonication).** 1 equivalents of  $\beta\text{CD}$  (0.34 mmol) is added to 1 equivalent of S-PhOH (0.34 mmoli) and mixed until an homogeneous foamy cream was obtained. After 2 hours in a sonication bath. The solvent was evaporated by vacuum giving a light beige solid.  $^1\text{H}$  NMR (unbuffered  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ) 3.40 (t,  $J=10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_4$ ), 3.42 (s, 7H,  $\beta\text{CD-H}_5$ ), 3.47 (dd,  $J=3.6, 10.0$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_2$ ), 3.62 (s, 14H,  $\beta\text{CD-H}_6$ ), 3.74 (m,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_3$ ), 3.90-4.26 (series of m, S-PhOH), 4.88 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta\text{CD-H}_1$ ), 6.40-7.80 (series of m, aromatics, S-PhOH).

H<sub>5</sub>), 3.46 (dd,  $J=3.6$ , 10.0 Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.62 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.73 (t,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), 3.90-4.26 (series of m, S-PhOH), 4.87 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>), 6.40-7.80 (series of m, aromatics, S-PhOH).

**PM114 (via microwave).** 1 equivalents of  $\beta$ CD (1.02 mmol; 1.170 gr) is added to 1 equivalent of S-PhOH (1.02 mmol) and mixed until an homogeneous foamy cream was obtained. Then reaction took place in a microwave reactor, at 300 W, 100°C for 1 minute, open vessel. Water evaporate during experiment. <sup>1</sup>H NMR (unbuffered D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ) 3.39 (s, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>4</sub>), 3.40 (s, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>5</sub>), 3.46 (dd,  $J=3.6$ , 10.0 Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>2</sub>), 3.62 (s, 14H,  $\beta$ CD-H<sub>6</sub>), 3.73 (m,  $J=9.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>3</sub>), 3.90-4.26 (series of m, S-PhOH), 4.86 (d,  $J=3.6$  Hz, 7H,  $\beta$ CD-H<sub>1</sub>), 6.40-7.80 (series of m, aromatics, S-PhOH).

## RESULTS AND DISCUSSION:

In table 2 were summarized chemical shift between complex and free  $\beta$ CD.

Technique:	coprecipitation		rotavapor		sonication		microwave		
	free	PM91	PM108	PM112	PM114				
proton	$\beta$ CD	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$	complex	$\Delta\delta$
H1	4.949	4.875	-0.074	4.843	-0.106	4.868	-0.081	4.864	-0.085
H2	3.529	3.466	-0.063	3.431	-0.098	3.461	-0.068	3.456	-0.073
H3	3.844	3.739	-0.105	3.711	-0.133	3.733	-0.111	3.731	-0.113
H4	3.464	3.402	-0.062	3.368	-0.096	3.400	-0.064	3.391	-0.073
H5	3.741	3.416	-0.325	3.381	-0.360	3.417	-0.324	3.404	-0.337
H6	3.757	3.624	-0.133	3.593	-0.164	3.619	-0.138	3.615	-0.142

Table 2 - <sup>1</sup>H NMR shifts (part per million) of  $\beta$ CD and  $\beta$ CD-concianta complexes obtained with different preparations in D<sub>2</sub>O and the corresponding complexation shifts ( $\Delta\delta = \delta \text{ complex} - \delta \text{ free}$ ).

All complexes showed a significant high field shifting of all protons. The most dramatically shift was found for  $\beta$ CD H5 proton, followed by a marked shift of  $\beta$ CD H3. Considering that these two protons are in the inner cavity (Figure 3, part 1) the significant H3 and H5 chemical shift confirmed the presence of a inclusion complex (host-guest). Moreover, the significant H6 chemical shift let to presume a guest entrance at the narrow side of cavity (Figure 3, part 2). PM 91 and PM114 preparations show also a similar, high multiplicity of H3; otherwise, PM108 and PM112 preparations showed a triplet broadened signal that presumes the presence of different inclusion complexes. As an example of



these peculiar appearance of H3, NMR spectral regions of PM109 and PM112 are reported (Fig. 3). Unfortunately, due to the chemical structure of S-PhOH, a host:guest ratio cannot be determined appropriately although an approximately 1:1 stoichiometry host-guest was used.

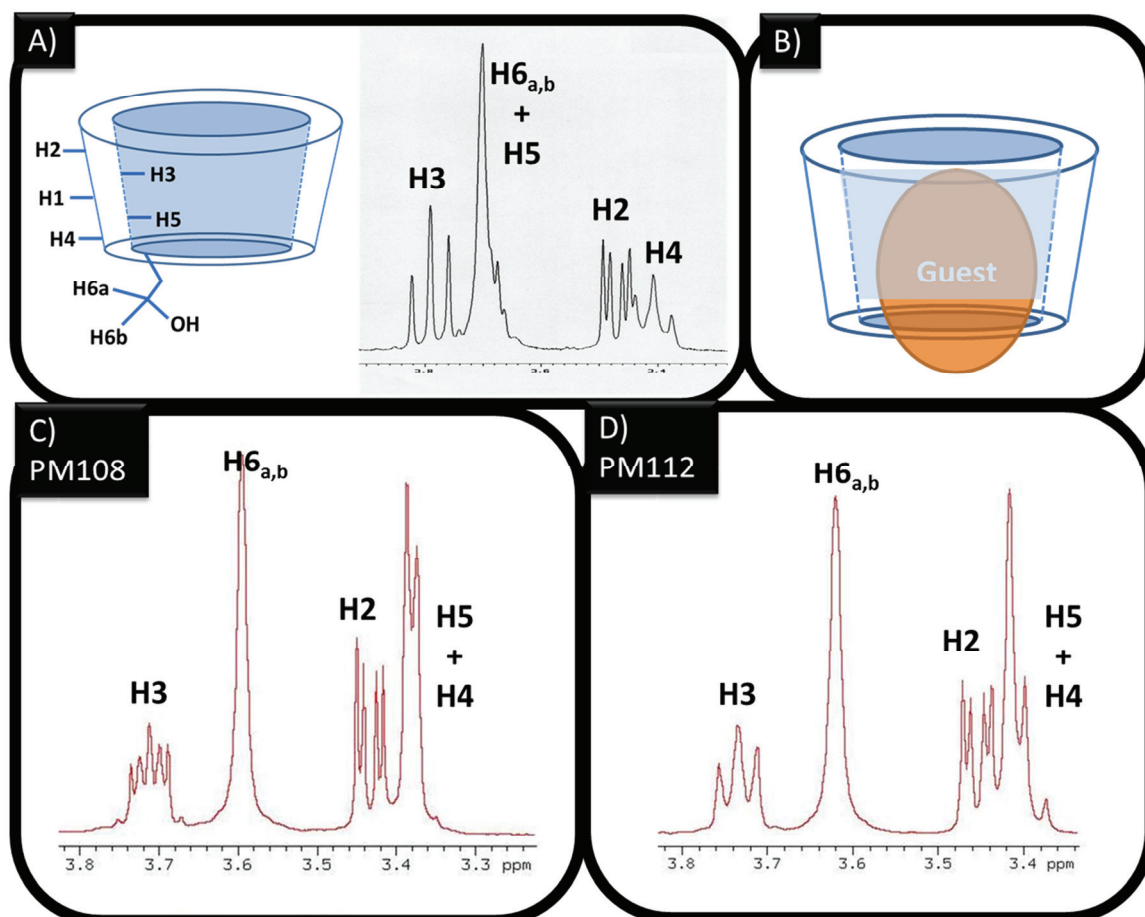


Figure 3 – part A):  $^1\text{H}$  NMR spectra in  $\text{D}_2\text{O}$  and proton position of a free  $\beta\text{CD}$ ; part B): a scheme of  $\beta\text{CD}$ -conciante complex; part C and D): the peculiar multiplicity of  $\beta\text{CD}$  H3 of PM108 (very similar to PM114, spectrum not shown) compared to H3 triplet of PM112 (similar to PM91).

The inclusion of S-PhOH into  $\beta\text{CD}$  increased the solubility of this macrocycle in water (from 1.85/100 mL to 9.6 gr/100 ml). Considering complete solubility of S-PhOH- $\beta\text{CD}$  complex at concentrations needed for NMR experiment it is reasonable suppose a complete conversion of products. In fact, no precipitate was observed in PM91 preparations, in spite of high concentration of  $\beta\text{CD}$ -S-PhOH complex and the low temperature ( $4^\circ\text{C}$ ) of storage.



A further confirmation of the strong interaction between S-PhOH and  $\beta$ CD that gave an inclusion complex was carried out by testing the complex with carvacrol, an hydrophobic molecule that form a very stable inclusion complex with  $\beta$ CD thank to the high affinity with the cavity. Previously obtained  $\beta$ CD-S-PhOH complex was subject to carvacrol complexation under co-precipitation method. NMR analysis in  $D_2O$  did not evidence carvacrol inclusion even carvacrol signals both in the precipitate and solution. S-PhOH can hardly be replaced from  $\beta$ CD cavity; this could represent a useful feature for biosensor application. Interferents like ascorbic acid or dopamine can eventually fit the cavities of  $\beta$ CD no previously occupied by S-PhOH. The effect can be enhanced by strong interactions (hydrophobic and van der Waal's) exerted by electropolymerized S-PhOH and the interfering molecules. The inclusion complex between  $\beta$ CD and S-PhOH seems to be strong enough to prevent interferent intrusion even when S-PhOH is electropolymerized.

Stability over time was assessed with repeated NMR measures and  $\beta$ CD-S-PhOH complexes are stable in water until one month.

## CONCLUSIONS

Some interesting features of ChemiPlastica commercial product have been studied. The S-PhOH can be deposited on a Pt electrodes exploiting constant potential amperometry. Electrodes modified with S-PhOH exhibit a very peculiar response to AA presence, not dependent from the applied potential. The self-rejection could be due to a poly-S-PhOH filled with AA. Sensor based on S-PhOH can be used to assess AA presence into a matrix.

