

---

DOCTORAL THESIS SUMMARY

# Raman spectroelectrochemistry in the analysis of environmental and food pollutants

---

PhD Student **Rebeca Magda (Moldovan)**

---

Scientific coordinator **Prof. Dr. Ede Bodoki**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
<b>STATE OF THE ART</b>	<b>3</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	<b>4</b>
<b>1. Objectives</b>	<b>4</b>
<b>2. 1<sup>st</sup> Study. Self-assembled gold nanoparticle films at liquid-liquid interface for SERS applications</b>	<b>5</b>
2.1. Introduction	5
2.2. Objectives	5
2.3. Materials and methods	5
2.4. Results and discussions	5
2.5. Conclusions	5
<b>3. 2<sup>nd</sup> Study. Electrochemical detection of endosulfan at a gold electrode modified with a thin polythiophene film</b>	<b>6</b>
3.1. Introduction	6
3.2. Objectives	6
3.3. Materials and methods	6
3.4. Results and discussions	6
3.5. Conclusions	6
<b>4. 3<sup>rd</sup> Study. Investigation of different EC-SERS platforms for integration with microfluidics</b>	<b>7</b>
4.1. Introduction	7
4.2. Objectives	7
4.3. Materials and methods	7
4.4. Results and discussions	7
4.5. Conclusions	8
<b>5. 4<sup>th</sup> Study. Microfluidic EC-SERS platform based on electrochemically activated AuSPes for the analysis of thiabendazole in apple juice</b>	<b>8</b>
5.1. Introduction	8
5.2. Objectives	8
5.3. Materials and methods	8
5.4. Results and discussions	8
5.5. Conclusions	9
<b>6. 5<sup>th</sup> Study. Time-resolved EC-SERS analysis of propranolol using <i>in situ</i> activated SPes with thiocyanate as precipitating agent</b>	<b>9</b>
6.1. Introduction	9
6.2. Objectives	9
6.3. Materials and methods	9
6.4. Results and discussions	10
6.5. Conclusions	10
<b>7. General conclusions</b>	<b>10</b>
<b>8. Originality of the thesis</b>	<b>11</b>
<b>SELECTED REFERENCES</b>	<b>11</b>

**Keywords:** spectroelectrochemistry; EC-SERS; nanostructured platform; microfluidics; sensor; pollutants; lab-on-a-chip; point-of-need analysis.

## INTRODUCTION

Unforeseen levels of environmental and food pollution have been reached with the advancements in medicine and technology, endangering human health and causing worldwide concern. Currently, separation techniques are employed for the trace detection of contaminants. Although they are specific, selective and sensible, their wide use is limited by the expensive laboratory equipment, requirements of professionals, high cost of analyses and time-consuming procedures, among others. Thus, alternative methods are required for the robust, accessible and fast testing at the point-of-need (PON). In this regard, electrochemical (EC) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) sensors have been extensively explored to detect a wide range of analytes in different matrixes, presenting a high potential for practical applications along with numerous challenges<sup>1</sup>.

The hyphenation of EC and SERS, known as Raman spectroelectrochemistry (Raman SEC) or EC-SERS, is recently emerging as a powerful analytical tool that mitigates the drawbacks of the individual techniques<sup>2</sup>. The associated advantages are high sensitivity, selectivity, as well as the possibility of multiplex detection of analytes in complex samples. In addition, the reduced costs, user-friendliness and portability make this technique an excellent option for continuous monitoring of residues in environmental and food products<sup>1,2</sup>.

The further integration of EC-SERS sensors within microfluidic devices is an innovative approach in line with the recent trends in the development of lab-on-a-chip or micro total analysis systems ( $\mu$ TAS). EC-SERS microfluidic sensors have the potential to revolutionize the field of analysis since they may be employed for the continuous monitoring of pollutants, offering the possibility of automation and even remote testing<sup>1</sup>.

Within this framework, the main objective of the current research was the development of simple EC-SERS microfluidic platforms that could be readily applied for the detection of emerging environmental and food pollutants.

## STATE OF THE ART

The discovery of SERS from an EC-SERS experiment is known as a historic breakthrough. In the last five decades, this technique was extensively exploited to provide insights about the electrode–electrolyte interface. Typically, changes during electrochemical processes are revealed by monitoring the unique Raman spectral fingerprint of molecules, amplified upon adsorption on the surface of nanostructured plasmonic materials<sup>1</sup>.

Recently, the remarkable potential of combining EC and SERS for analytical applications has been uncovered. By manipulating the surface charge through polarization, target molecules (including those with little to no affinity for a metallic substrate)<sup>3</sup> may be selectively drawn closer to the surface of the substrate, facilitating

physisorption and even chemical bonding<sup>4</sup>. As a result, a higher enhancement of the SERS signal is observed. Additionally, the EC-controlled surface adsorption of target molecules might be able to provide maximum surface coverage<sup>5</sup> of the substrates and a more consistent overall enhancement<sup>6-8</sup>. As a result, significant improvements are observed in the reproducibility of SERS analyses<sup>1</sup>. Potentiostatic or potentiodynamic polarization of the substrate may also be employed to clean the substrate prior to analysis by desorbing residual interfering species<sup>9,10</sup> and even to desorb molecules after analysis for the purpose of reusability<sup>11</sup>.

The choice of EC-SERS substrates depends on the application and resources. Complex methods that require multiple steps and special equipment such as nanolithography are typically explored for the large-scale fabrication of EC-SERS substrates<sup>12</sup>. At the same time, simpler, faster and cost-effective methods, such as self-assembled nanoparticle arrays are mainly used at the research level<sup>10,13</sup>. Another convenient option is the use of EC methods for EC-SERS substrate fabrication, considering the availability of the EC instrumentation in a Raman SEC experiment. Therefore, the metallic nanostructured substrate may be electrochemically deposited on a corresponding support using salts of Au(III), Ag(I) or Cu(II) in aqueous solutions<sup>5</sup> and in some cases, metallic substrates may be activated/roughened by oxidation-reduction cycles (ORC)<sup>14-16</sup>.

EC-SERS has been employed to detect and quantify a large variety of analytes from small organic molecules to even bacterial cells in more or less complex samples, such as pharmaceutical formulations, biological fluids or even environmental and food samples<sup>1</sup>.

Therefore, EC-SERS has the potential to revolutionize the field of (bio)analysis, moving significantly closer to real-life analytical applications and making possible the development of portable PON devices. Moreover, when quantification is done both by EC and SERS, cross-validation of data becomes possible.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

### 1. Objectives

The *first objective* of the current thesis was to develop simple EC-SERS platforms that could be readily applied for the detection of emerging environmental and food pollutants. Thus, the performance of *different SERS substrates* was evaluated, from colloidal dispersions and colloidal assemblies that need further integration with EC features, to ready-to-use screen-printed electrodes activated via electrochemical methods. At the same time, in order to facilitate the analyte's interaction with the SERS substrate, *strategies for adsorption and preconcentration* of pollutants were explored.

The *second objective* of this thesis was to investigate the possibility of integrating EC-SERS platforms within microfluidic chips and evaluate the influence of various parameters on the EC-SERS performance.

## **2. 1<sup>st</sup> Study. Self-assembled gold nanoparticle films at liquid-liquid interface for SERS applications**

### *2.1. Introduction*

Anisotropic metal nanostructures are explored as SERS platforms for sensing applications due to the facile synthesis, low cost and high electromagnetic field enhancements at their sharp edges. Additional Raman signal enhancement may be obtained by further assembling or aggregating nanostructures for molecules residing in the regions of intense local field enhancements<sup>17</sup>.

