

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vliv immobilizace biomimetických tyrozinázových katalyzátorů na jejich  
katecholázovou aktivitu

Bc. Aneta Hartmanová

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Hartmanová**  
Osobní číslo: **C19567**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Téma práce: **Vliv imobilizace biomimetických tyrozinázových katalyzátorů na jejich katecholázovou aktivitu**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. V teoretické části se zaměřte na charakterizaci dvoumocných komplexů mědi vykazující katecholázovou aktivitu vůči neurotransmiterům. Dále popište fyzikální a chemické přístupy, jak imobilizovat tyto komplexy na povrch elektrod.
2. V praktické části porovnejte katalytické vlastnosti volného a zakotveného komplexu mědi vůči 3,5-di-*tert*-butyl-katecholu a dopaminu pro budoucí vývoj tyrozinázových biomimetických senzorů.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Aneta Hartmanová v.r.

## Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala mé rodině a blízkým za jejich srdečnou podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytovali. Zvláštní poděkování patří také mému vedoucímu práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc s experimentální částí i se samotnou diplomovou prací. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za možnost podílet se, v rámci této diplomové práce, na projektu (19-03160S) Grantové agentury České republiky.

## **Název**

Vliv imobilizace biomimetických tyrozinázových katalyzátorů na jejich katecholázovou aktivitu

## **Anotace**

Hlavní náplní této diplomové práce bylo studium vlivu imobilizace komplexů imitujících tyrozinázu na jejich katecholázovou aktivitu. Vybraný komplex mědi(II) byl pomocí polymerů zachycen kovalentní vazbou na povrchu elektrod za tvorby Schiffových bází. Pro imobilizaci byly zvoleny polymery mající primární aminoskupinu, jako je chitosan, kolagen, poly-*o*-fenylendiamin, poly-*p*-fenylendiamin a 2-(1H-pyrrol-1yl)-ethanamin. Katecholázová aktivita byla proměřována na neurotransmiterech (adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu). Důkaz přítomnosti komplexu mědi a kinetická aktivita byly proměřovány elektrochemicky, tak i skenovací elektronovou mikroskopií. Tato studie by mohla do budoucna posloužit pro komerční vývoj biosenzorů.

## **Klíčová slova**

Komplexy mědi, tyrozináza, imobilizační techniky, katecholázová aktivita

## **Title**

Influence of immobilization of biomimetic tyrosinase catalysts on their catecholase activity

## **Annotation**

The main task of this thesis was to study the effect of immobilization of selected copper(II) complex mimicking the tyrosinase in its catecholase activity. The copper(II) complex was covalently bound using polymers on the surface of electrodes by forming Schiff bases. For immobilization, polymers having the primary amine functional group were selected, such as chitosan, collagen, poly-*o*-phenyldiamine, poly-*p*-phenyldiamine and 2-(1H-pyrrol-1yl)-ethanamine. Catecholase activity was measured on neurotransmitters (adrenaline, noradrenaline and dopamine). The presence of copper(II) complex and kinetic activity were measured electrochemically, as well as scanning electron microscopy. This study could be used for the commercial development of biosensors in the future.

## **Keywords**

copper complex, tyrosinase, immobilization techniques, catecholase activity

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>7</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>10</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
1. Umělé a přírodní enzymy.....	13
1.1. Tyrozináza a analogické umělé enzymy .....	14
1.2. Komplexy mědi.....	18
1.2.1. Motivy komplexů mědi.....	19
1.2.2. Stabilita komplexů mědi .....	22
1.2.3. Aktivita komplexů mědi .....	22
1.2.4. Aktivita biomimetických senzorů.....	23
1.2.5. Syntéza komplexů mědi.....	24
2. Možnosti zakotvení umělých komplexů pomocí polymerů.....	25
2.1. Vodivé polymery .....	25
2.2. Fyzikální zakotvení biomimetických komplexů .....	27
2.2.1. Fyzikální zakotvení pomocí polymerů.....	27
2.3. Chemické zakotvení biomimetických komplexů.....	28
2.3.1. Kovalentní zakotvení pomocí polymerů.....	28
2.3.2. Elektropolymerace fenylendiaminů.....	29
2.3.3. Elektropolymerace 2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanaminu.....	30
2.3.4. Chitosan zesítěný glutaraldehydem.....	31
2.3.5. Kolagen zesítěný glutaraldehydem.....	32
3. Kinetické metody chemické analýzy.....	33
3.1. UV-VIS spektrofotometrie .....	33
3.2. Elektrochemické metody .....	33