S-PhOH demonstrated a high affinity for  $\beta$ CD cavity.  $^1H$  NMR studies confirmed that very stable complexes can be obtained under sustainable experimental conditions. The improved water solubility obtained by using S-PhOH as guest molecule for  $\beta$ CD overcomes limited water solubility of  $\beta$ CD, facilitating its use for water applications (e.g. sustainable production of sensors and biosensors).  $\beta$ CD and S-PhOH have chemical features that can be useful in improving biosensor performance.

## REFERENCES

Cosnier, S. and Holzinger, M. (2011) Electrosynthesized polymers for biosensing. *Chem Soc Rev* 40, 2146-2156.

Boscolo, B., Trotta, F. and Ghibaudi, E. (2010) High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges, *J Mol Catal B Enzym* 62, 155–161.

Brondani, D., Weber Scheeren, C., Dupont, J. and Cruz Vieira, I. (2009) Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. *Sens Actuators B Chem* 140, 252-259.

Ciobanu, M., Marin, L., Cozan, V. and Bruma, M (2009) Aromatic polysulfones used in sensor applications. *Rev Adv Mater Sci* 22, 89-96.

Franzoi, A.C., Vieira, I.C., Scheeren, C.W. and Dupont, J. (2010) Development of a quercetin biosensor through immobilizing laccase in a modified  $\beta$ -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. *Electroanalysis* 22, 1376-1385.

Giorno, L., Drioli, E. and Carvoli, G. (2001) Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of L-malic acid. *Biotechnol Bioeng* 72, 77-84.

Prieto-Simón, B., Fàbregas, E. and Hart A. (2007) Evaluation of different strategies for the development of amperometric biosensors for L-lactate. *Biosens Bioelectron* 22, 2663-2668.

Telipan, G., Ignat, M. and Cozan, V. (2006) Use of the polysulfone polymer in NO<sub>x</sub> detection. *J Optoelectronic Adv Mat* 8, 582.

## 10. DISCUSSIONE GENERALE E PROSPETTIVE FUTURE

“Il tutto è maggiore della somma delle sue parti.”

Da la Metafisica di Aristotele

Le problematiche legate all'accumulo di micotossine nei prodotti alimentari, sono tra le più importanti nel settore agroalimentare. Le serie conseguenze che si possono verificare a seguito dell'ingestione di mangimi e cibi contaminati da parte di animali e umani, e i conseguenti danni economici per la fuoriuscita dal mercato di ingenti quantità di beni alimentari contaminati hanno spinto la ricerca verso metodi analitici precisi, veloci e di facile utilizzo. I metodi tradizionali sono stati affiancati da nuove tecnologie, tra cui quelle basate sui biosensori, riscuotendo un notevole successo.

In questo lavoro di dottorato sono state studiate e caratterizzate varie componenti per poter ottimizzare un biosensore di tipo amperometrico dedicato all'analisi di micotossine. Le caratteristiche tecniche di un particolare prototipo di biosensore per le micotossine sono state descritte nel capitolo 1. Il biosensore si è dimostrato sensibile nei confronti di una miscela di aflatossine (B1, B2, G1 e G2). Tale sensibilità è dovuta ad una accertata inibizione dell'attività enzimatica dell'acetil colinesterasi (AChE), della quale l'aflatossina è un competitore reversibile (Arduini *et al.*, 2007); anche la patulina, seppur in maniera minore, ha esercitato una inibizione reversibile di tipo non competitivo, non nota fino ad ora. Oltre il tipo di inibizione accertata della aflatossina sull'AChE, al funzionamento di questo prototipo hanno concorso le altre parti: il film permelettivo ha efficacemente respinto gli interferenti; la polietilenimina (PEI) ha stabilizzato l'attività enzimatica, l'albumina di siero bovino e la glutaraldeide hanno permesso una efficace immobilizzazione. Tutte queste componenti non hanno ostacolato l'attività enzimatica e il biosensore ACE/COx ha rilevato la presenza di aflatossine e patulina in un campione complesso, come il substrato di cultura della specie produttrice di aflatossine *Aspergillus flavus* (Capitolo 1).

Inoltre, per poter assicurare condizioni di lavoro più sicure, è stato introdotto un dispositivo in grado di svolgere l'analisi e mandare i dati all'operatore a una distanza di sicurezza (sistema telemetrico). Ciononostante, lo stesso ricercatore ha dovuto prendere

accorgimenti particolari per l'utilizzo della *orto*-fenilendiammina, il monomero da cui deriva il film permselettivo polifenilendiammina (PPD) (Killoran e O'Neill, 2008) usato su questo prototipo di biosensore. Gli enzimi ACE e COx necessitano della stabilizzazione della polietilenimmina (PEI), un polimero ritenuto pericoloso e dannoso per l'ambiente. L'uso di queste specifiche componenti utili al buon funzionamento del biosensore, potrebbe porre delle preoccupazioni in un settore delicato come quello alimentare. L'analisi condotta con questo prototipo potrebbe essere essa stessa fonte di contaminazioni indesiderate. È di gran lunga preferibile evitare l'utilizzo di questi composti, preferendo invece alternative naturali e sostenibili.

Queste motivazioni ci hanno spinto alla ricerca di alternative sostenibili e naturali, in grado di valorizzare al meglio il design e efficacia del biosensore.

Sono stati così scelti e saggiati 5 composti fenolici naturali che, in base alla loro struttura e comportamento elettrochimico, potessero rappresentare dei monomeri di partenza per l'elettrodeposizione di film permselettivi.

In una prima fase, i monomeri scelti per l'ottenimento di nuovi film permselettivi sono stati rappresentati da fenoli non tossici, naturalmente presenti in natura e commerciali a costi medio-bassi. Questi possono essere ricondotti in base alla loro struttura chimica in monomeri basati sui 2-metossifenoli (quali guaiacolo, eugenolo, *isoeugenolo*) e in bifenili idrossilati naturali (magnololo e deidrodieugenolo) costituiti da due anelli aromatici legati da un semplice legame C-C. Questi bifenili possiedono un asse di simmetria dell'asse C<sub>2</sub>, che attraversa perpendicolarmente il legame C-C e che rende indistinguibili i due anelli aromatici nei confronti di qualsiasi interazione o reagente. E' noto che questa simmetria presente nei bifenili studiati consente di ottenere strutture macromolecolari più ordinate rispetto a quelle prive di tale asse di simmetria. Tra i monomeri, il guaiacolo è il 2-metossifenolo più semplice, non possiede alcun sostituente in posizione para all'ossidrile fenolico. L'eugenolo invece possiede una catena alifatica di tipo allilico, mentre l'*isoeugenolo* si distingue per la presenza di un doppio legame vinilico sulla catena alifatica.

Tutti i composti hanno un picco di ossidazione relativamente basso, che conferma le loro proprietà antiossidanti. In particolare, i due bifenili sono noti in letteratura per la loro attività anti-microbica ed anti-infiammatoria (Kadoma *et al.*, 2008; Zhao e Liu, 2011), in particolare il deidrodieugenolo mostra una minore tossicità rispetto all'eugenolo

(Murakami *et al.*, 2003). I bifenili idrossilati occupano un maggiore volume molare rispetto ai monomeri, pur godendo comunque di una certa flessibilità conformazionale dovuta alla libera rotazione attorno al legame C-C che lega i due anelli aromatici. Anche se il deidrodieugenolo risulta più stericamente impedito nella rotazione per via della presenza dei due metossili in *orto*, la struttura bifenilica assicura una certa tridimensionalità nello spazio utile nello stabilire interazioni con proteine ed enzimi (Haiduk *et al.*, 2000).

Mentre la polimerizzazione è accertata per eugenolo (Toniolo *et al.*, 2011), *isoeugenolo* e *guaiacolo* (Milczarek e Ciszewski, 2003) quella per il *magnololo* è stata ipotizzata in base a degli studi sul suo comportamento elettrochimico (Zhou *et al.*, 2010). Anche il deidrodieugenolo, essendo il dimero dell'eugenolo, ha una struttura chimica idonea per essere elettropolimerizzata.

Per determinare il comportamento elettrochimico e il primo picco di ossidazione, tutti i fenoli sono stati sottoposti a voltammetria ciclica (CV). Per tutte le molecole è stata evidenziata la scomparsa del primo picco di ossidazione tra il primo ciclo e i cicli successivi della CV. Questo è il segnale che l'elettrodo è stato ricoperto da un polimero non conduttivo. La formazione di un polimero dai fenoli studiati è stata accertata tramite una seconda tecnica: la amperometria a potenziale costante (CPA). Tramite quest'ultima tecnica si sono applicati potenziali decisamente ossidanti (circa 2 V, vedi Capitolo 2) e un range di bassi potenziali (vedi Capitolo 3). L'aspetto dei polimeri è stato indagato tramite microscopia a scansione elettronica. Le microfotografie mostrano differenze evidenti per *magnololo* e deidrodieugenolo polimerizzato in CPA a potenziali alti (2V) presumibilmente dovute alla capacità dei bifenili di occupare volumi molari più elevati rispetto ai monomeri. Viceversa film più compatti e omogenei sono stati ottenuti in CV. Le microfotografie dei polimeri ottenuti a potenziali più bassi in CPA non hanno evidenziato particolari differenze nell'aspetto dei film.

Le calibrazioni in vitro della risposta di elettrodi rivestiti con i film derivanti dai fenoli sono state osservate rispetto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acido ascorbico e dopamina. La H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è detta molecola reporter perché la sua concentrazione può essere ricondotta alla concentrazione dell'analita. L'acido ascorbico e la dopamina rappresentano due diversi tipi di interferenti; il primo è idrofilo e carico negativamente al pH del tampone usato durante le calibrazioni (pH 7.4). La seconda ha un carattere più lipofilo, e possiede un gruppo

amminico, protonato al pH di lavoro. Dalle correnti ottenute dalle calibrazioni è stato calcolato il parametro di permselettività S%. Questo parametro è un indice della permselettività di un polimero ed è la percentuale del rapporto tra la corrente dovuta alla presenza di un interferente e quella del segnale dovuto alla molecola reporter. Il calcolo di S% ha permesso di confrontare i vari polimeri con i valori dell'PPD, un film permselettivo molto efficace nel ridurre l'interferenza dell'AA, ottenuto secondo quanto presente già in letteratura (Killoran e O'Neill, 2008).