### *2.2. Objectives*

The aim of the current study was to assess the feasibility of using anisotropic colloidal nanoparticles for the development of sensitive solid SERS substrates. In this regard, the SERS signal enhancement efficiency of gold nanobones (AuNBs) and gold nanorods (AuNRs) was evaluated, both in colloidal dispersion and as close-packed films generated at liquid-liquid interface.

### *2.3. Materials and methods*

On-resonance and off-resonance AuNBs were synthesized by an adapted seed-mediated growth method, while AuNRs in aqueous dispersion were purchased. Nanostructures were further aggregated in metallic films at water/hexane interface using ethanol. In all experiments, a Raman active molecule, rhodamine 6G, was used to assess the SERS performance of the substrates.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and UV-Vis absorption spectroscopy were employed to characterize both AuNBs and AuNRs. In addition, by monitoring the optical and morphological properties of AuNBs in time, their stability in aqueous dispersion could be assessed.

### *2.4. Results and discussions*

Comparing the SERS enhancement efficiency of different nanostructures, it was found that off-resonance AuNBs are superior to on-resonance AuNBs and AuNRs in both colloidal dispersion and aggregated close-packed films formed at liquid-liquid interface. The assembly in metallic films resulted in SERS signal enhancement up to 55 times, compared to the signal recorded in colloidal dispersion. Apart from the good reproducibility obtained, measurements performed on several regions of the films, indicated a good uniformity. When off-resonance AuNBs were assembled at liquid interface, an %RSD of 4.56% and a limit of detection of 5 nM was obtained for R6G, rendering the developed substrate suitable for sensitive analytical applications.

### *2.5. Conclusions*

Even if the analytical performances of the colloids and aggregates were promising, the large-scale availability of AuNBs is limited by lack of batch-to-batch reproducibility and lack of stability. Thus, colloidal nanostructures are more relevant at a research level and less likely to be used for the actual development of sensitive and robust SERS or EC-SERS sensors.

### **3. 2<sup>nd</sup> Study. Electrochemical detection of endosulfan at a gold electrode modified with a thin polythiophene film**

#### *3.1. Introduction*

Great efforts are made to phase out globally persistent organic pollutants, such as endosulfan. Electrochemical as well as SERS sensors are explored as accessible, cost-effective tools for the on-site detection and monitorization of pesticides in the environment<sup>1</sup>. Several strategies may be used to enrich lipophilic pollutants at the metal surface<sup>3</sup>. In addition, a combination of techniques, such as EC-SERS might be explored to improve the performance of sensing platforms.

#### *3.2. Objectives*

The purpose of this study was firstly to preconcentrate endosulfan at a gold electrode with the help of a thin layer of hydrophobic polythiophene film. Then, the potential integration of the electrochemical platform with SERS detection for dual EC and SERS analysis was evaluated.

#### *3.3. Materials and methods*

A cyclic voltametric (CV) method was optimized for the electropolymerization of bithiophene at a gold disk electrode. Several parameters were fine-tuned (monomer concentration, electrolyte nature, scanning direction, upper vertex potential) by response surface modeling. The morphology and thickness of the resulted polymeric film was investigated by tapping mode atomic force microscopy (AFM).

The electrochemical characterization of the analytical platform at every step was realized by differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using a redox probe. For SERS measurements, the polythiophene film was deposited on electrochemically roughened AuSPES.

#### *3.4. Results and discussions*

Endosulfan could be preconcentrated at the uniform hydrophobic film ( $\approx 300$  nm thickness) and detected using EIS at concentrations as low as 0.1 nM. In addition, the platform presented reusable properties and low interference was recorded from various molecules tested.

In the next step, for improved selectivity, the further coupling with SERS for dual analysis was investigated. The recorded SERS spectra provided information regarding the presence of the polymeric film on the surface of the gold electrode, but were unable to provide information about endosulfan adsorption. These results were most probably achieved due to the low Raman cross-section of endosulfan molecules, the film unideal thickness and the inherent fluorescence of polythiophene.

#### *3.5. Conclusions*

In this study, an electrochemical platform based on a hydrophobic polythiophene thin film was developed for the trace-analysis of endosulfan. While the developed platform exhibited excellent analytical performance, the further coupling with SERS was challenged by several factors.

## **4. 3<sup>rd</sup> Study. Investigation of different EC-SERS platforms for integration with microfluidics**

### *4.1. Introduction*

Efforts are directed towards the controlled assembly of colloidal nanostructures in ordered metallic films that may present improved reproducibility and stability, as well as higher SERS enhancement. Among other techniques, convective self-assembly (CSA) that relies on evaporative-induced assembly, is promising for fabricating periodic arrays of nanostructures<sup>18,19</sup>. Further integration of EC-SERS platforms with microfluidics may bring a series of advantages, such as highly controlled environment and improved reproducibility<sup>1</sup>. While promising, the combination of EC-SERS with microfluidics is in the early stages, thus, relevant studies on the subject are highly needed for a complete understanding of the parameters involved.

### *4.2. Objectives*

The first part of the current study aimed to investigate the suitability of ordered nanostructured substrates for EC-SERS analyses. For this purpose, substrates fabricated by either CSA of gold nanoparticles (AuNP films) or CSA of polystyrene spheres followed by gold sputtering (AuFoN) were used.

The second purpose of this study was to integrate SEC with microfluidics and evaluate the influence of various parameters involving the electrodes or microfluidics on the EC-SERS performance of the substrates.

### *4.3. Materials and methods*

Periodic gold substrates fabricated by CSA were provided by INCDTIM (Cluj-Napoca, Romania). Gold substrates used for microfluidic integration were fabricated by Si technology and provided by Sintef (Oslo, Norway). Studied variables of EC-SERS microfluidic platforms included oxide thickness, metal thickness, channel height and bonding method (reversible or irreversible).

Electrochemical characterization of the substrates was assessed by CV and EIS using a common redox probe. The EC-SERS performance of the substrates was evaluated using thiabendazole and propranolol as model pollutant molecules.

### *4.4. Results and discussions*

Substrates fabricated by colloidal self-assembly (AuFoN and AuNP films) could be used both as electrodes and SERS substrates. However, these platforms were highly sensitive to the heat generated by the laser, restricting the use (<10 mW) of higher laser power, and thus, limiting sensitivity.

Electrochemical tests on planar thin-film gold electrodes revealed several parameters that are of great importance and need to be rigorously controlled in order to obtain uniform electric fields inside microfluidic chip, such as the channel depth or the surface area of the electrodes. Due to clean-room facilities limitations, all electrodes on the chip were made of gold. Thus, silver was deposited electrochemically to form a pseud-reference electrode, as well as a performant SERS substrate in and outside microfluidic chips.

#### 4.5. Conclusions

The use of the periodic platforms fabricated by CSA may be a good choice for some EC-SERS applications, however, their use was limited in this study by the unavailability of a larger number of electrodes.

For successful EC-SERS microfluidic integration, the dimensions of electrodes must be adapted to the reduced chamber volume. Ultimately, there are still some limitations when using Si technology to fabricate EC-SERS microfluidic platforms, however, some solutions may be found such as the electrochemical modification of electrodes.

### **5. 4<sup>th</sup> Study. Microfluidic EC-SERS platform based on electrochemically activated AuSPEs for the analysis of thiabendazole in apple juice**

#### 5.1. Introduction

In order to surpass the disadvantages of the current SERS substrates, cost-effective and accessible noble metal SPEs are explored as EC-SERS platforms after electrochemical roughening procedures. The further coupling of EC-SERS platforms with microfluidics paves the way to point-of-need (PON) applications<sup>20</sup>.