<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
4. Kovalentní zakotvení vybraných komplexů mědi pomocí polymerů.....	35
4.1. Chemikálie .....	35
4.2. Syntéza $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ komplexu .....	35
4.3. Příprava polymerů.....	36
4.4. Přístrojové vybavení .....	38
4.5. Elektroanalytické metody .....	38
5. Výsledky a diskuze .....	39
5.1. Elektrochemické chování komplexu.....	39
5.2. Elektrochemické chování neurotransmiterů .....	40
5.3. Optimalizace amperometrické detekce 3,5-DTBQ.....	42
5.4. Elektrochemická depozice a charakterizace polymerů.....	43
5.4.1. <i>O</i> -fenylendiamin.....	43
5.4.2. <i>P</i> -fenylendiamin.....	45
5.4.3. Poly-2-(1H-pyrrol-yl)ethanamin.....	46
5.4.4. Kopolymer z <i>p</i> -fenylendiaminu a polyanilinu.....	47
5.5. Depozice pomocí drop-castingu a charakterizace polymerů .....	49
5.5.1. Chitosan.....	49
5.5.2. Kolagen.....	50
5.6. Kinetická studie .....	52
6. Závěr .....	54
Seznam použité literatury .....	54



## Seznam použitých zkratek

<b>3,5-DTBC</b>	3,5-di- <i>terc</i> -butylcatechol
<b>3,5-DTBQ</b>	3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>o</i> -benzochinon
<b>AN</b>	anilin
<b>AuE</b>	zlatá disková elektroda
<b>CPE</b>	uhlíková pastová elektroda
<b>CV</b>	cyklická voltametrie
<b>DPV</b>	diferenční pulzní voltametrie
<b>GCE</b>	skelná uhlíková elektroda
<b>GTA</b>	glutaraldehyd
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>ITO</b>	vodivé sklo (oxid india a cínu)
<b><math>K_m</math></b>	Michaelisova konstanta
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
<b>MeCN</b>	acetonitril
<b>MeOH</b>	methanol
<b>OPD</b>	<i>o</i> -fenylendiamin
<b>PANI</b>	polyanilin
<b>PB</b>	fosfátový pufr
<b>PEDOT</b>	poly(3,4-ethylendioxythiofen)
<b>PPD</b>	<i>p</i> -fenylendiamin
<b>PPY</b>	polypyrrol
<b>PtE</b>	platinová elektroda
<b>PVA</b>	polyvinylalkohol
<b>PyEA</b>	2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanamin
<b>SCE</b>	nasyčená kalomelová elektroda
<b>SEM</b>	skenovací elektronový mikroskop
<b>SPE</b>	komerční síťotisková elektroda
<b>TYR</b>	tyrozináza
<b>TYR-Au-CPE</b>	pastová uhlíková elektroda s modifikovaným koloidním zlatem a tyrozinázou
<b>TYR-CPE</b>	pastová uhlíková elektroda modifikovaná tyrozinázou
<b>UV-VIS</b>	ultrafialovo-viditelná oblast
<b><math>V_{max}</math>, <math>V_0</math></b>	maximální rychlost, počáteční rychlost