I fenoli naturali hanno dimostrato di formare film con S% molto diverse a seconda della tecniche di elettropolimerizzazione impiegate (CV e CPA). Tutti i valori di S% dei film derivati dalla CV sono significativamente migliori ( $p < 0.05$ ) rispetto alla CPA. Probabilmente le condizioni estremamente ossidative applicate per un tempo piuttosto prolungato (15 minuti) potrebbero aver sovra-ossidato il polimero oppure danneggiato la superficie catalitica del Pt-Ir. In questa fase del lavoro, il poli-magnololo derivato dalla CV è stato il polimero più performante tra i fenoli studiati. Esso mostra valori di S% per la dopamina migliori del PPD (DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% =  $4.53 \pm 0.4$  contro una DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% di  $9.78 \pm 1.01$  per il PPD). Quest'ultimo però rimane il polimero migliore per la schermatura nei confronti dell'acido ascorbico (AA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% per il PPD =  $0.16 \pm 0.02$ ; mentre il poli-magnololo è di  $0.99 \pm 0.08$ ). Verosimilmente la permselettività nei confronti degli interferenti può dipendere dalla modalità di polimerizzazione. Durante la voltammetria ciclica il potenziale parte da 0 e aumenta gradatamente fino a raggiungere il potenziale massimo fissato, quindi ritorna di nuovo a zero per ricominciare con un altro ciclo. All'inizio della CV, i potenziali sono bassi e il polimero si forma più lentamente. Questo potrebbe aiutare la disposizione spaziale durante l'assemblaggio dei monomeri, specialmente per quelle molecole aromatiche provviste di un legame C-C che lega due anelli aromatici attorno ai quali la rotazione è libera. Questo è particolarmente valido per i due bifenili idrossilati. Una rete più stretta escluderebbe l'acido ascorbico, essendo più grande, e permetterebbe alla piccola molecola dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di attraversare il polimero e raggiungere il trasduttore. Sebbene gli esperimenti condotti ad alto potenziale non ci abbiano permesso di ottenere un polimero con le stesse caratteristiche del noto PPD, la differenza tra le due tecniche ci ha suggerito che potenziali più blandi potrebbero determinare un miglioramento della permselettività dei film.

La seconda parte del lavoro ha voluto esplorare potenziali di ossidazioni più bassi nella

prospettiva di potere migliorare la permselectività dei film non sovraossidati. Ognuna delle molecole studiate infatti non necessita di alti potenziali per essere ossidata, tuttavia ognuna è caratterizzata da un meccanismo di ossidazione particolare, dovuto alle diverse possibilità offerte dalla catena alifatica in posizione para all'OH fenolico di stabilizzare la specie ossidata. L'eugenolo dimostra il più alto primo picco di ossidazione tra i fenoli scelti (+313 mV vs Ag/AgCl), determinando una differenza con il più ossidabile *isoeugenolo* di ben 238 mV.

Per applicare condizioni di elettro-polimerizzazione adeguate alle diverse suscettibilità all'ossidazione dei fenoli, i potenziali da applicare durante la polimerizzazione sono stati calcolati a distanze fisse rispetto al loro primo picco di ossidazione. In questa maniera sono stati creati gruppi di polimerizzazione a potenziali di +500, +100, 0 e -50 mV rispetto al primo picco di ossidazione di ogni molecola.

Tutti i fenoli polimerizzati a -50 mV hanno mostrato i migliori valori di permselectività per la dopamina ( $p < 0.05$ ); questo risultato può essere ricondotto alla limitata formazione di cariche negative dopamina-attraenti. Per poter ottenere nuove informazioni circa il meccanismo di repulsione degli interferenti da parte del polimero si potrebbero svolgere, in prospettiva, calibrazioni a pH diversi, in maniera tale da variare lo stato di protonazione dei due interferenti.

Per quanto riguarda l'acido ascorbico deve essere fatto un discorso più articolato. Infatti a potenziali più ossidanti la maggiore presenza di cariche negative determinerebbe una maggiore repulsione elettrostatica per l'acido ascorbico. In realtà solo per eugenolo e *isoeugenolo* sono stati ottenuti le migliori S% nel gruppo a +500 mV; gli altri polimeri respingono meglio l'acido ascorbico anche senza bisogno di una ossidazione più spinta. L'esclusione dell'acido ascorbico può essere dovuta anche a questioni di dimensioni molecolari. I bifenili idrossilati deidroieugenolo e magnololo mostrano a -50 mV la loro più alta efficienza nel respingere l'acido ascorbico: quindi si può ipotizzare che formino una rete più compatta. I risultati ottenuti ai potenziali più bassi sembrano facilitare un fitto ed ordinato assemblaggio delle molecole nel polimero.

Le modalità di polimerizzazione sono in grado di influire anche sulla stabilità nel tempo della permselectività dei film. La PPD dimostra un lieve peggioramento della permselectività per l'acido ascorbico, e peggiorando di 9 volte rispetto al giorno 1 quella



per la dopamina ( $p < 0.05$ ).

I film polimerici ottenuti ad alti potenziali peggiorano moderatamente col tempo; ciononostante a 14 giorni i polimeri ottenuti in CV conservano la loro superiorità rispetto a quelli ottenuti in CPA a alti potenziali ( $p < 0.05$ ).

Per quanto riguarda i bassi potenziali, il gruppo dei fenoli ossidati a -50 mV si riconferma il migliore nel respingere la dopamina, con valori di S% sostanzialmente invariati nel tempo. Solo il deidrodieugenolo peggiora significativamente passando da una DA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> S% del giorno 1 di  $0.27 \pm 0.01$  al  $9.04 \pm 0.05$  del giorno 14. Anche sul fronte dell'acido ascorbico, differentemente dal giorno 1, i polimeri che mostrano i valori migliori di S% sono quelli polimerizzati a -50 mV. L'invecchiamento per questi polimeri sembra possedere una certa dinamicità ancora una volta riconducibile ad una più lenta polimerizzazione; è possibile che il basso potenziale ossidativo abbia causato la deposizione di oligomeri a basso peso molecolare e che questi trovino col tempo l'assemblaggio migliore grazie alle interazioni che si possono instaurare nel tempo, interazioni strettamente legate alla struttura e funzionalità del fenolo. Con una spinta ossidativa più grande, verosimilmente, le catene oligomeriche saranno più lunghe e ramificate e meno ordinate, impedendone un successivo riarrangiamento. Tra questi il guaiacolo e l'eugenolo rimangono stabili, non dimostrando alcuna differenza significativa tra il giorno 1 e 14 ( $p < 0.05$ ).

Per i polimeri dei due bifenili idrossilati si osserva invece un invecchiamento opposto: il magnololo migliora ulteriormente la permselectività per l'acido ascorbico, mentre il deidrodieugenolo peggiora. Questo potrebbe essere dovuto alla minore libertà conformazione del deidrodieugenolo, stericamente impedito dalla presenza dei metili in *orto* all'OH fenolico che non permette la formazione di un film permselectivo ordinato. Nonostante il marcato miglioramento dopo 14 giorni del poli-*isoeugenolo* polimerizzato-50 mV, che dimostra il valore migliore di permselectività dopo 14 giorni, il poli-magnololo è stato considerato la migliore alternativa al PPD perché si presenta fin da subito dopo la sua polimerizzazione estremamente efficiente. Nelle condizioni di polimerizzazione utilizzate, ad un valore di -50 mV dal primo picco di ossidazione sotto potenziale costante, il magnololo ha formato un film permselectivo perfettamente in grado di competere con il PPD ( $p < 0.05$ ). Inoltre presenta una migliore esclusione della dopamina ( $p < 0.05$ ) e le sue caratteristiche migliorano con il tempo. L'elevata lipofilità

del magnololo rispetto all'*isoeugenolo* consente di registrare una migliore permselettività nei confronti della dopamina, molecola dalle caratteristiche lipofile, anche dopo 14 giorni di conservazione dell'elettrodo. Il poli-magnololo si è dimostrato un ottimo film permselettivo per due differenti biosensori; il poli-magnololo ottenuto negli esperimenti in CV ha mantenuto le sue proprietà con la glucosio ossidasi; mentre il poli-magnololo polimerizzato in CPA al più basso potenziale sperimentato è stato utilizzato sul biosensore basato sulla AChE/ChO precedentemente descritto (Capitoli 2 e 3).

Per poter ulteriormente migliorare il prototipo iniziale del biosensore dal punto di vista della sostenibilità, come alternativa alla PEI è stata candidata la  $\beta$ -ciclodestrina ( $\beta$ CD). Questa molecola è entrata nell'uso comune di preparazioni cosmetiche e farmaceutiche e dal punto di vista alimentare è considerato un additivo sotto la sigla E459. Il suo successo commerciale deriva dal fatto che ha una bassa tossicità ( $LD_{50}$  nel topo: > 5000 mg/kg), è disponibile in un alto grado di purezza e a bassi costi industriali (4 Euro al Kg). La  $\beta$ CD è considerata una molecola green e sostenibile perché deriva dalla degradazione degli scarti dell'amido. Da un punto di vista biotecnologico essa è stata usata per le sue proprietà di stabilizzatore enzimatico. Dal punto di vista chimico è un macrociclo composto da sette unità di glucopiranosio legate da un legame glucosidico  $\alpha(1-4)$ . La sua struttura ad anello è ascrivibile a un tronco di cono cavo, definita in maniera geometrica come toroide. La particolare disposizione dei gruppi alcolici delle unità zuccherine determina un'altra caratteristica del toroide: l'amfipaticità. L'esterno della  $\beta$  ciclodestrina è idrofilico per la presenza degli ossidrili legati ai carboni C2, C3 e C6 delle unità, mentre l'interno –la cavità- è lipofila ed è in grado di poter includere al suo interno molecole di carattere idrofobo. Quando una molecola di dimensioni adeguate alla cavità riesce a stabilire delle interazioni abbastanza forti con la cavità della  $\beta$ CD, si forma un complesso d'inclusione costituito dalla molecola *guest* e dal macrociclo *host*. I complessi di inclusione determinano in genere una migliore stabilità del *guest* e ne aumentano o ne rendono addirittura possibile la solubilità in acqua e quindi la sua veicolazione.