#### 5.2. Objectives

The purpose of the present work was to develop a simple EC-SERS platform for the detection of thiabendazole in real samples. In this regard, fast ex situ electrochemical activation of SERS features on AuSPEs was explored. In addition, the possibility of integrating activated SPEs in microfluidic chips was investigated.

#### 5.3. Materials and methods

A double step chronoamperometric procedure was used to activate the SERS features of cost-effective AuSPEs in only one minute, in the presence of Cl<sup>-</sup>. The electrochemical restructuring of the surface gold atoms was investigated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) analyses.

In order to assemble the electrodes within microfluidic chips, a pressure-sensitive adhesive (PSA) was used to join SPEs with a top platform by applying manual pressure.

#### 5.4. Results and discussions

Upon electrochemical activation, the gold electrode's surface was enriched with conglomerated gold nanoparticles of variable sizes, leading to an increase of roughness factor of about 48%. EC-SERS studies of thiabendazole on these substrates revealed a maximum amplification of the SERS signal at  $-0.8$  V (vs. Ag/AgCl) most probably due to a favored chemical interaction and a reorientation of the molecules at the surface of the electrode. In addition, the reproducibility of EC-SERS testing was improved at  $-0.8$  V as opposed to open circuit potential (OCP), most probably due to a more controlled interaction with the analyte.



The EC-assisted SERS signal intensity presented a linear correlation with the concentration on thiabendazole in the range of 0.5  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ . Furthermore, thiabendazole could be directly detected in spiked apple juice samples at relevant concentrations with recoveries over 82% and an estimated limit of detection (LOD) of 0.061 ppm. Since juice may have variable acidity levels, the pH-dependent SERS spectra of thiabendazole was evaluated and an ideal pH range of 4 to 7 was identified where the polarization of the electrode resulted in optimum signal enhancement.

EC-SERS microfluidic tests revealed a continuous enhancement of the specific Raman bands of thiabendazole under flow conditions correlated with an increasing number of pesticide molecules interacting with the gold surface. Thus, due to the inherent affinity of thiabendazole towards gold, it may be preconcentrated at the surface of the electrode from the passing flow.

### 5.5. Conclusions

The proposed EC-assisted SERS technique using mass-produced, easily accessible AuSPEs as electrode/SERS substrate could be readily applied for the fast analysis (2 min) of thiabendazole residues in unprocessed juice samples. Furthermore, the EC-SERS platforms were assembled into miniaturized flow cells and preliminary evaluation of their performance under flow conditions was demonstrated.

## 6. 5<sup>th</sup> Study. Time-resolved EC-SERS analysis of propranolol using *in situ* activated SPEs with thiocyanate as precipitating agent

### 6.1. Introduction

Electrochemical substrate activation and analyte detection can be performed within one experimental run (*in situ*), reducing the number of processing steps involved and avoiding the time-dependent decrease of the substrate's plasmonic efficiency<sup>14</sup>. The influence of different variables on the on the resulted SERS substrates is not fully understood. TR-EC-SERS analyses may be used to provide insights about the processes involved by providing a multiparametric dataset rich in information<sup>21</sup>.

### 6.2. Objectives

The purpose of this study was to develop a simple EC-SERS platform for the fast detection of propranolol, using thiocyanate for the first time to activate AgSPEs *in situ*. In addition, the influence of various parameters (e.g., electrolyte nature, concentration of KSCN, procedure parameters, pH) on the resulted SERS substrates was assessed. What is more, the possibility to use the method for the detection of propranolol directly in river and tap water samples was evaluated.

### 6.3. Materials and methods

A SPELEC Raman instrument was used for synchronized EC-SERS acquisition. AgSPEs were roughened by CV in the presence of thiocyanate as precipitating agent and propranolol as model pollutant molecule. UV-Vis SEC measurements, SEM imaging and EDX analyses were employed to better understand the processes involved.

#### 6.4. Results and discussions

Through the subsequent oxidation and reduction cycles, thiocyanate guides the progressive build-up of a tridimensional nano-filamentous silver metal network which effectively enhanced the SERS signal of propranolol. The optimization of critical parameters such as electrolyte, KSCN concentration, and upper vertex potential was conducted, monitoring the influence on the on-going surface nanostructuring

Ag/AgSCN as reference electrode greatly improved the reproducibility of the recorded EC-SERS signal. Interestingly, a potentiostatic step of  $-0.3$  V employed after the potentiodynamic activation improved the linearity and sensitivity of the method, reaching an LOD of 3.66 nM. In addition, good recoveries ( $>93\%$ ) were obtained when testing spiked river and tap water samples without any pretreatment or extraction steps needed.

#### 6.5. Conclusions

A novel approach was proposed for activating AgSPEs using KSCN as a precipitating agent. Given its robustness, cost-effectiveness, and rapid activation and measurement times (3 minutes), the developed EC-SERS method holds significant potential for monitoring pharmaceutical residues in environmental samples.

### 7. General conclusions

Throughout the thesis, an extensive performance evaluation of various EC-SERS substrates has been carried out. SPEs roughened in a fast manner via electrochemical methods proved to be the most convenient substrates. Therefore, they were successfully used for the development of EC-SERS platforms employed for the trace detection of model environmental and food pollutants, namely propranolol and thiabendazole.

At the same time, several strategies for improving the analyte's interaction with the SERS substrate were explored, including the adsorption of lipophilic molecules in hydrophobic polymeric films or the electrochemical polarization of the electrode.

Finally, the possibility of integrating EC-SERS platforms within microfluidic chips was evaluated. A better understanding of this new field was provided by testing the influence of various parameters on the EC-SERS performance.

Important developments have been achieved in Raman spectroelectrochemistry, which now represents a promising alternative to conventional analytical methods. In the future, EC-SERS microfluidic sensors may enable fully portable systems for real-time monitoring of potential pesticide contamination in various environmental samples and for the decentralized food safety management.

## 8. Originality of the thesis

The originality of this work consists on one side in the development of new EC-SERS strategies for the sensitive and fast detection of environmental and food pollutants and on the other side in the integration of EC-SERS with microfluidics.

Thus, this thesis presents two ingenious EC approaches for the activation of both Au and Ag SPEs. Using these substrates, the first EC-SERS analysis of thiabendazole and propranolol has been reported. What is more, the EC-SERS sensors developed were employed for the direct and fast (under 3 min) detection of the model molecules in real samples (river water, tap water, juice) with no pretreatment or tedious extraction procedures that are usually required prior to analyses.

Ultimately, the combination of EC-SERS with microfluidics is in the very early stages, thus, this thesis presents the first attempts to integrate EC-SERS sensors with Si technology and the first EC-SERS microfluidic platform for the preconcentration and detection of thiabendazole.

Overall, the research conducted within this thesis brings significant advancements in the field, contributing to the development of fast and accurate identification of pollutants directly at the pollution sites, paving the way to fully portable system for real-time monitoring.