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1.</b> Mechanismus oxidace fenolu katalyzované přítomností tyrozinázy.....	15
<b>Obr. 2.</b> Krystalová struktura TYR izolované ze <i>Streptomyces Castaneoglobisporus</i> .....	16
<b>Obr. 3.</b> Imobilizace enzymu na (a) karboxylovaném a (b) aminovaném povrchu spojením karbodiimidem; (c) Imobilizace enzymu na amino-funkcionalizovaných površích spojením glutaraldehydem.....	17
<b>Obr. 4.</b> Chemické struktury vybraných komplexů vykazujících katecholázovou aktivitu.....	19
<b>Obr. 5.</b> Rozdíl mezi jednojadernými a dvoujadernými komplexy mědi během katalytické oxidace 3,5-DTBC.....	21
<b>Obr. 6.</b> Syntéza řady komplexů $\text{CuCl}_2$ s 2,2-dipyridyldisulfidem (dpds).....	24
<b>Obr. 7.</b> Způsoby zakotvení enzymu na povrch transduktoru.....	25
<b>Obr. 8.</b> Předpokládaná elektrochemická syntéza poly-o-fenylendiaminu s následnou reakcí komplexu mědi.....	29
<b>Obr. 9.</b> Předpokládaná elektrochemická syntéza poly-2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanaminu s následnou reakcí komplexu mědi.....	30
<b>Obr. 10.</b> Předpokládaný způsob kovalentní imobilizace komplexu mědi pomocí chitosanu..	31
<b>Obr. 11.</b> Předpokládaný způsob kovalentní imobilizace komplexu mědi pomocí kolagenu...	32
<b>Obr. 12.</b> Syntéza ligandu 2,6-bis(4-methylpiperazine-1-yl-methyl)-4-formylphenol a $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ komplexu.....	36
<b>Obr. 13.</b> Cyklické voltamogramy elektrochemického chování komplexu.....	39
<b>Obr. 14.</b> Cyklické voltamogramy neurotransmiterů .....	40-41
<b>Obr. 15.</b> Reakční schéma přeměny adrenalinu až na deriváty indolu.....	42
<b>Obr. 16.</b> Cyklické voltamogramy 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.....	43
<b>Obr. 17.</b> Kalibrační křivky 3,5-DTBQ a vliv potenciálu na citlivost metody.....	43
<b>Obr. 18.</b> Cyklické voltamogramy elektropolymerace OPD.....	44
<b>Obr. 19.</b> Cyklické voltamogramy elektropolymerace PPD.....	45
<b>Obr. 20.</b> Zacyklení polymeru a důvod nenavázání $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ komplexu.....	46
<b>Obr. 21-22.</b> Cyklické voltamogramy elektropolymerace PyEA.....	46-47
<b>Obr. 23.</b> Cyklický voltammogram elektropolymerace AN.....	48
<b>Obr. 24.</b> Cyklické voltamogramy kopolymeru .....	48
<b>Obr. 25.</b> Cyklické voltamogramy chitosanu.....	49

<b>Obr. 26.</b> Důkaz mědi pomocí SEM a elementární analýzy na SCE (typ C110).....	50
<b>Obr. 27.</b> Cyklické voltamogramy kolagenu.....	50
<b>Obr. 28-29.</b> Důkaz mědi pomocí SEM a elementární analýzy na AuE a PtE.....	51
<b>Obr. 30.</b> Kinetické křivky 3,5-DTBC.....	52
<b>Obr. 31.</b> Kinetické křivky neurotransmiterů .....	53
<b>Obr. 32.</b> Diferenční pulzní voltamogramy adrenalinu.....	53

# Úvod

V této diplomové práci byl studován vliv imobilizace biomimetického tyrozinázového dvoujaderného komplexu mědi mající katecholázovou aktivitu. Doposud byla vyvinuta celá řada tyrozinázových biosenzorů pro případné klinické aplikace, přestože dostatečně nesplňují kritéria pro jejich zavedení do rutinní praxe. Proto cílem této práce bylo zjistit, zda je možné tyto umělé katalyzátory použít pro vývoj biomimetických biosenzorů tyrozinázového typu.

Tato práce je rozdělená na dvě hlavní části, teoretickou a experimentální. Teoretická část se věnuje popisu samotného enzymu a jeho umělým analogům. Dále jsou uvedeny podmínky, které jsou důležité pro správnou katalytickou aktivitu, kdy se zohledňuje molekulová struktura těchto synteticky vyrobených enzymů. Tato část rovněž obsahuje popis možností imobilizace prostřednictvím polymerů, které se použily při imobilizaci v samotném experimentu. V poslední části jsou stručně popsány analytické metody, kterými lze měřit kinetickou aktivitu těchto umělých enzymů.