Per potenziarne e ampliarne l'uso all'interno di un biosensore la  $\beta$ CD è stata modificata con una serie di molecole attraverso diverse procedure, tutte sostenibili. Come agenti di modifica sono stati utilizzati: l'acido policarbossilico 1,2,3,4-butantetracarbossilico (BTCA), il gliceroldiglicidilietere (GDGE) e il dimetilcarbonato (DMC). Le procedure legate al DMC non hanno portato ad alcun modificazione della  $\beta$ CD, probabilmente a

causa della bassa reattività degli ossidrili del C6. Il GDGE, che porta due funzioni epossidiche all'estremità della molecola è caratterizzato da una grande reattività: l'anello epossidico a tre termini è infatti sottoposto a tensione e tende a subire attacchi da nucleofili, favoriti da un ambiente basico. Dai risultati ottenuti la parte epossidica del GDGE nelle reazioni con la  $\beta$ CD non risulta alterata, mentre si può evincere una interazione molecolare *guest-host* tra il macrociclo ed il GDGE. Da quanto presente in letteratura per un reagente simile al GDGE, la mancata reazione è da imputarsi alla limitata solubilità in acqua della  $\beta$ CD nelle condizioni adottate. Non potendo ottenere una sufficiente concentrazione l'equilibrio della reazione può venire spostato verso la formazione di interazioni con le molecole di acqua. Il prodotto di queste interazioni  $\beta$ CD-GDGE presenta un aspetto di gel, solubile in acqua; tuttavia questa potrebbe essere una ottima rete per immobilizzare l'enzima. Inoltre, vista la presenza della  $\beta$ CD e dei residui alcolici del GDGE, il complesso GDGE- $\beta$ CD ha le caratteristiche per poter stabilizzare l'attività enzimatica. Tuttavia i gruppi epossidici del GDGE potrebbero reagire con l'enzima, causandone la disattivazione sebbene questo fenomeno dovrebbe essere molto mitigato in condizioni fisiologiche. Considerando gli aspetti controversi nell'utilizzo del complesso GDGE- $\beta$ CD su un biosensore verrà data priorità negli studi successivi all'altra serie di complessi ottenuti tra il BTCA e la  $\beta$ CD.

Nelle condizioni sperimentali adottate sono stati ottenuti diversi complessi tra il BTCA e la  $\beta$ CD. La formazione del complesso è favorita dalla formazione della anidride del BTCA. In particolare la struttura della anidride a cinque termini presenta una forte affinità per la cavità della  $\beta$ CD. A supportare l'ipotesi concorrono le evidenze sperimentali dei chemical shift dei protoni della  $\beta$ CD e il precedente in letteratura della formazione di un complesso tra l'anidride succinica – molto simile a quella del BTCA – e la  $\beta$ CD (Lisnyak *et al.*, 2007). Tutte le preparazioni dei complessi BTCA- $\beta$ CD hanno alte rese, sono stabili e solubili in acqua e sono state condotte in condizioni sostenibili. In particolare il complesso è stato ottenuto in forma neat, cioè in presenza dei soli reagenti, tramite l'uso del microonde. La complessazione col BTCA ha permesso di migliorare la solubilità della  $\beta$ CD in acqua, inoltre ha introdotto dei gruppi carbossilici, che possono aiutare nella repulsione elettrostatica degli interferenti oppure essere usati come aggancio per antigeni (Wajs *et al.*, 2014).

Vista la possibilità di poter includere nella  $\beta$ CD anche i fenoli usati come monomeri nello

studio precedente si è proceduto alla complessazione di eugenolo, guaiacolo e magnololo. Sono state messe a punto diverse procedure per l'ottenimento di complessi tra la  $\beta$ CD e i fenoli. Il complesso  $\beta$ CD–eugenolo, ottenuto in resa dell'85%, mostra una modificazione del segnale del H5 della  $\beta$ CD e la presenza dei segnali ben risolti dell'eugenolo in soluzione. E' stata confermata anche la formazione del complesso  $\beta$ CD-guaiacolo, sebbene con una resa inferiore (47%). La ragione di questo può essere imputata alle diverse solubilità dei due fenoli; l'eugenolo è completamente insolubile in acqua, questo sposta gli equilibri verso la formazione del complesso  $\beta$ CD-eugenolo; il guaiacolo invece ha un parziale solubilità in acqua, per cui la formazione del complesso  $\beta$ CD-guaiacolo è in competizione con il processo di solubilizzazione del *guest*. Analisi NMR ripetute a distanza hanno confermato una stabilità nel tempo per almeno 2 settimane dei due complessi fenolo- $\beta$ CD in ambiente acquoso. D'altra parte, differenti condizioni di complessazione, compresa la tecnologia alle microonde, non hanno avuto successo nell'ottenimento di un complesso d'inclusione  $\beta$ CD-magnololo probabilmente a causa delle dimensioni del magnololo non ideali per l'inclusione nella cavità della  $\beta$ CD. Solo per motivi di tempo, i due fenoli rimanenti, *isoeugenolo* e *deidroieugenolo*, non sono stati sottoposti a tentativi di inclusione.

La  $\beta$ CD ha dimostrato una straordinaria affinità per un composto fenolico utilizzato nella concia green delle pelli (S-PhOH). Il composto è stato fornito dalla ditta Chemiplastica Specialties SpA e ha interessanti proprietà. La parte fenolica è responsabile della sua elettropolimerizzazione nonché, presumibilmente, della sua inclusione. Inoltre possiede gruppi contenenti zolfo, simili a diversi polimeri utilizzati per l'immobilizzazione enzimatica in biosensori (Ciobanu *et al.*, 2009).

L'elettropolimerizzazione del S-PhOH è stata messa a punto sulla base di studi preliminari sulle sue proprietà elettrochimiche. Applicando un potenziale di +900 mV vs Ag/AgCl su degli elettrodi di platino immersi in una soluzione del S-PhOH si ottengono dei sensori dalle caratteristiche particolari. I sensori basati sul S-PhOH perdono o conservano la capacità di respingere l'acido ascorbico a seconda delle condizioni in cui vengono conservati. Gli esperimenti hanno evidenziato come mantenere i sensori a contatto con determinate quantità di acido ascorbico (da 0.1 mM a 10 mM) ne conservi le capacità permselective. Mentre condizioni ossidanti come potenziali ossidativi alterano completamente il funzionamento dei sensori. Per altri polimeri in grado di respingere

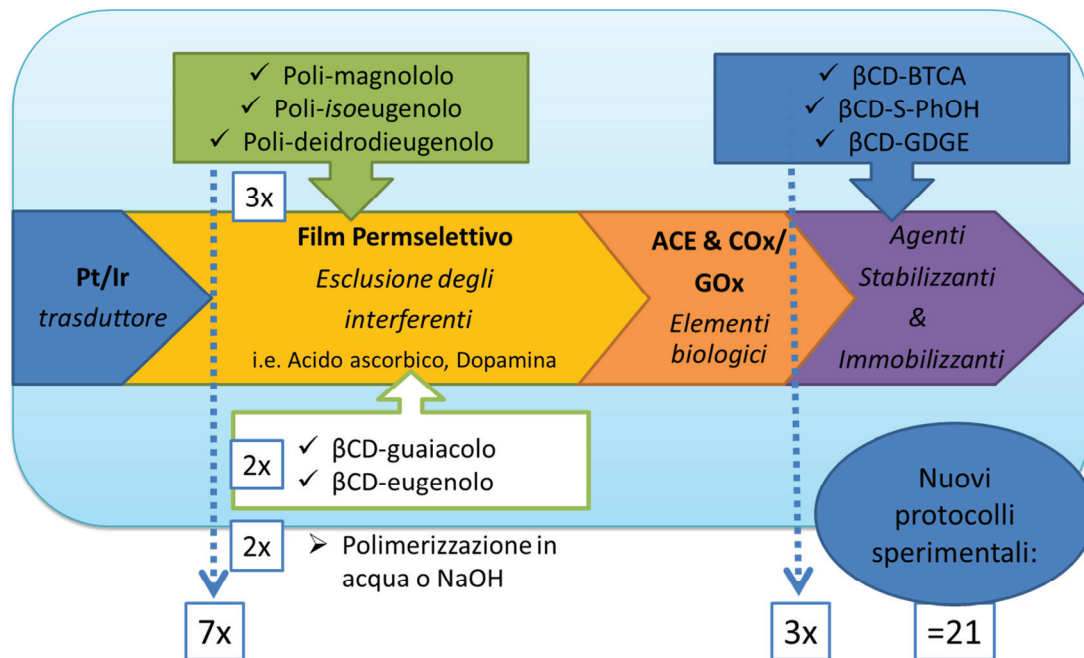
l'acido ascorbico, come la PPD, è stato osservato un fenomeno simile: il polimero aumenta la capacità di respingere l'interferente all'aumento della concentrazione dello stesso in fase di calibrazione. Il meccanismo alla base è stato denominato *self-blocking* (Rothwell et al., 2008) e ipotizza come nelle maglie del polimero possano venire intrappolati l'interferente stesso o il suo prodotto di ossidazione, il deidroascorbato (DHA). Questo intrappolamento determina una maggiore repulsione in due modi: esaurendo i passaggi disponibili nel polimero e per repulsione elettrostatica dovuta allo stato deprotonato dell'acido ascorbico. Mentre per il PPD il fenomeno si manifesta durante le calibrazioni, cioè a potenziale applicato e nei temi della misurazione, per il polimero del S-PhOH è stato osservato anche in assenza di potenziale e per tempi più lunghi. Inoltre l'acido ascorbico viene respinto in maniera altrettanto efficace quando i sensori rimangono a contatto con il DHA o l'acido ascorbico stesso. Vista la mancanza di carica del DHA, il fenomeno repulsivo non sembra legato a fenomeni elettrostatici, ma piuttosto a una questione di dimensione della molecola; DHA e AA determinano infatti un simile fenomeno repulsivo e sono simili per struttura e dimensione. I sensori basati sul conciate possono essere usati per tracciare la presenza dell'acido ascorbico: una sua deplezione determinerebbe la perdita delle caratteristiche del polimero. L'uso dell'acido ascorbico come additivo alimentare sotto la sigla E300 fa intravedere degli sbocchi applicativi per questo sensore.