## SELECTED REFERENCES

1. Moldovan R, Vereshchagina E, Milenko K, Iacob B-C, Bodoki AE, Falamas A, et al. Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications. *Anal Chim Acta* 2021;1209:339250.
2. Brosseau CL, Colina A, Perales-Rondon J V, Wilson AJ, Joshi PB, Ren B, et al. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nat Rev Methods Prim* 2023;3:79.
3. Moldovan R, Iacob B-C, Farcău C, Bodoki E, Oprean R. Strategies for SERS Detection of Organochlorine Pesticides. *Nanomaterials* 2021;11:304.
4. Bindsri SD, Alhatab DS, Brosseau CL. Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) fabric-based plasmonic sensor for point-of-care diagnostics. *Analyst* 2018;143:4128–35.
5. Dendisová M, Němečková Z, Člupek M, Prokopec V. EC-SERS study of phenolic acids sorption behavior on Au, Ag and Cu substrates – Effect of applied potential and metal used. *Appl Surf Sci* 2019;470:716–23.
6. Huang C-Y, Hsiao H-C. Integrated EC-SERS Chip with Uniform Nanostructured EC-SERS Active Working Electrode for Rapid Detection of Uric Acid. *Sensors* 2020;20:7066.
7. Hernandez S, Perales-Rondon J V, Heras A, Colina A. Determination of uric acid in synthetic urine by using electrochemical surface oxidation enhanced Raman scattering. *Anal Chim Acta* 2019;1085:61–7.
8. Lee T, Mohammadniaei M, Zhang H, Yoon J, Choi HK, Guo S, et al. Single Functionalized pRNA/Gold Nanoparticle for Ultrasensitive MicroRNA Detection Using Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Adv Sci* 2020;7:1902477.
9. Lynk TP, Sit CS, Brosseau CL. Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Platform for Bacterial Detection and Identification. *Anal Chem* 2018;90:12639–46.
10. Lynk TP, Clarke OJR, Kesavan N, Brosseau CL. Development of a sustainable plasmon-enhanced spectroelectrochemical sensor using avocado pit (*Persea americana*) extract.

- Sensors Actuators B Chem 2018;257:270–7.
11. Tsai M-H, Lin Y-K, Luo S-C. Electrochemical SERS for in Situ Monitoring the Redox States of PEDOT and Its Potential Application in Oxidant Detection. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11:1402–10.
  12. Mosier-Boss PA. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomater (Basel, Switzerland)* 2017;7:142.
  13. Teng Y, Ren Z, Zhang Y, Wang Z, Pan Z, Shao K, et al. Fabrication of liquid–liquid self-assembled Ag arrays on disposable screen-printed electrodes and their application in the identification and analysis of the adsorption behavior of organic carboxylates through in situ electrochemical surface-enhanced Raman. *New J Chem* 2020;44:1777–84.
  14. Martín-Yerga D, Pérez-Junquera A, González-García MB, Perales-Rondon J V, Heras A, Colina A, et al. Quantitative Raman spectroelectrochemistry using silver screen-printed electrodes. *Electrochim Acta* 2018;264:183–90.
  15. Martín-Yerga D, Pérez-Junquera A, Hernández-Santos D, Fanjul-Bolado P. In situ Activation of Thick-film Disposable Copper Electrodes for Sensitive Detection of Malachite Green Using Electrochemical Surface-enhanced Raman Scattering (EC-SERS). *Electroanalysis* 2018;30:1095–9.
  16. Ibáñez D, González-García MB, Hernández-Santos D, Fanjul-Bolado P. Detection of dithiocarbamate, chloronicotiny and organophosphate pesticides by electrochemical activation of SERS features of screen-printed electrodes. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2021;248:119174.
  17. Moldovan R, Toma V, Iacob B-C, Știufiuc RI, Bodoki E. Off-Resonance Gold Nanobone Films at Liquid Interface for SERS Applications. *Sensors* 2022;22:236.
  18. Muntean CM, Cuibus D, Boca S, Falamas A, Tosa N, Brezeștean IA, et al. Gold vs. Silver Colloidal Nanoparticle Films for Optimized SERS Detection of Propranolol and Electrochemical-SERS Analyses. *Biosensors* 2023;13:530.
  19. Falamas A, Cuibus D, Tosa N, Brezeștean I, Muntean CM, Milenko K, et al. Toward microfluidic SERS and EC-SERS applications via tunable gold films over nanospheres. *Discov Nano* 2023;18:73.
  20. Moldovan R, Milenko K, Vereshchagina E, Iacob B-C, Schneider K, Farcău C, et al. EC-SERS detection of thiabendazole in apple juice using activated screen-printed electrodes. *Food Chem* 2023;405:134713.
  21. Moldovan R, Perez-Estebanez M, Heras A, Bodoki E, Colina A. Activating the SERS features of screen-printed electrodes with thiocyanate for sensitive and robust EC-SERS analysis. *Sensors Actuators B Chem* 2024;407:135468.

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Spectroelectrochimia Raman în analiza poluanților de mediu și alimentari

---

Doctorand **Rebeca Magda (Moldovan)**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ede Bodoki**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>15</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>15</b>
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>16</b>
<b>1. Obiective</b>	<b>16</b>
<b>2. Studiul 1. Filme de nanoparticule de aur autoasamblate la interfața lichid-lichid pentru aplicații SERS</b>	<b>17</b>
2.1. Introducere	17
2.2. Obiective	17
2.3. Materiale și metode	17
2.4. Rezultate și discuții	17
2.5. Concluzii	17
<b>3. Studiul 2. Detecția electrochimică a endosulfanului la electrod de aur modificat cu film subțire de politiofen</b>	<b>18</b>
3.1. Introducere	18
3.2. Obiective	18
3.3. Materiale și metode	18
3.4. Rezultate și discuții	18
3.5. Concluzii	18
<b>4. Studiul 3. Investigarea unor platforme EC-SERS diferite pentru integrare cu dispozitive microfluidice</b>	<b>19</b>
4.1. Introducere	19
4.2. Obiective	19
4.3. Materiale și metode	19
4.4. Rezultate și discuții	19
4.5. Concluzii	20
<b>5. Studiul 4. Platformă EC-SERS microfluidică bazată pe electrozi serigrafiați de aur activați electrochimic pentru analiza tiabendazolului din suc de mere</b>	<b>20</b>
5.1. Introducere	20
5.2. Obiective	20
5.3. Materiale și metode	20
5.4. Rezultate și discuții	20
5.5. Concluzii	21
<b>6. Studiul 5. Analiza EC-SERS cu rezoluție temporală a propranololului folosind electrozi serigrafiați activați <i>in situ</i> cu tiocianat ca agent de precipitare</b>	<b>21</b>
6.1. Introducere	21
6.2. Obiective	21
6.3. Materiale și metode	22
6.4. Rezultate și discuții	22
6.5. Concluzii	22
<b>7. Concluzii generale</b>	<b>22</b>
<b>8. Originalitatea tezei</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ</b>	<b>23</b>

**Cuvinte cheie:** spectroelectrochimie; EC-SERS; platformă nanostructurată; microfluidică; senzor; poluanți; laborator pe cip; analiză la punctul de interes.

## INTRODUCERE

Odată cu progresele în medicină și tehnologie au fost atinse niveluri neașteptate de poluare a mediului și a alimentelor care pun în pericol sănătatea umană și provoacă îngrijorare la nivel mondial. În prezent, pentru decelarea urmelor de contaminanți sunt folosite tehnicile de separare. Cu toate că acestea sunt specifice, selective și sensibile, utilizarea lor pe scară largă este limitată de echipamentele de laborator costisitoare, nevoia de personal înalt calificat, costul ridicat al analizelor și procedurile consumatoare de timp, printre altele. Prin urmare, sunt necesare metode alternative pentru testarea robustă, accesibilă și rapidă la punctul de interes. În acest sens, senzorii electrochimici (EC), respectiv cei bazați pe spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS) sunt investigați tot mai des pentru detecția unei game largi de analiți în diverse matrici, înregistrând un potențial ridicat de aplicabilitate practică, dar și numeroase provocări<sup>1</sup>.