Celá experimentální část se zaměřuje na imobilizaci vybraného komplexu mědi(II) pomocí kovalentní vazby mezi ligandem komplexu (karbonylové skupiny) a primární aminoskupinou vybraných polymerů (tvorba Schiffovy báze), které byly pomocí glutaraldehydu nebo elektropolymerací zakotveny na površích nejrůznějších elektrodoých materiálů. Chitosan a kolagen se imobilizovaly jednoduchým drop-castingem a zesíťováním glutaraldehydem. Při elektropolymeraci se použily především monomery *o*-fenylendiamin a *p*-fenylendiamin a 2-(1H-pyrrol-1yl)-ethanamin. Takto modifikované pracovní elektrody pokryté různým typem polymeru se ponořily do ethanolové roztoku s komplexem. Úspěšnost navázání komplexu mědi byla potvrzena, jak cyklickou voltametrií, tak i skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Jako vhodné substráty byly zvoleny katecholaminy (neurotransmitery), protože jejich metabolismus úzce souvisí s různými neurodegenerativními nemocemi.

Závěrem lze tvrdit, že samotný způsob tvorby polymerního filmu má veliký vliv na to, jestli se komplex imitující aktivitu tyrozinázy zachytí či nikoli. Dále bylo zjištěno, že podmínky elektropolymerace mají zásadní vliv na výslednou molekulovou strukturu, a tedy na množství přítomných primárních aminoskupin. Nejvyšší obsah zakotveného komplexu mědi byl zjištěn pro chitosanu a kolagen, zřejmě z důvodu vyšší tloušťky vrstvy v porovnání s polymery vzniklými elektropolymerací. Nicméně v této práci nebyla prokázána významnější katalytická aktivita zakotveného komplexu mědi(II).

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Umělé a přírodní enzymy

Během posledních několika desítek let se zvýšil rozsah výzkumu a pole působnosti vědců syntézy umělých enzymů, mezi kterými jsou nejčastěji zkoumány umělé tyrozinázy (TYR), katecholázy, proteázy a nukleázy. Jejich největší význam spočívá v dlouhodobé životnosti, kdy nacházejí uplatnění i v oblasti moderní medicíny [1].

Mezi vlastnosti biologických reakcí katalyzovaných enzymy patří vysoká selektivita a rychlost, zároveň nedochází ke trvalé změně struktury enzymu. Významnou skupinou enzymů jsou metaloenzymy, které mají kovová jádra zabudovaná ve svých aktivních centrech. Díky svým jedinečným vlastnostem jsou přechodné kovy nejčastěji se vyskytujícími kationty v metaloenzymech [2].

Přírodní enzymy jsou složeny z proteinového obalu s katalytickými skupinami a pro katalytickou činnost často potřebují specifické kofaktory či koenzymy. Mezi zvláštní skupinu umělých enzymů patří synteticky připravené komplexy, které mají velmi podobnou chemickou strukturu jako odpovídající kofaktory, ale již bez přítomnosti proteinů [2,3,4].

Koordinační sloučeniny jsou složeny ze dvou částí, jádra a ligandu. Nejvíce se pro tvorbu jádra používají přechodné kovy  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$  [5],  $\text{Cu}^{2+}$  [6],  $\text{Pd}^{2+}$  [7],  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  [5] a lanthanoidové kationty [6]. Dále komplexy mohou obsahovat jedno, dvě, tři nebo až čtyři jádra ve své molekulové struktuře. Z těchto iontů se komplexy mědi staly předmětem většiny studií, a to především díky své významné aktivitě ve srovnání s jinými ionty. Mezi klíčové faktory patří správná vzdálenost mezi jádry (vzdálenost Cu-Cu 2,90–2,99 Å), vhodné rozpuštědlo a ligandy se správnou hydrofobní strukturou a geometrií [1].

Na druhou stranu ligandy jsou tvořeny organickými molekulami, které koordinují kovové jádro a díky jejich velké rozmanitosti poskytují mnoho možností v syntéze komplexů, tak aby se daly přesně navrhout pro konkrétní účely. Jak je uvedeno výše, existuje široká škála druhů komplexů a každý má jiné vlastnosti. Mimo jiné ligandy mohou ovlivňovat vlastnosti jako rychlost reakce, selektivitu, stabilitu a aktivitu při různém pH prostředí, teploty a polaritě použitého pracovního média [1].