Il S-PhOH è stato inoltre sottoposto a complessazione con la  $\beta$ CD. Il complesso S-PhOH- $\beta$ CD è caratterizzato da una marcata interazione tra host e guest e può essere ottenuto con una conversione totale dei reagenti tramite diverse condizioni sperimentali quali microonde, coprecipitazione, sonicazione e evaporazione del solvente sotto vuoto (Rotavapor). La prolungata stabilità nel tempo, la completa solubilità in acqua e i gruppi funzionali introdotti dal S-PhOH rendono il complesso interessante per un suo uso nella costruzione di biosensori.

I nuovi componenti sostenibili ottenuti sono stati riassunti nello Schema 2, che riporta anche le prospettive aperte dal loro ottenimento. Un buon biosensore è una "macchina" in cui si incontrano "ingranaggi" che hanno origini tra le più disparate, ad esempio un enzima che viene immobilizzato su di una superficie metallica. Il funzionamento di questo dispositivo è dato dalla interazione biologica che ne sta alla base, il *buon* funzionamento dipende dalla sinergia e compatibilità tra le parti. Nella tesi è stata

dimostrata la validità dell'interazione tra AChE e aflatoxina, e in maniera meno evidente per la patulina. Il prototipo è stato migliorato introducendo il poli-magnololo, un film permselectivo ottenuto da un monomero naturale. La sperimentazione, dopo un attento confronto e selezione dei risultati ottenuti da sei diversi protocolli sperimentali per ogni monomero naturale, ha permesso di stabilire il magnololo come il migliore del pool di fenoli.

Lo Schema 2 ci fa intravedere le possibilità date dalle alternative a disposizione. Come film permselectivi possiamo scegliere tra poli-magnololo ma anche il poli-*isoeugenolo* e il poli-deidrodieugenolo (3 alternative); film polimerici diversi si possono ottenere dai complessi ottenuti con eugenolo e guaiacolo (altre 2 alternative); inoltre il complesso offre la possibilità di condurre la polimerizzazione in acqua o nelle condizioni finora utilizzate (2 complessi in 2 differenti condizioni significa 4 alternative). Fin qui abbiamo 7 valide opzioni per un nuovo film permselectivo. Le alternative per un nuovo stabilizzatore enzimatico sono rappresentate dalle 3  $\beta$ CD modificate con BTCA, il composto S-PhOH e il GDGE. Il numero dei diversi protocolli sperimentali è di 21 combinazioni, ognuna con i suoi diversi vantaggi, purtroppo non ancora studiati per mancanza di tempo.



Schema 2 - Schema e delle prospettive aperte dai risultati ottenuti: la spunta indica i composti già ottenuti e caratterizzati. Le frecce riconducono al numero di possibili variabili che possono essere inserite in un biosensore, il numero delle combinazioni possibili e quindi dei possibili protocolli sperimentali di un biosensore (considerando un solo tipo di enzima) è uguale a 21.

Un biosensore in ultima analisi non può essere ridotto schematicamente a una parte biologica e a una non biologica. Una semplificazione del genere è estremamente utile per la loro classificazione e distinzione, ma il funzionamento di questi dispositivi non è prevedibile dalla somma delle sue parti.



## 11. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio i miei tutors: dott.ssa Giovanna Delogu, prof. Quirico Migheli e prof. Pier Andrea Serra.

Ringrazio l'University College of Dublin e il prof. Robert O'Neill per l'ospitalità e la consulenza offerte.

Ringrazio il gruppo di ricerca all'ICB-CNR Sassari: dott.ssa Antonella Dettori e dott. Davide Fabbri.

Ringrazio dott. Antonio Barberis e l'ISPA-CNR di Sassari per l'accoglienza.

Ringrazio il dott. Giammario Calia e dott. Stefano Fiori.

Ringrazio il Qatar National Research Fund (membro della Qatar Foundation).

Ringrazio la Chemiplastica S.r.l. per aver fornito il composto fenolico S-PhOH.

## 12. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., del Torno-de Román, L. and Arcos-Martínez, M.J. (2011) Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A. *Anal Chim Acta* 688, 49–53.

Anandam, S. and Selvamuthukumar, S. (2014) Optimization of microwave-assisted synthesis of cyclodextrin nanosponges using response surface methodology. *J Porous Mater* 21, 1015-1023.

Arduini, F., Errico, I., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G. and Moscone, D. (2007) Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition. *Anal Chem* 79, 3409-3415.

Arteaga, J.F., Ruiz-Montoya, M., Palma, A., Alonso-Garrido, G., Pintado, S., Rodríguez-Mellado (2012) Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles, *Molecules*, 17, 5126-5138.

Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. and Wogan, G.N. (1963) Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* 85, 1706–1707.

Atsumi, T., Fujisawa, S. and Tonosaki, K. (2005) A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenolo with various concentrations and oxidant conditions. *Toxicol in vitro* 19, 1025-1033.

Azer, M. and Cooper, C. (1991) Determination of aflatoxins in food using HPLC and a commercial ELISA system. *J Food Protect* 54, 291-294.

Barberis, A., Bazzu, G., Calia, G., Puggioni, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Schirra, M., Desole, M.S., Serra, P.A. (2010) New ultralow-cost telemetric system for a rapid electrochemical detection of vitamin C in fresh orange juice. *Anal Chem* 82, 5134–5140.

Barberis, A., Fadda, A., Schirra, M., Bazzu, G. and Serra, P.A. (2012) Detection of postharvest changes of ascorbic acid in fresh-cut melon, kiwi, and pineapple, by using a low cost telemetric system. *Food Chem* 135, 1555–1562.

Barberis, A., Spissu, Y., Bazzu, G., Fadda, A., Azara, E., Sanna, D., Schirra, M. and Serra, P.A. (2014) Development and characterization of an ascorbate oxidase-based sensor-biosensor system for telemetric detection of AA and antioxidant capacity in fresh orange juice. *Anal Chem* 86, 8727-8734.

Bazzu, G., Puggioni, G., Dedola, S., Calia, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Desole, M.S., Lowry, J.P., O'Neill, R.D. and Serra, P.A. (2009) Real-time monitoring of brain tissue oxygen using a miniaturized biotelemetric device implanted in freely moving rats. *Anal Chem* 81, 3911–3918.

Bennett, J.W. and Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16, 497–516.

Bertrand, F., Basketter, D.A., Roberts, D.W. and Lepoittevin, J.P. (1997) Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol* 10, 335-343.

Bolivar, J.M., Rocha-Martin, J., Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M. (2009) Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *Biomacromolecules*, 10, 742–747.

Bonel, L., Vidal, J.C., Duato, P. and Castillo, J.R. (2011) An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer. *Biosens Bioelectron* 26, 3254–3259.

Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A. and Callea, A. (2010) Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chem*, 118, 256–265.

Boscolo, B., Trotta, F. and Ghibaudi, E. (2010) High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges, *J Mol Catal B Enzym* 62, 155–161.

Brondani, D., Weber Scheeren, C., Dupont, J. and Cruz Vieira, I. (2009) Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. *Sens Actuators B Chem* 140, 252-259.

Calia, G., Monti, P., Marceddu, S., Dettori, M.A., Fabbri, D., Jaoua, S., O'Neill, R.D., Serra, P.A., Delogu, G. and Migheli, Q. (2015) Electropolymerized phenol derivatives as permselective polymers for biosensor applications. *Analyst* 140, 3607-15.

Calia, G., Rocchitta, G., Migheli, R., Puggioni, G., Spissu, Y., Bazzu, G., Mazzarello, V., Lowry, J.P., O'Neill, R.D., Desole, M.S. and Serra, P.A. (2009) Biotelemetric Monitoring of Brain Neurochemistry in Conscious Rats Using Microsensors and Biosensors. *Sensors* 9, 2511–2523.

Calvo, E.J., Etchenique, R., Danilowicz, C. and Diaz, L. (1996) Electrical communication between electrodes and enzymes mediated by redox hydrogels. *Anal Chem* 68, 4186-4193.

Camacho, C., Chico, B., Cao, R., Matías, J.C., Hernández, J., Palchetti, I., Simpson, B.K., Mascini, M. and Villalonga, R. (2009) Novel enzyme biosensor for hydrogen peroxide via supramolecular associations. *Biosens Bioelectron* 24, 2028–2033.

Campas, M., Garibo, D. and Prieto-Sim, B. (2012) Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. *Analyst* 137, 1055–1067.

Castillo, G., Spinella, K., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Mosiello, L. and Hianik, T. (2015) Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control* 52, 9-18.

Castro, E.A. and Barbiric, D.A.J. (2002) Current theoretical methods applied to study cyclodextrins and their complexes. *J Arg Chem Soc* 90, 1-44.

Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., Brereton, P. (2004) Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1059, 13-16.

Chauhan, R., Solanki, P.R., Singh, J., Mukherjee, I., Basu, T. and Malhotra, B.D. (2015) A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut. *Food Control* 52, 60-70.

Chen, J., Fang, Z., Liu, J. and Zeng, L. (2012) A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer. *Food Control* 25, 555-560.

Choi, S.W., Chang, H.J., Lee, N. and Chun, H.S. (2011) A surface plasmon resonance sensor for the detection of deoxynivalenol using a molecularly imprinted polymer. *Sensors* 11, 8654-8664.

Ciobanu, M., Marin, L., Cozan, V. and Bruma, M (2009) Aromatic polysulfones used in sensor applications. *Rev Adv Mater Sci* 22, 89-96.

Ciszewski, A. and Milczarek, G. (1998) A new Nafion-free bipolymeric sensor for selective and sensitive detection of nitric oxide. *Electroanalysis* 10, 791-793.

Ciszewski, A. and Milczarek, G. (1999) Poly Eugenol-modified platinum electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Anal Chem* 71, 1055-1061.