Integrarea EC cu SERS cunoscută ca spectroelectrochimie Raman (Raman SEC) sau EC-SERS, devine un instrument analitic important care compensează dezavantajele tehnicilor individuale<sup>2</sup>. Avantajele asociate sunt sensibilitate și selectivitate ridicată, precum și posibilitatea de detecție multiplexată a analiților în probe complexe. În plus, costurile reduse, facilitatea utilizării și portabilitatea fac din această tehnică o opțiune excelentă pentru monitorizarea continuă a reziduurilor din mediul înconjurător și din produsele alimentare<sup>1,2</sup>.

O integrare avansată a senzorilor EC-SERS în dispozitive microfluidice reprezintă o abordare inovatoare în conformitate cu tendințele recente în dezvoltarea laboratoarelor pe cip sau a microsistemelor de analiză totală ( $\mu$ TAS). Senzorii microfluidici EC-SERS au potențialul de a revoluționa domeniul analizei deoarece pot fi utilizați pentru monitorizarea continuă a poluanților, oferind posibilitatea de automatizare și chiar de testare la distanță<sup>1</sup>.

În acest context, obiectivul principal al cercetării curente a fost investigarea unor platforme microfluidice EC-SERS simple care să poată fi aplicate cu ușurință pentru detecția poluanților de mediu și alimentari.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Dcelarea SERS dintr-un experiment EC-SERS este cunoscută ca o descoperire istorică. În ultimele cinci decenii, această tehnică a fost utilizată extensiv pentru a oferi informații asupra interfeței electrod-electrolit. În mod obișnuit, schimbările din timpul proceselor electrochimice sunt puse în evidență prin monitorizarea amprentei spectrale Raman unice a moleculelor, amplificată prin adsorbția la suprafața materialelor plasmonice nanostructurate<sup>1</sup>.

Recent, s-a descoperit potențialul remarcabil al integrării EC și SERS pentru aplicații analitice. Prin polaarizarea electrodului și controlul sarcinilor de suprafață, moleculele țintă (inclusiv cele cu afinitate redusă pentru substratul metalic)<sup>3</sup> pot fi

atrase selectiv în apropierea substratului, facilitând fizisorbția sau chiar chemisorbția<sup>4</sup>. Prin urmare, se observă o amplificare a semnalului SERS a moleculelor. În plus, adsorbția electrochimică controlată a moleculelor țintă ar putea oferi o acoperire maximă<sup>5</sup> a substratului SERS și o amplificare mai uniformă<sup>6-8</sup>. Ca urmare, se pot observa îmbunătățiri semnificative în reproducibilitatea analizelor SERS<sup>1</sup>. Polarizarea potentiostatică sau potentiodinamică a substratului ar putea fi de asemenea utilizată pentru a curăța substratul înainte de analiză prin desorbția speciilor interferente<sup>9,10</sup> reziduale și chiar pentru a reutiliza substratul prin desorbția analiților<sup>11</sup>.

Alegerea substratului EC-SERS depinde de aplicație și de resurse. Metodele complexe care necesită mai multe etape și echipamente speciale, cum ar fi nanolitografia, sunt explorate în general pentru fabricarea în masă a substraturilor EC-SERS<sup>12</sup>. În același timp, metodele mai simple, mai rapide și mai puțin costisitoare, cum ar fi auto-asamblarea nanoparticulelor în filme, sunt utilizate în principal la nivel de cercetare<sup>10,13</sup>. O altă opțiune convenabilă este utilizarea metodelor EC pentru fabricarea substraturilor EC-SERS, având în vedere disponibilitatea instrumentației EC într-un experiment Raman SEC. Prin urmare, substratul nanostructurat metalic poate fi depus electrochimic pe un suport corespunzător folosind săruri de Au(III), Ag(I) sau Cu(II) din soluții apoase<sup>5</sup>, iar în unele cazuri, substraturile metalice pot să fie activate prin cicluri de oxidare-reducere<sup>14-16</sup>.

EC-SERS a fost explorată pentru analiza unei game largi de analiți, de la molecule organice mici până la celule bacteriene în probe mai mult sau mai puțin complexe, cum ar fi formulări farmaceutice, fluide biologice sau chiar probe de mediu și alimentare<sup>1</sup>.

Prin urmare, EC-SERS are potențialul de a revoluționa domeniul (bio)analizei, avansând semnificativ spre aplicații analitice practice și făcând posibilă dezvoltarea dispozitivelor de analiză portabile. Mai mult, atunci când cuantificarea este realizată atât prin EC, cât și prin SERS, devine posibilă validarea încrucișată a datelor.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### 1. Obiective

*Primul obiectiv* al tezei curente a fost de a dezvolta platforme EC-SERS simple care să poată fi aplicate cu ușurință pentru detecția poluanților de mediu și alimentari emergenți. Astfel, performanța unor substraturi SERS diferite a fost evaluată, pornind de la dispersii coloidale și ansambluri coloidale care necesită integrare suplimentară cu elemente EC, până la electrozi serigrafiați gata de utilizare, activați prin metode electrochimice. În același timp, în vederea facilitării interacțiunii analitului cu substratul SERS, au fost explorate strategii pentru adsorbția și preconcentrarea unor poluanți de interes.

*Cel de-al doilea obiectiv* al acestei teze a fost de a investiga posibilitatea integrării platformelor EC-SERS în cipuri microfluidice și de a evalua influența diferitor parametri asupra performanței EC-SERS.



## **2. Studiul 1. Filme de nanoparticule de aur autoasamblate la interfața lichid-lichid pentru aplicații SERS**

### *2.1. Introducere*

Nanostructurile metalice anizotrope sunt explorate ca platforme SERS pentru aplicații analitice datorită sintezei facile, costului redus și a amplificării importante a câmpului electromagnetic la extremitățile ascuțite. În plus, prin asamblarea sau agregarea ulterioară a nanostructurilor poate fi obținută o amplificare suplimentară a câmpului electromagnetic și respectiv, a semnalului SERS<sup>17</sup>.

### *2.2. Obiective*

Scopul acestui studiu a fost de a evalua fezabilitatea utilizării nanoparticulelor coloidale anizotrope pentru dezvoltarea unor substraturi SERS solide și sensibile. În acest sens, eficiența de amplificare a semnalului SERS determinată de nanostructuri de aur osiforme (AuNBs) și nanoroduri (AuNRs) a fost evaluată, atât în dispersie coloidală, cât și sub formă de filme compacte generate la interfața lichid-lichid.

### *2.3. Materiale și metode*

AuNBs rezonante și non-rezonante au fost sintetizate printr-o metodă adaptată, mediată de coloid de inițiere, în timp ce AuNRs în dispersie apoasă au fost achiziționate. Nanostructurile au fost ulterior agregate în filme metalice la interfața apă/hexan folosind etanol. În toate experimentele, o moleculă de referință, rodamina 6G, a fost utilizată pentru a evalua performanțele SERS ale substraturilor.

Microscopia electronică de transmisie (TEM) și spectroscopia de absorbție UV-Vis au fost utilizate pentru a caracteriza atât AuNBs, cât și AuNRs. În plus, monitorizând proprietățile optice și morfologice ale AuNBs de aur în timp, stabilitatea lor în dispersia apoasă a fost evaluată.