Zároveň je ale nutné dodržovat správnou vzdálenost a úhel jádra, geometrickou strukturu, tvar, velikost koordinačního čísla, a i široké okolí iontů. Nejvíce náročná je syntetická výroba těchto komplexů s vysokou rychlostí, strukturně-funkční stabilitou a schopností tvořit komplex se substrátem. Proto je potřeba dobře studovat mechanismy aktivních míst a strukturní i funkční vztahy. Mezi výhody umělé výroby komplexů, které napodobují aktivitu přírodních

enzymů, určitě spadá i to, že jsou přechodné kovy poměrně levné na rozdíl od pracného získávání a čištění enzymů z přírodních zdrojů. Dalé také tyto biomimeticky aktivní komplexy mohou být více odolné vůči teplotě, tlaku a pH [1,8,9].

Na závěr je třeba zmínit, že i přes dobrou katalytickou aktivitu nemají biosenzory připravené z přírodních enzymů (např. tyrozináza) větší využití v praxi, protože nelze docílit uspokojivé životnosti. Připravené biosenzory rychle ztrácí svoji stabilitu a jejich citlivost může klesnout i na méně než 80% po pouhých pár dnech. Na rozdíl u synteticky připravených enzymů, kdy lze docílit stability vyšší a déle trvající. Kromě toho umožňují sériovou výrobu senzorů ve formě čipů, což o přírodních enzimech tvrdit nelze [2,10,11].

## 1.1. Tyrozináza a analogické umělé enzymy

Ze všech možných přírodních enzymů, byla právě tyrozináza (EC 14.18.1) vybrána v rámci této diplomové práce a nahrazena vybranými umělými enzymy mající katecholázovou aktivitu. Celá řada vědeckých prací dokazuje, že biosenzory využívající TYR jakožto bioelementu plnicího rekogniční funkci mohou nalézt své široké uplatnění v diagnostice vážných onemocnění, kdy se využívá stanovení hladiny biomarkerů v tělních tekutinách.

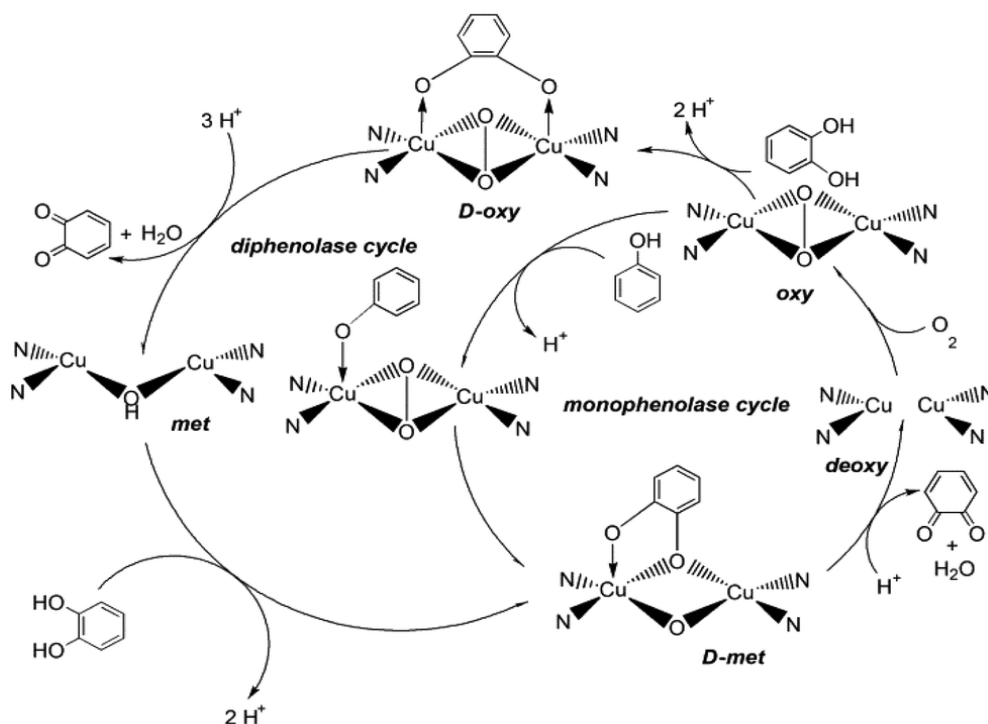
Bezpočet klinicky významných fenolických látek, které mají volný uhlík v *ortho* poloze nebo mají katecholovou strukturu lze považovat za substráty, a tudíž za potencionální analyty tyrozinázových biosenzorů. Pomocí elektrochemických senzorů založených na TYR je možné stanovit některé hormony, jako estrogény [12] a neurotransmitery [13], mikrobiální patogeny [14-16] a některé proteiny [17,18]. Z tohoto důvodu můžeme tyto biologicky aktivní senzory aplikovat v různých odvětvích medicíny, jmenovitě při diagnóze melanomu [19-21], Alzheimerovy choroby [22-24], stanovení aktivity jiných enzymů [25,26] a léčiv [26-30]. Mezi tyto látky patří L-DOPA (aminokyselina využívaná jako léčivo Parkinsonovi nemoci) [30,31], epinefrin (neurotransmitter) [32], penicilin (antibiotikum) [27], serotonin (neurotransmitter). Navíc neurotransmitter dopamin lze stanovit, který je zkoumán v souvislosti s Parkinsonovou chorobou [33].