Ciszewski, A. and Milczarek, G. (2001) Preparation and general properties of chemically modified electrodes based on electrosynthesized thin polymeric films derived from eugenol. *Electroanalysis* 13, 860-867.

Clark, L.C. and Lyons, C. Jr. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 102, 29-45.

Cosnier, S. and Holzinger, M. (2011) Electrosynthesized polymers for biosensing. *Chem Soc Rev* 40, 2146-2156.

Craig, J.D. and O'Neill, R.D. (2003) Comparison of simple aromatic amines for electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication. *Analyst* 128, 905-911.<sup>a</sup>

Craig, J.D. and O'Neill, R.D. (2003) Electrosynthesis and permselective characterization of phenol-based polymers for biosensor application. *Anal Chim Acta* 495, 33-43.<sup>b</sup>

Crini, G. (2005) Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog Polym Sci* 30, 38-70.

Cserhati, T. and Forgacs, E. (1994) Retention of some monoamine oxidase inhibitory drugs on a  $\beta$ -cyclodextrin polymer-coated silica column. *J Chromatogr* 660, 313-318.

Cserhati, T., Fenyvesi, E. and Szejti, (1992) Interaction of nonylphenyl and tributylphenyl ethylene oxide ionic surfactants with highly soluble cyclodextrin derivatives. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 14, 181-188.

D'Souza, V.T. and Lipkowitz, K.B. (1998) Cyclodextrin. *Chemistry Review* 98, 1741-2076.

da Silva, C.P., Franzoi, A.C., Fernandes, S.C., Dupont, J. and Vieira, I.C. (2013) Development of biosensor for phenolic compounds containing PPO in  $\beta$ -cyclodextrin modified support and iridium nanoparticles. *Enzyme Microb Technol* 52, 296–301.

Dai, Y.Q. and Shiu, K.K. (2004) Highly Sensitive Amperometric Glucose Biosensor Based on Glassy Carbon Electrode with Copper/Palladium. Coating *Electroanalysis*, 16, 1806–1813.

De Farias Dias, A. (1988) An improved high yield synthesis of dehydrodieugenol. *Phytochemistry*, 27, 3008-3009.

De Smet, D., Monbaliu, S. Dubruel, P., Van Peteghem, C., Schacht, E. and De Saeger, S. (2010) Synthesis and application of a T-2 toxin imprinted polymer. *J Chromatogr A* 1217, 2879–2886.

Del Valle, E.M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 39,1033-1046.

Devadas, B., Rajkumar, M. and Chen, S.M. (2014) Electropolymerization of curcumin on glassy carbon electrode and its electrocatalytic application for the voltammetric determination of epinephrine and *p*-acetoaminophenol. *Colloids surf B Biointerfaces* 116, 674-680.

Díez, P., Piuleac, C.G., Martínez-Ruiz, P., Romano, S., Gamella, M., Villalonga, R. and Pingarrón, J.M. (2013) Supramolecular immobilization of glucose oxidase on gold coated with cyclodextrin-modified cysteamine core PAMAM G-4 dendron/Pt nanoparticles for mediatorless biosensor design. *Anal Bioanal Chem* 405, 3773-3781.

El Ghouli, Y., Martel, B., Morcellet, M., Campagne, C., El Achari, A. and Roudesli, S. (2007) Mechanical and physico-chemical characterization of cyclodextrin finished polyamide fibers. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 57,47-52.

Franzoi, A.C., Vieira, I.C., Scheeren, C.W. and Dupont, J. (2010) Development of a quercetin biosensor through immobilizing laccase in a modified  $\beta$ -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. *Electroanalysis* 22, 1376-1385.

Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y. and Sakagami, H. (2002) Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177, 39-54.

Fujisawa, S., Atsumi, T., Murakami, Y. and Kadoma, Y. (2005) Dimerization, ROS formation, and biological activity of *o*-methoxyphenols. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53, 28-38.

Fujita, S. and Taira, J. (1994) Biphenyl compounds are hydroxyl radical scavengers: their effective inhibition for UV-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA102. *Free Radic Biol Med*, 17, 273-277.

Fukukawa, K. and Ueda, M. (2008) Recent progress of photosensitive polyimides. *Polymer J* 40, 281-296.



Gajanovic-Eichelmann N., Ehrentreich-Förster, E. and Bier, F.F. (2003) Direct immobilization of nucleic acids at ultramicroelectrodes using a novel electro-deposited polymer. *Biosens Bioelectron* 19, 417-422.

Gan, N., Zhou, J., Xiong, P., Hu, F., Cao, Y., Li, T. and Jiang, Q. (2013) An ultrasensitive electrochemiluminescent immunoassay for Aflatoxin M1 in milk, based on extraction by magnetic graphene and detection by antibody-labeled CdTe quantum dots-carbon nanotubes nanocomposite. *Toxins* 5, 865-883.

Garg, A., Gupta, B., Prakash, R. and Singh, S. (2010) Preparation and characterization of hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and  $^1\text{H-NMR}$ . *Chem Pharm Bull* 58, 1313-1319.

Giorno, L., Drioli, E. and Carvoli, G. (2001) Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of L-malic acid. *Biotechnol Bioeng* 72, 77-84.

Girek, T. and Ciesielski, W. (2011) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with succinic anhydride and thermogravimetric study of the polymers. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 69, 439-444.

Gorek, T., Kozłowski, C.A., Koziol, J.J., Walkowiak, W. and Korus, I. (2005) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with succinic anhydride. Synthesis, characterization, and ion flotation of transition metals. *Carbohydr Polym* 59, 211-215.

Hajduk, P.J., Bures, M., Praestgaard, J. and Fesik S.W. (2000) Privileged molecules for protein binding identified from NMR-based screening. *J Med Chem* 43, 3443–3447.

Hall, S.B., Khudaish, E.A. and Hart, A.L. (1998) Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part II: effect of potential. *Electrochim acta* 43, 2015-2024.

Hansmann, T., Sanson, B., Jure, S., Weik, M., Marty, J.L. and Fournier, D. (2009) Kinetic insight into the mechanism of cholinesterase inhibition by aflatoxin B1 to develop biosensors. *Biosens Bioelectron* 24, 2119–2124.

Hashidzume, A., Yamaguchi, H. and Harada, A. (2014) Cyclodextrin-Based Molecular Machines. *Top Curr Chem* 354, 71–110.

Huang, W., Gan, T., Luo, S., Zhang, S. (2013) Sensitive and selective electrochemical sensor for magnolol based on the enhancement effect of multiwalled carbon nanotubes. *Ionics*, 19, 1303-1307.

Jiang, M., Braiek, M., Florea, A., Chrouda, A., Farre, C., Bonhomme, A., Bessueille, F., Vocanson, F., Zhang, A. and Jaffrezic-Renault, N. (2015) Aflatoxin B1 detection using a highly-sensitive molecularly-imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized metal organic framework. *Toxins* 7, 3540-3553.

Jiménez, M., Mateo, J.J. and Mateo, R. (2000) Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr A* 870, 473–481.

Jing-Juan, X. and Hong-Yuan, C. (2000) Amperometric glucose sensor based on coimmobilization of glucose oxidase and Poly(p-phenylenediamine) at a platinum microdisk electrode. *Anal Biochem*, 280, 221-226.

Kadoma, Y., Ito, S., Yokoe, I. and Fujisawa, S. (2008) Comparative study of the alkyl and peroxy radical-scavenging activity of 2-t-butyl-4-methoxyphenol (BHA) and its dimer, and their theoretical parameters. *In Vivo*, 22, 289-296.

Kaushik, A., Arya, S.K., Vasudev, A. and Bhansali, S. (2013) Recent Advances in Detection of Ochratoxin-A. *Crit Rev Biotechnol* 2, 1-11.

Killoran, S.J. and O'Neill, R.D. (2008) Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochim Acta*, 53, 77303-7312.

Kirwan, S.M., Rocchitta, G., McMahon C.P., Craig, J.D., Killoran, S.J., O'Brien, K.B., Serra P.A., Lowry, J.P. and O'Neill, R.D. (2007) Modifications of poly(o-phenylenediamine) permselective layer on Pt-Ir for biosensor application in neurochemical monitoring. *Sensors* 7, 420-437.

Komiyama, M. and Hirai, H. (1987) Preparation of immobilized  $\beta$ -cyclodextrins by use of alkanediol diglycidyl ethers as crosslinking agents and their guest binding abilities. *Polymer J* 19, 773-775.

Kono, H. and Nakamura, T. (2013) Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride: synthesis, structural characterization, and bisphenol A adsorption capacity. *React Funct Polym*, 73 1096-1102.

Lisnyak, Y.V., Martynov, A.V., Baumer, V.N., Shishkin, O.V. and Gubskaya, A.V. (2007) Crystal and molecular structure of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with succinic acid. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 58, 367-375.

Liu, T., Zheng, X., Huang, W. and Wu, K. (2008) Voltammetric detection of magnolol in Chinese medicine based on the enhancement effect of mesoporous Al/SiO<sub>2</sub>-modified electrode. *Colloids surf B Biointerfaces* 65, 226-229.

Liu, Y., Yu, B., Hao, J. and Zhou, F. (2011) Amination of surfaces via self-assembly of dopamine. *J Colloid Interface Sci* 362,127-34.

Loftsson, T. and Brewster, M.E. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *J Pharm Sci* 85, 1017-1025.

Lucarini, M., Pedulli, G.F., Valgimigli, L., Amorati, R. And Minisci, F. (2001) Thermochemical and Kinetic Studies of a Bisphenol Antioxidant. *J Org Chem*, 66, 5456-5462.

López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P. and García-Carmona, F. (2014) Cyclodextrins and antioxidants. *Crit Rev Food Sci* 54, 251-276.

Ma, M., Miao, Z., Zhang, D., Du, X., Zhang, Y., Zhang, C., Lin, J. and Chen, Q. (2015) Highly-ordered perpendicularly immobilized FWCNTs on the thionine monolayer-modified electrode for hydrogen peroxide and glucose sensors. *Biosens Bioelectron* 64, 477-484s.

Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L. and Zambonin, P.G. (1990) Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film. *Anal Chem* 62, 2735-2740.

Maragos, C.M. and Busman, M. (2010) Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Addit Contam Part A* 27, 688-700.

Martel, B., Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y. and Morcellet, M. (2005) Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: a study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci* 97, 433-442.

Matsuhisa, H., Tsuchiya, M. and Hasebe, Y. (2013) Protein and polysaccharide-composite sol-gel silicate film for an interference-free amperometric glucose biosensor. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 111, 523-529.

Medronho, B., Andrade, R., Vivod, V., Ostlund, A., Miguel, M.G., Lindman, B., Voncina, B. and Valente, A.J.M. (2013) Cyclodextrin-grafted cellulose: Physico-chemical characterization. *Carbohydr. Polym* 93, 324-330.

Meulenberg, E.P. (2012) Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. *Toxins* 4, 244-266.

Milczarek, G. and Ciszewski, A. (2003) Permselective Properties of Electropolymerized Guaiacol Derivatives. *Electroanalysis*, 15, 529-532.

Milczarek, G. and Ciszewski, A. (2012) Functionalized gold nanoparticles and films stabilized by *in situ* formed polyeugenol. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 90, 53-57.

Mitchell, K.M. (2004) Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensors characterized in vitro and in vivo. *Anal Chem* 76, 1098-1106.

Miyazawa, M. and Hisama, M. (2003) Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *J Agric Food Chem*, 51, 6413-6422.

Murakami, Y., Kawata, A., Seki, Y., Koh, T., Yuhara, K., Maruyama, T., Machino, M., Ito, S., Kadoma, Y., Fujisawa, S. (2012) Comparative inhibitory effects of magnolol, honokiol, eugenol and bis-eugenol on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappa B activation in RAW264.7 macrophage-like cells stimulated with fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *In Vivo*, 26, 941-950.

Murakami, Y., Shoji, M., Hanazawa, S., Tanaka, S. and Fujisawa, S. (2003) Preventive effect of bis-eugenol, a eugenol *ortho* dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear

factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. *Prog Biochem Pharmacol*, 66, 1061–1066.

Murata, M., Nishimura, T., Chen, F. and Kawanishi, S. (2006) Oxidative DNA damage induced by hair dye components ortho-phenylenediamines and the enhancement by superoxide dismutase. *Mutat Res*, 607, 184–191.

Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S. and Endo, T. (1997) Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. *J Am Oil Chem Soc* 74, 557-562.

Ohnuki, Y., Matsuda, H., Ohsaka, T. and Oyama, N. (1983) Permselectivity of films prepared by electrochemical oxidation of phenol and amino-aromatic compounds. *J Electroanal Chem* 158, 55-67.

Okumura, L.L., Stradiotto, N.R., Rees, N.V. and Compton R.G. (2008) Modifying glassy carbon (GC) electrodes to confer selectivity for the voltammetric detection of L-cysteine in the presence of DH-homocysteine and glutathione. *Electroanalysis* 20, 916-918.

Oldenzien, W.H., Dijkstra, G., Cremers, T.I.F.H. and Westerink, B.H.C. (2006) Evaluation of hydrogel coated glutamate microsensors. *Anal Chem* 78, 3366-3378.

O'Neill, R.D., Lowry, J.P., Rocchitta, G., McMahon, C.P. and Serra, P.A. (2008) Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring in vivo. *Trends Anal Chem*, 27, 78–88.

Ozmen, E.Y., Sezgin, M. and Yilmaz, M. (2009) Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B Enzym* 57, 109–114.

Oztekin, Y., Yazicigil, Z., Ramanaviciene, A. and Ramanavicius, A. (2011) Polyphenol-modified glassy carbon electrodes for copper detection. *Sensor Actuat B-Chem* 152, 37-48.

Pascale, M., De Girolamo, A., Visconti, A., Magan, N., Chianella, I., Piletska, E.V. and Piletsky, S.A. (2008) Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis. *Anal Chim Acta* 609, 131–138.

Patel, B.A., Arundell, M., Parker, K.H., Yeoman, M.S. and O'Hare, D. (2006) Detection of nitric oxide release from single neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anal Chem* 78, 7643-7648.

Paul, D.W., Prajapati, I. and Reed, M.L. (2013) Electropolymerized eugenol: evaluation as a protective film for oxygen sensing. *Sens Actuators B Chem* 183, 129–135.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G. and Henriques, M. (2014) Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 101, 121-135.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Negulescu, G.P. and Pisoschi, A. (2011) Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules* 16, 1349-1365.

Pohanka, M., Jun, D. and Kuca, K. (2008) Amperometric biosensors for real time assays of organophosphates. *Sensors* 8, 5303-5312.

Prieto-Simón, B., Fàbregas, E. and Hart A. (2007) Evaluation of different strategies for the development of amperometric biosensors for L-lactate. *Biosens Bioelectron* 22, 2663-2668.

Qi, A.D., Li, L. and Liu, Y. (2003) Molecular binding ability and selectivity of natural  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$  -cyclodextrins and oligo(ethylenediamino) modified  $\beta$ -cyclodextrins with chinese traditional medicines. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 45, 69–72.

Qian, J.M., Suo, A.L., Yao, Y. and Jin, Z.H. (2004) Polyelectrolyte-stabilized glucose biosensor based on woodceramics as electrode. *Clinical Biochem* 37, 155–161.

Ramírez-Berriozabal, M., Galicia, L., Gutiérrez-Granados, S., Cortes, J.S and Herrasti, P. (2008) Selective electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using a carbon paste electrode modified with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Electroanalysis* 15, 1678 – 1683.

Ramírez-Silva, M.T., Corona-Avendaño, S., Alarcón-Angeles, G., Palomar-Pardavé, M., Romero-Romo, M. and Rojas-Hernández, A. (2014) Construction of supramolecular systems for the selective and quantitative determination of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Procedia Chem* 12, 55-61.

Raoov, M., Mohamad, S. and Abas, M.R. (2014) Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized ionic liquid polymer as a macroporous material for the removal of phenols and As(V). *Int J Mol Sci* 15, 100-119.

Rasooly, A., Herold, K.,E. (2006) Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. *JAOAC Int*, 89, 873-883.

Rejeb, I.B., Arduini, F., Arvinte, A., Amine, A., Gargouri, M., Micheli, L., Bala, C., Moscone, D. and Palleschi, G. (2009) Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil. *Biosens Bioelectron* 24, 1962–1968.

Ren, W., Luo, H.Q. and Li, N.B. (2006) Electrochemical behavior of epinephrine at a glassy carbon electrode modified by electrodeposited films of caffeic acid. *Sensors* 6, 80-89.

Renard, E., Barnathan, G., Deratani, A. and Sébille, B. (1997) Polycondensation of cyclodextrines with epichlorohydrine. Influence of reaction conditions on the polymer structure. *Macromol Symp* 122, 229-234.

Rhouati, A., Yang, C., Hayat, A. and Marty, J.L. (2013) Aptamers: a promising tool for ochratoxin A detection in food analysis. *Toxins* 5, 1988-2008.

Rocchitta, G., Secchi, O., Alvau, M.D, Migheli, R., Calia, G., Bazzu, G., Farina, D., Desole, M.S., O'Neill, R.D. and Serra, P.A. (2012) Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats. *Anal Chem* 84, 7072-7079.

Rocchitta, G., Secchi, O., Alvau, M.D., Farina, D., Bazzu, G., Calia, G., Migheli, R., Desole, M.S., O'Neill, R.D. and Serra, P.A. (2013) Simultaneous telemetric monitoring of brain glucose and lactate and motion in freely moving rats. *Anal Chem* 85, 10282-10288.



Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodriguez-Perez, A., Concheiro, A. and Torres-Labandeira, J.J. (2006) New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability. *Pharm Res* 23, 121-130.

Rodriguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodriguez-Perez, A., Concheiro, A. and Torres-Labandeira, J.J. (2007) Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *Eur J Pharm Biopharm* 66, 55-62.

Romanazzo, D., Ricci, F., Volpe, G., Elliott, C.T., Vesco, S., Kroeger, K., Moscone, D., Strokac, J., Van Egmond, H., Vehniäinen, M. and Palleschi, G. (2010) Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples. *Biosens Bioelectron* 25, 2615–2621.

Rothwell, S.A. and O'Neill, R.D. (2011) Effects of applied potential on the mass of non-conducting poly(ortho-phenylenediamine) electro-deposited on eqcm electrodes: Comparison with biosensor selectivity parameters. *Phys Chem Chem Phys*, 13, 5413-5421.

Rothwell, S.A., Killoran, S.J. and O'Neill, R.D. (2010) Enzyme immobilization strategies and electropolymerization conditions to control sensitivity and selectivity parameters of a polymer-enzyme composite glucose biosensor. *Sensors* 10, 6439-6462.

Rothwell, S.A., Killoran, S.J., Neville, E.M., Crotty, A.M. and O'Neill, R.D. (2008) Poly(*o*-phenylenediamine) electrosynthesized in the absence of added background electrolyte provides a new permselectivity benchmark for biosensor applications. *Electrochem Commun* 10, 1078–1081.

Rothwell, S.A., Kinsella, M.E., Zain, Z.M., Serra, P.A., Rocchitta, G., Lowry, J.P., O'Neill, R.D. (2009) Contributions by a novel edge effect to the permselectivity of an electrosynthesized polymer for microbiosensor applications. *Anal Chem*, 81, 3911-3918.

Rothwell, S.A., McMahon C.P. and O'Neill, R.D. (2010) Effects of polymerization potential on the permselectivity of poly(*o*-phenylenediamine) coatings deposited on Pt-Ir electrodes for biosensor applications. *Electrochim Acta* 55, 1051-1060.

Ryan, M.R., Lowry, J.P. and O'Neill, R.D. (1997) Biosensor for neurotransmitter L-glutamic acid designed for efficient use of L-glutamate oxidase and effective rejection of interference. *Analyst*, 112, 1419-1424.

Salazar, P., Martin, M., O'Neill, R.D., Roche, R. and Gonzalez-Mora, J.L. (2012) Improvement and characterization of surfactant-modified Prussian blue screen-printed carbon electrodes for selective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection at low applied potentials. *J Electroanal Chem*, 674, 48–56.