### *2.4. Rezultate și discuții*

Comparând eficiența de amplificare a semnalului SERS a nanostructurilor amintite, s-a constatat că AuNBs non-rezonante sunt superioare AuNBs rezonante și AuNRs, atât în dispersie coloidală, cât și în filme compacte formate la interfața lichid-lichid. Agregarea în filme metalice a rezultat într-o amplificare a semnalului SERS de până la 55 de ori, în comparație cu semnalul înregistrat în dispersia coloidală. Pe lângă buna reproducibilitate obținută, măsurătorile efectuate pe mai multe regiuni ale filmelor au indicat o bună uniformitate. În plus, utilizând AuNBs non-rezonante la interfața lichid-lichid, s-a obținut o deviație standard relativă (%RSD) de 4,56% și o limită de detecție (LOD) de 5 nM pentru R6G, demonstrând utilitatea substratului dezvoltat pentru aplicații analitice sensibile.

### *2.5. Concluzii*

Chiar dacă performanțele analitice ale coloizilor și filmelor metalice au fost promițătoare, disponibilitatea la scară largă a AuNBs este limitată de lipsa reproducibilității sintezei și de stabilitatea redusă în timp. Astfel, nanostructurile coloidale sunt mai relevante la nivel de cercetare și mai puțin susceptibile să fie utilizate pentru dezvoltarea efectivă a senzorilor SERS sau EC-SERS sensibili și robuști.

### **3. Studiul 2. Detecția electrochimică a endosulfanului la electrod de aur modificat cu film subțire de politiofen**

#### *3.1. Introducere*

Eforturi considerabile sunt direcționate spre eliminarea globală a poluanților organici persistenti, cum ar fi endosulfanul. Sensorii electrochimici și cei SERS sunt explorați ca instrumente accesibile și rentabile pentru detecția și monitorizarea pesticidelor din mediul înconjurător. Pentru a adsorbi poluanții lipofili la suprafața metalului, mai multe strategii pot fi utilizate. În plus, o combinație de tehnici, cum ar fi EC-SERS, ar putea fi explorată pentru a îmbunătăți performanța detecției.

#### *3.2. Obiective*

Scopul acestui studiu a fost, în primul rând, de a preconcentra endosulfanul la un electrod de aur cu ajutorul unui strat subțire de polimer hidrofob. Apoi, a fost evaluată posibilitatea de integrare a platformei electrochimice cu analiza SERS pentru detecție duală.

#### *3.3. Materiale și metode*

O metodă de voltametrie ciclică (CV) a fost optimizată pentru electropolimerizarea bitiofenului pe un electrod cu disc de aur. Contribuția diferitor parametri (concentrația de monomer, natura electrolitului, direcția de scanare, fereastra de potențial) a fost evaluată prin modelarea suprafeței de răspuns. Morfologia și grosimea filmului polimeric au fost evaluate prin microscopie de forță atomică (AFM). Caracterizarea electrochimică a platformei analitice a fost realizată la fiecare pas prin voltametrie puls diferențială (DPV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) folosind o sondă redox cunoscută. Pentru măsurătorile SERS, filmul de politiofen a fost depus pe electrozi de aur serigrafiați, activați electrochimic.

#### *3.4. Rezultate și discuții*

Endosulfanul a fost preconcentrat în filmul uniform hidrofob ( $\approx 300$  nm grosime) și detectat folosind EIS la concentrații de până la  $0,1$  nM. În plus, platforma analitică a prezentat proprietăți reutilizabile și s-au înregistrat interferențe reduse de la diverse molecule testate.

În următorul pas, pentru o îmbunătăți selectivitatea, s-a investigat posibilitatea de cuplarea cu SERS. Spectrele SERS înregistrate au furnizat informații privind prezența filmului polimeric pe suprafața electrozilor de aur, dar nu a fost înregistrată amprenta spectrală a endosulfanului. Aceste rezultate au fost cel mai probabil obținute datorită activității Raman reduse a moleculelor de endosulfan, grosimii neideale și fluorescenței inerente filmului polimeric de politiofenului.

#### *3.5. Concluzii*

În acest studiu, a fost dezvoltată o platformă electrochimică bazată pe un film subțire de politiofen hidrofob pentru analiza în urme a endosulfanului. În timp ce platforma dezvoltată a prezentat o performanță analitică excelentă, cuplarea ulterioară cu SERS a fost pusă în dificultate de mai mulți factori.

## 4. Studiul 3. Investigarea unor platforme EC-SERS diferite pentru integrare cu dispozitive microfluidice

### 4.1. Introducere

Asamblarea controlată a nanostructurilor coloidale în filme metalice ordonate ar putea prezenta o reproducibilitate și stabilitate îmbunătățită, precum și o amplificare mai importantă a semnalului SERS. Printre alte tehnici, autoasamblarea convectivă (CSA), bazată pe asamblarea nanoparticulelor indusă de evaporare, este promițătoare pentru fabricarea platformelor periodice<sup>18,19</sup>. Integrarea platformelor EC-SERS în cipuri microfluidice ar putea aduce o serie de avantaje, cum ar fi un mediu bine controlat și o reproducibilitate îmbunătățită<sup>1</sup>. Deși promițătoare, această integrare se află în stadiile incipiente, fiind necesare studii avansate pentru o înțelegere completă a parametrilor implicați.

### 4.2. Obiective

Prima parte a acestui studiu a avut ca scop investigarea posibilității de a utiliza substraturi nanostructurate ordonate pentru analize EC-SERS. În acest scop, au fost testate substraturi fabricate fie prin CSA a nanoparticulelor de aur (filme de AuNP), fie prin CSA a unor sfere de polistiren urmată de pulverizare cu aur (AuFoN).

Al doilea scop al acestui studiu a fost integrarea SEC cu microfluidica și evaluarea influenței diferitor parametri legați de electrozi sau partea microfluidică asupra performanței EC-SERS a substraturilor.

### 4.3. Materiale și metode

Substraturile periodice de aur fabricate prin CSA au fost furnizate de INCDTIM (Cluj-Napoca, România). Substraturile de aur pentru integrarea microfluidică au fost fabricate prin tehnologia siliciului și furnizate de Sintef (Oslo, Norvegia). Variabilele studiate ale platformelor microfluidice EC-SERS au inclus grosimea oxidului și a metalului, înălțimea canalelor și metoda de asamblare (reversibilă sau ireversibilă).

Caracterizarea electrochimică a substraturilor a fost evaluată prin CV și EIS folosind o sondă redox cunoscută. Performanța EC-SERS a substraturilor a fost evaluată folosind tiabendazolul și propranololul ca poluanți reprezentativi.

### 4.4. Rezultate și discuții

Substraturile fabricate prin autoasamblare coloidală (AuFoN și filme AuNP) au fost utilizate cu succes atât ca electrozi, cât și ca substraturi SERS. Cu toate acestea, platformele sunt sensibile la căldura generată de laser, restricționând utilizarea (<10 mW) unei puteri mai mari și, prin urmare, limitând sensibilitatea.

Testele electrochimice pe electrozi planari de aur au indicat mai mulți parametri care sunt de o importanță majoră și trebuie controlați riguros pentru a obține câmpuri electrice uniforme în interiorul cipurilor microfluidice, cum ar fi adâncimea canalelor sau dimensiunea electrozilor. De asemenea, pentru a forma un pseudoelectrod de referință, precum și un substrat SERS performant în interiorul și în afara cipurilor microfluidice, a fost depus argint electrochimic. Acest subiect a fost explorat datorită limitărilor impuse de camerele curate (toți electrozii de pe cip au fost din aur).