Zde je nutné mít na paměti, že tyrozinázové biosenzory mají velmi nízkou životnost, která většinou nepřesahuje 80% po více jak dvou týdnech [34-37]. Zde uvedu několik konkrétních příkladů z publikovaných prací pro lepší představu o stabilitě tyrozinázových biosenzorů. V roce 2005, Z. Liu a kol. imobilizovali TYR na magnetických nanočásticích za použití uhlíkové pastové elektrody. Ve výsledcích uvádějí stabilitu 92% po 10 dnech a její pokles na 85% po 20 dnech. Po 1 měsíci klesla původní odezva na 70%, přičemž měření bylo

prováděno každé 3 až 4 dny [35]. V roce 2000, B. Wang a kol. imobilizovali enzym pomocí metody sol-gel a po 3 týdnech byla stabilita 73% při přerušovaném používání [36]. Jako poslední příklad uvedu publikaci z roku 2003 od S. Liu a kol., kde TYR imobilizovali na elektrodě z uhlíkové pasty s modifikovaným koloidním zlatem (TYR-Au-CPE) a po 20 dnech skladování při 4°C si senzor uchoval stabilitu 20% své aktuální odezvy a samotná uhlíková pastová elektroda (CPE) modifikována TYR (TYR-CPE) za stejných podmínek 72% [37].

Za předpokladu, že by se syntetizoval umělý enzym, který by dokázal nahradit tento enzym a měl dostatečnou katalytickou aktivitu a selektivitu, mohly by vzniklé biomimetické senzory nalézt své uplatnění v praxi, kdy by mohly být běžnou součástí domácností pacientů jako tomu je nyní u glukózových biosenzorů, známých jako glukometry.

TYR lze z chemického hlediska považovat za měďnatou monooxygenázu, která katalyzuje oxidaci fenolů na *o*-difenoly (kresolásavá aktivita) a následnou dvouelektronovou oxidaci vzniklých *o*-difenolů (katecholů) na odpovídající *o*-chinony (katecholázová aktivita) [34, 38], tak jak je znázorněno na Obr. 1.

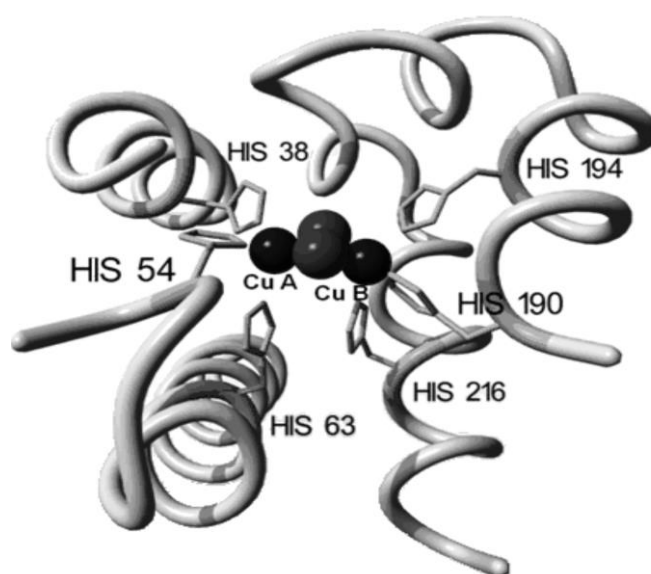


**Obr. 1.** Mechanismus oxidace fenolu katalyzované přítomností tyrozinázy [39].

Nízkomolekulární organické molekuly obsahující ve své struktuře motiv katecholu, proto též označované jako katecholaminy ( $R-Ar-(OH)_2$ ), zastupují v lidském těle funkci neurotransmiterů. Tyto katecholaminy se řadí mezi hormony vylučované chromafinními buňkami v dřeni nadledvin a sledování jejich hladiny v krvi může pomoci lékařům při diagnostice některých neurodegenerativních onemocnění. TYR katalyzuje hydroxylaci tyrosinu L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) a dále umožňuje přenos elektronů na molekulární kyslík za současné oxidace L-DOPA na dopachinon [40].