Salazar, P., Martin, M., Roche, R., Gonzalez-Mora, J.L., O'Neill, R.D. (2010) Microbiosensors for glucose based on Prussian blue modified carbon fiber electrodes for in vivo monitoring in the central nervous system. *Biosens Bioelectron*, 26, 748–753.

Sargeant, K., Sheridan, A., Kelly, J.O. and Carnaghan, R.B.A. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192, 1096-1097.

Schroeder, H.W. and Boller, R.A. (1973) Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Appl Microbiol* 25, 885-889.

Sedó, J., Sainz-Poseu, J., Busqué, F. and Ruiz-Molina, D. (2013) Cathecol-based biomimetic functional materials. *Adv Mater* 25, 653-701.

Serra, P.A., Rocchitta, G., Bazzu, G., Manca, A., Puggioni, G.M., Lowry, J.P. and O'Neill, R.D. (2007) Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications. *Sens Actuat B* 122, 118-126.

Sharma, A., Hayat, A., Mishra, R.K., Catanante, G., Bhand, S. and Marty, J.L. (2015) Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) quenching based aptasensing platform: application to ochratoxin A detection. *Toxins* 7, 3771-3784.

Shown, I. and Murthy, C. N. (2009) Grafting of cotton fiber by water-soluble cyclodextrin-based polymer. *J Appl Polym Sci* 111, 2056–2061.

Simić, A., Manojlović, D., Segan, D. and Todorović, M. (2007) Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. *Molecules*, 12, 2327-2340.

Somerset, V., Baker, P. and Iwouha, E. (2010) Mercaptobenzothiazole-on-gold organic phase biosensor systems: 3. Thick-film biosensors for organophosphate and carbamate pesticide determination. *Intelligent and Biosensors*, Book edited by: Vernon S. Somerset, 3.5, 197-198.

Song, W., Chen, Y., Xu, J. and Tian, D.B. (2010) A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode. *Chim Chem Lett* 21, 349-352.

Sternberg, R., Bindra, D.S., Wilson, G.S. and Thevenot, D.R. (1988) Covalent enzyme coupling on cellulose acetate membranes for glucose sensor development. *Anal Chem* 60, 2781-2786.

Szejtli, J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev* 98, 1743–1754.

Taira, J., Ikemoto, T., Mimura, K., Hagi, A., Murakami A., Makino, K. (1993) Effective Inhibition of Hydroxyl Radicals by Hydroxylated Biphenyl Compounds. *Free Rad Res Comms*, 19, 71-77.

Tamura, M., Mochizucki, N., Nagatomi, Y., Harayama, K., Toriba, A. and Hayakawa, K. (2015) Identification and quantification of fumonisin A1, A2, and A3 in corn by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Toxins* 7, 582-592.<sup>a</sup>

Tamura, M., Mochizucki, N., Nagatomi, Y., Harayama, K., Toriba, A. and Hayakawa, K. (2015) A method for simultaneous determination of 20 Fusarium toxins in cereals by High-Resolution Liquid Chromatography-orbitrap mass spectrometry with a pentafluorophenyl column. *Toxins* 7, 1664-1682.<sup>b</sup>

Telipan, G., Ignat, M. and Cozan, V. (2006) Use of the polysulfone polymer in NOx detection. *J Optoelectronic Adv Mat* 8, 582.

Tian, J., Liu, Q., Asiri, A.M., Qusti, A.H., Al-Youbi, A.O. and Sun, X. (2013) Ultrathin graphitic carbon nitride nanosheets: a novel peroxidase mimetic, Fe doping-mediated catalytic performance enhancement and application to rapid, highly sensitive optical detection of glucose. *Nanoscale*, 5, 11604-11609.

Tingry, S., Innocent, C., Touil, S., Deratani, A. and Seta, P. (2006) Carbon paste biosensor for phenol detection of impregnated tissue: modification of selectivity by using  $\beta$ -cyclodextrin-containing PVA membrane. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 26, 222–226.

Toniolo, R., Dossi, N., Pizzariello, A., Susmel, S. and Bontempelli, G. (2011) Simultaneous detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide by flow-injection analysis with a thin layer dual-electrode detector. *Electroanalysis* 23, 628-636.

Trotta, F., Zanetti, M. and Cavalli, R. (2012) Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein J Org Chem* 8, 2091–2099.

Tundo, P. and Selva, M. (2002) The chemistry of dimethyl carbonate. *Acc Chem Res* 35, 706-716.

Tundo, P., Trotta, F., Moraglio, G. and Ligorati, F. (1988) Continuous-flow processes under gas-liquid phase-transfer catalysis (GL-PTC) conditions: the reaction of dialkyl carbonates with phenols, alcohols, and mercaptans. *Ind Eng Chem Res* 27, 1565-1571.

Turner, A.P.F. (2013) Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev* 42, 3175–3648.

Umaña, M. and Waller, J. (1986) Protein-modified electrodes: the glucose oxidase/polypryrrrole system. *Anal Chem* 58, 2979-2983.

Updike, S.J. and Hicks, G.P. (1967) The enzyme electrode. *Nature* 214, 986-988.

Vaddiraju, S., Burgess, D.J., Jain, F.C., Papadimitrakopoulos, F. (2009) The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> outer diffusion on the performance of implantable glucose sensors. *Biosens Bioelectron*, 24, 1557-1562.

Vahl, M., Jorgensen K. (1998) Determination of aflatoxins in food using LC/MS/MS. *Z Lebensm Unters Forsch A* 206, 243-245.

Vakurov, A., Simpson, C.E., Dalya, C.L., Gibson, T.D. and Millner, P.A. (2005) Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection. II. Immobilization and stabilization of acetylcholinesterase. *Biosens Bioelectron* 20, 2324–2329.

Van de Mannakker, F., Vermonden, T., Van Nostrum, C.F. and Hennink, W.E. (2009) Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules* 10, 3157-3175.

Villalonga, R., Fujii, A., Shinohara, H., Asano, Y., Cao, R., Tachibana, S. and Ortiz, P. (2007) Supramolecular-mediated immobilization of L-phenylalanine dehydrogenase on cyclodextrin-coated Au electrodes for biosensor applications. *Biotechnol Lett* 29, 447–452.

Voncina, B. and Majcen Le Marechal, A. (2005) Grafting of cotton with  $\beta$ -cyclodextrin via poly(carboxylic acid). *J Appl Polym Sci* 96, 1323-1328.

Wajs, E., Caldera, F., Trotta, F. and Fragoso, A. (2014) Peroxidase-encapsulated cyclodextrin nanosponge immunoconjugates as a signal enhancement tool in optical and electrochemical assays. *Analyst* 139, 375-380.

Walker, M. and Wong, Y.C. (2014) Protection of the agri-food chain by chemical analysis: the european context. In: Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions, First Edition. Edited by Rajeev Bhat and Vicente M. Gómez-López. (Wiley-Blackwell) *John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ, USA*, 125-144. ISBN: 978-1-118-47460-0.

Wang, J.H. and Cai, Z. (2008) Incorporation of the antibacterial agent, miconazole nitrate into a cellulosic fabric grafted with  $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydr Polym* 72, 695–700

Wang, X.H. and Wang, S. (2008) Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins. *Sensors* 8, 6045-6054.

Wang, Y., Liu, N., Ning, B., Liu, M., Lv, Z., Sun, Z., Peng, Y., Chen, C., Li, J. and Gao, Z. (2012) Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip. *Biosens Bioelectron* 34, 44–50.

Wang, Z., Yang, H., Gao, B., Tong, Y., Zhang, X. and Su, L. (2014) Stability improvement of Prussian blue in nonacidic solutions via an electrochemical post-treatment method and the shape evolution of Prussian blue from nanospheres to nanocubes. *Analyst* 139, 1127-1133.

Yang, C.Q., Lu, Y. and Lickfield, G.C. (2002) Chemical analysis of 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid. *Textile Res J* 72, 817-824.

Yang, X., Gao, M., Hu, H. and Zhang, H. (2011) Electrochemical detection of honokiol and magnolol in traditional chinese medicines using acetylene black nanoparticle-modified electrode. *Phytochem anal* 22, 291-295.

Yang, Y.L., Tseng, T.F., Lou, S.L., *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2007**, 6625-6628.

Yao, X., Xu, X., Yang, P. and Chen, G. (2006) Carbon nanotube/poly(methyl methacrylate) composite electrode for capillary electrophoretic measurement of honokiol and magnolol in Cortex *Magnoliae Officinalis*. *Electrophoresis*, 27, 3233-3242.

Zhao, C. and Liu, Z.Q. (2011) Comparison of antioxidant abilities of magnolol and honokiol to scavenge radicals and to protect DNA. *Biochimie* 93, 1755-1760.

Zhao, J., Huang, W. and Zheng, X. (2009) Mesoporous silica-based electrochemical sensor for simultaneous determination of honokiol and magnolol. *J Appl Electrochem*, 39, 2415-2419.

Zhao, Y., Wang, P., Wang, F., Zhou, H., Li, W., Yue, J. and Ha, Y. (2012) A novel biosensor regulated by the rotator of FOF1-ATPase to detect deoxynivalenol rapidly. *Biochem Biophys Res Commun* 423, 195–199.

Zhao, Z., Rao, Q., Song, S., Liu, N., Han, Z., Hou, J. and Wu, A. (2014) Simultaneous determination of major type B trichothecenes and deoxynivalenol-3-glucoside in animal feed and raw materials using improved DSPE combined with LC-MS/MS. *J Chromatogr B Biomed Appl* 963, 75–82.

Zheng, D., Hu, C., Peng, Y. and Hu, S. (2009) A carbon nanotube/polyvanillin composite film as an electrocatalyst for the electrochemical oxidation of nitrite and its application as nitrite sensor. *Electrochim acta* 54, 4910-4915.

Zhou, C., Dong, Y., Li, Z., Xu, X and Liu, Z. (2010) Electrochemistry of magnolol and interaction with DNA. *J Electroanal Chem* 642, 115-119.