#### 4.5. Concluzii

Utilizarea platformelor periodice fabricate prin CSA ar putea fi o alegere bună pentru unele aplicații EC-SERS, însă utilizarea lor a fost limitată în acest studiu de indisponibilitatea unui număr mai mare de electrozi.

Pentru integrarea reușită a EC-SERS cu microfluidica, dimensiunile electrozilor trebuie adaptate la volumul redus al camerei de testare. În cele din urmă, deși mai există unele limitări atunci când se utilizează tehnologia siliciului pentru a fabrica platforme microfluidice EC-SERS, pot fi găsite unele soluții, cum ar fi modificarea electrochimică ulterioară a electrozilor.

### 5. Studiul 4. Platformă EC-SERS microfluidică bazată pe electrozi serigrafiați de aur activați electrochimic pentru analiza tiabendazolului din suc de mere

#### 5.1. Introducere

Pentru a depăși dezavantajele prezentate de substraturile SERS, este investigată posibilitatea de a utiliza electrozi serigrafiați ca platforme EC-SERS accesibile și rentabile, în urma activării electrochimice. Cuplarea ulterioară a platformelor EC-SERS cu sisteme microfluidice deschide calea către aplicații la punctul de interes<sup>20</sup>.

#### 5.2. Obiective

Scopul studiului prezent a fost de a dezvolta o platformă simplă EC-SERS pentru detecția tiabendazolului din probe reale. În acest sens, a fost explorată activarea electrochimică rapidă, *ex situ*, a caracteristicilor SERS a AuSPes. În plus, a fost investigată posibilitatea integrării în cipuri microfluidice a AuSPes activați.

#### 5.3. Materiale și metode

O procedură cronoamperometrică în două etape a fost utilizată pentru activarea caracteristicilor SERS a AuSPes în prezența ionilor clorură în doar un minut. Restructurarea electrochimică a atomilor de aur de la suprafață a fost investigată prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX).

Pentru a crea ansambluri microfluidice, electrozii au fost integrați cu o parte superioară prin intermediul unui adeziv sensibil la presiune (PSA) prin aplicarea de presiune manuală.

#### 5.4. Rezultate și discuții

După activarea electrochimică, suprafața electrozilor de aur a fost îmbogățită cu conglomerate de nanoparticule de dimensiuni variabile, conducând la o creștere a factorului de rugozitate cu aproximativ 48%. Studiile EC-SERS ale tiabendazolului pe aceste substraturi au indicat o amplificare maximă a semnalului la  $-0,8$  V (vs. Ag/AgCl), probabil datorată facilitării interacțiunii chimice și a reorientării moleculare. În plus, reproducibilitatea testării EC-SERS a fost îmbunătățită la  $-0,8$  V, probabil datorată unei interacțiuni controlate.

Intensitatea semnalului EC-SERS a prezentat o corelație liniară cu concentrația de tiabendazol pe intervalul 0,5 - 10  $\mu\text{M}$ . Mai mult, tiabendazolul a fost detectat direct în probe de suc de mere contaminate cu tiabendazol, cu o recuperare de peste 82% și o LOD estimată la 0,061 ppm. Deoarece sucul poate avea niveluri variabile de aciditate, spectrele SERS ale tiabendazolului dependente de pH au fost înregistrate. S-a identificat un interval ideal de pH 4 - 7, unde polarizarea electrozilor a condus la o amplificare optimă a semnalului.

Testele microfluidice EC-SERS au arătat o amplificare continuă a benzilor Raman specifice tiabendazolului în condiții de curgere, amplificare corelată cu un număr crescut de molecule de pesticide care interacționează cu suprafața. Prin urmare, datorită afinității intrinseci a tiabendazolului față de aur, acesta poate fi preconcentrat la suprafața electrozilor dintr-un flux de soluție.

### 5.5. Concluzii

Tehnica EC-SERS propusă ar putea fi aplicată rapid pentru analiza (2 min) reziduurilor de tiabendazol în probe de suc neprocesat, utilizând electrozi/substraturi SERS de aur accesibili și fabricați la scară largă. În plus, platformele EC-SERS au fost asamblate în sisteme microfluidice, demonstrând performanțe crescute în condiții de curgere.

## 6. Studiul 5. Analiza EC-SERS cu rezoluție temporală a propranololului folosind electrozi serigrafiați activați *in situ* cu tiocianat ca agent de precipitare

### 6.1. Introducere

Activarea electrochimică a electrozilor serigrafiați și detecția moleculei de interes pot fi realizate într-un singur experiment (*in situ*), reducând numărul de etape implicate într-un test și evitând scăderea dependentă de timp a eficienței plasmonice<sup>14</sup>. Influența diferiților parametri asupra substraturilor SERS rezultate nu este pe deplin înțeleasă. Analizele EC-SERS cu rezoluție temporală (TR-EC-SERS) pot fi folosite pentru a oferi perspective asupra proceselor implicate, furnizând un set multiparametric de date bogat în informații<sup>21</sup>.

### 6.2. Obiective

Scopul acestui studiu a fost de a dezvolta o platformă simplă EC-SERS pentru detecția rapidă a propranololului, utilizând pentru prima dată ionii de tiocianat pentru a activa AgSPEs *in situ*. În plus, influența diferitor parametri (de exemplu, natura electrolitului, concentrația de KSCN, parametrii de procedură, pH-ul) asupra substraturilor rezultate a fost evaluată. Mai mult, posibilitatea de a utiliza metoda pentru detecția propranololului direct în probe de apă de râu și de robinet a fost evaluată.

### 6.3. Materiale și metode

SPELEC Raman a fost utilizat pentru a înregistra semnale EC-SERS sincronizate. AgSPEs au fost activați prin CV în prezența tiocianatului ca agent precipitant și propranololului ca poluant reprezentativ. Măsurători SEC UV-Vis, SEM și EDX au fost utilizate pentru a înțelege mai bine procesele implicate în timpul activării.

### 6.4. Rezultate și discuții

Prin ciclurile repetate de oxidare și reducere, tiocianatul ghidează formarea progresivă a unei rețele metalice de argint tridimensionale, nano-filamentoase, care amplifică eficient semnalul SERS al propranololului. A fost evaluată influența unor parametri critici, cum ar fi natura electrolitului, concentrația de KSCN și fereastra de potențial, asupra nanostructurării suprafeței în vederea optimizării metodei.

Pentru a îmbunătăți semnificativ reproducibilitatea măsurătorilor EC-SERS, a fost propusă utilizarea unui electrod de referință Ag/AgSCN. De remarcat este faptul că aplicarea unui puls potențiostatic de  $-0,3$  V (vs. Ag/AgSCN) imediat după activarea potențiodinamică a îmbunătățit liniaritatea și sensibilitatea metodei, atingând o LOD de  $3,66$  nM pentru propranolol. În plus, s-a obținut o recuperare bună ( $>93\%$ ) la testarea unor probe de apă de râu și de robinet îmbunătățite cu propranolol, fără a fi necesare procese de purificare sau extracție.

### 6.5. Concluzii

A fost propusă o abordare nouă pentru activarea AgSPEs folosind KSCN ca agent precipitant. Datorită robusteții, costului redus al analizei și timpului scurt de activare și detecție (3 minute), această metodă EC-SERS dezvoltată are un potențial semnificativ pentru monitorizarea reziduurilor farmaceutice în probe de mediu.

## 7. Concluzii generale

Pe parcursul tezei, s-a efectuat o evaluare extensivă a performanțelor diferitor substraturi EC-SERS. Electrozii serigrafiați, activați rapid prin metode EC, s-au dovedit a fi cele mai convenabile platforme, utilizate cu succes pentru detecția urmelor de poluanți de mediu și alimentari, respectiv propranolol și tiabendazol. În același timp, au fost explorate mai multe strategii pentru îmbunătățirea interacțiunii analitului cu substratul SERS, cum ar fi adsorbția moleculelor lipofile în filme polimerice hidrofobe sau polarizarea electrochimică a electrozilor.

În cele din urmă, s-a evaluat posibilitatea integrării platformelor EC-SERS în cipuri microfluidice. O înțelegere mai profundă a acestui nou domeniu a fost realizată prin testarea influenței diferitor parametri asupra performanței EC-SERS.

Au fost realizate progrese importante în ceea ce privește spectroelectrochimia Raman care acum reprezintă o alternativă promițătoare la metodele analitice convenționale. În viitor, senzorii microfluidici EC-SERS ar putea reprezenta sisteme complet portabile pentru monitorizarea în timp real a contaminării potențiale cu pesticide în diverse probe de mediu și pentru gestionarea descentralizată a siguranței alimentare.

## 8. Originalitatea tezei

Originalitatea acestei teze constă, pe de o parte, în dezvoltarea unor noi strategii EC-SERS pentru detecția sensibilă și rapidă a poluanților de mediu și alimentari și, pe de altă parte, în integrarea platformelor EC-SERS în cipuri microfluidice.

Astfel, această teză prezintă două abordări ingenioase EC pentru activarea atât a Au cât și a Ag SPEs. Utilizând aceste substraturi, s-au raportat primele analize EC-SERS a tiabendazolului și respectiv a propranololului. Mai mult, senzorii EC-SERS dezvoltați au fost utilizați pentru detecția directă și rapidă (sub 3 minute) a moleculelor model în probe reale (apă de râu, apă de robinet, suc) fără a fi nevoie de tratamente preliminare sau proceduri de extracție anevoioase care sunt de obicei necesare înaintea analizelor.

În cele din urmă, integrarea EC-SERS cu microfluidica se află în stadii incipiente, astfel că această teză prezintă primele încercări de integrare a senzorilor EC-SERS cu tehnologia Si și prima platformă EC-SERS microfluidică pentru preconcentrarea și detecția tiabendazolului.

În ansamblu, cercetarea realizată în cadrul acestei teze aduce progrese semnificative în domeniu, contribuind la dezvoltarea unor metode rapide și precise de analiză a poluanților direct la punctele de interes, deschizând calea către sisteme complet portabile pentru monitorizarea în timp real.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Moldovan R, Vereshchagina E, Milenko K, Iacob B-C, Bodoki AE, Falamas A, et al. Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications. *Anal Chim Acta* 2021;1209:339250.
2. Brosseau CL, Colina A, Perales-Rondon J V, Wilson AJ, Joshi PB, Ren B, et al. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nat Rev Methods Prim* 2023;3:79.
3. Moldovan R, Iacob B-C, Farcău C, Bodoki E, Oprean R. Strategies for SERS Detection of Organochlorine Pesticides. *Nanomaterials* 2021;11:304.
4. Bindesri SD, Alhatab DS, Brosseau CL. Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) fabric-based plasmonic sensor for point-of-care diagnostics. *Analyst* 2018;143:4128–35.
5. Dendisová M, Němečková Z, Člupek M, Prokopec V. EC-SERS study of phenolic acids sorption behavior on Au, Ag and Cu substrates – Effect of applied potential and metal used. *Appl Surf Sci* 2019;470:716–23.
6. Huang C-Y, Hsiao H-C. Integrated EC-SERS Chip with Uniform Nanostructured EC-SERS Active Working Electrode for Rapid Detection of Uric Acid. *Sensors* 2020;20:7066.
7. Hernandez S, Perales-Rondon J V, Heras A, Colina A. Determination of uric acid in synthetic urine by using electrochemical surface oxidation enhanced Raman scattering. *Anal Chim Acta* 2019;1085:61–7.
8. Lee T, Mohammadniaei M, Zhang H, Yoon J, Choi HK, Guo S, et al. Single Functionalized pRNA/Gold Nanoparticle for Ultrasensitive MicroRNA Detection Using Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Adv Sci* 2020;7:1902477.
9. Lynk TP, Sit CS, Brosseau CL. Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Platform for Bacterial Detection and Identification. *Anal Chem* 2018;90:12639–46.
10. Lynk TP, Clarke OJR, Kesavan N, Brosseau CL. Development of a sustainable plasmon-enhanced spectroelectrochemical sensor using avocado pit (*Persea americana*) extract.

- Sensors Actuators B Chem 2018;257:270–7.
11. Tsai M-H, Lin Y-K, Luo S-C. Electrochemical SERS for in Situ Monitoring the Redox States of PEDOT and Its Potential Application in Oxidant Detection. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11:1402–10.
  12. Mosier-Boss PA. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomater (Basel, Switzerland)* 2017;7:142.
  13. Teng Y, Ren Z, Zhang Y, Wang Z, Pan Z, Shao K, et al. Fabrication of liquid–liquid self-assembled Ag arrays on disposable screen-printed electrodes and their application in the identification and analysis of the adsorption behavior of organic carboxylates through in situ electrochemical surface-enhanced Raman. *New J Chem* 2020;44:1777–84.
  14. Martín-Yerga D, Pérez-Junquera A, González-García MB, Perales-Rondon J V, Heras A, Colina A, et al. Quantitative Raman spectroelectrochemistry using silver screen-printed electrodes. *Electrochim Acta* 2018;264:183–90.
  15. Martín-Yerga D, Pérez-Junquera A, Hernández-Santos D, Fanjul-Bolado P. In situ Activation of Thick-film Disposable Copper Electrodes for Sensitive Detection of Malachite Green Using Electrochemical Surface-enhanced Raman Scattering (EC-SERS). *Electroanalysis* 2018;30:1095–9.
  16. Ibáñez D, González-García MB, Hernández-Santos D, Fanjul-Bolado P. Detection of dithiocarbamate, chloronicotiny and organophosphate pesticides by electrochemical activation of SERS features of screen-printed electrodes. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2021;248:119174.
  17. Moldovan R, Toma V, Iacob B-C, Știuțiu RI, Bodoki E. Off-Resonance Gold Nanobone Films at Liquid Interface for SERS Applications. *Sensors* 2022;22:236.
  18. Muntean CM, Cuibus D, Boca S, Falamas A, Tosa N, Brezeștean IA, et al. Gold vs. Silver Colloidal Nanoparticle Films for Optimized SERS Detection of Propranolol and Electrochemical-SERS Analyses. *Biosensors* 2023;13:530.
  19. Falamas A, Cuibus D, Tosa N, Brezeștean I, Muntean CM, Milenko K, et al. Toward microfluidic SERS and EC-SERS applications via tunable gold films over nanospheres. *Discov Nano* 2023;18:73.
  20. Moldovan R, Milenko K, Vereshchagina E, Iacob B-C, Schneider K, Farcău C, et al. EC-SERS detection of thiabendazole in apple juice using activated screen-printed electrodes. *Food Chem* 2023;405:134713.
  21. Moldovan R, Perez-Estebanez M, Heras A, Bodoki E, Colina A. Activating the SERS features of screen-printed electrodes with thiocyanate for sensitive and robust EC-SERS analysis. *Sensors Actuators B Chem* 2024;407:135468.