Enzym TYR je složen ze dvou podjednotek H a dvou podjednotek L o různých molekulových hmotnostech, podjednotky H o molekulové hmotnosti 43 kDa a podjednotky L o 14 kDa, celkově enzym odpovídá molekulové hmotnosti 120 kDa. Dohromady enzym dává tetramerní protein a je složený z  $\alpha$ -helixů,  $\beta$ -listů a smyček (H2L2) [41,42]. V porovnání s umělými komplexy, které se skládají z jádra a ligandu je rozdíl ve velikosti molekuly velmi významný, a to i díky chybějícímu proteinovému obalu. Většinou se hodnoty relativních molekulových hmotností komplexů imitujících katecholázovou aktivitu pohybují mezi hodnotami 700 až 800 [43].

Aktivní centrum zodpovědné za katalytickou aktivitu TYR se skládá ze dvou atomů mědi (CuA a CuB) spojených kyslíkovými můstky, kdy každá z těchto dvoumocných atomů mědi je koordinačně vázaná k šesti histidinovým zbytkům [44]. Zde je nutné poznamenat, že v případě umělých tyrozinázových biosenzorů se využívá právě tvorby donor elektronového páru mezi kationty mědi a dusíku v ligandech [45]. Obr. 2 nabízí pohled na molekulovou strukturu aktivního centra TYR.



**Obr. 2.** Krystalová struktura TYR izolované ze *Streptomyces Castaneoglobisporus* [46].

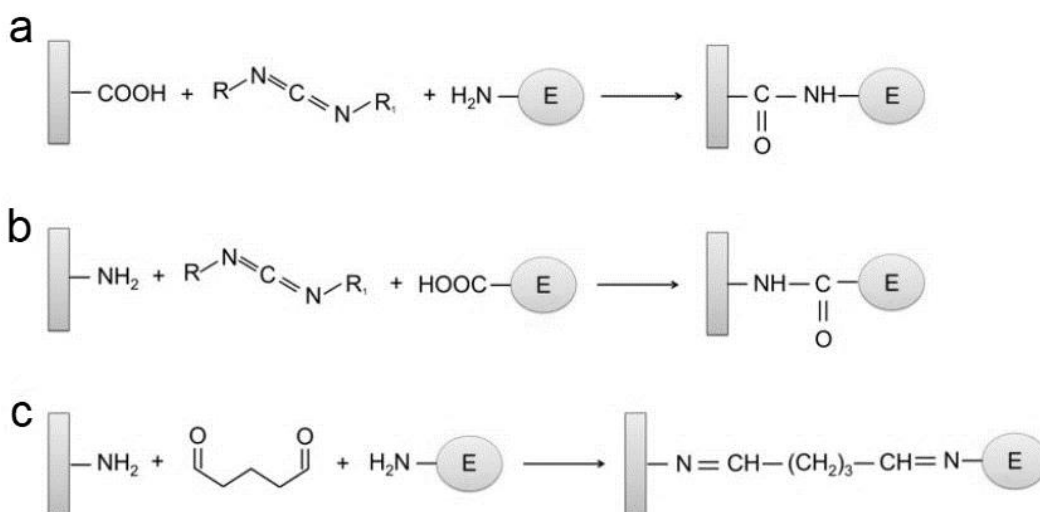


Výše zmíněná vazba atomů mědi kyslíkem hraje důležitou roli ve funkci TYR, kdy voda představuje konečný produkt katalytické oxidace (redukce vzdušného kyslíku) [45,47]. Histidinové zbytky vyčnívají z proteinového obalu (apoenzym), který obsahuje další významné aminokyselinové zbytky jako asparagin, glutamin, valin a methionin [41].

Pro přípravu katalytických biosenzorů, které se skládají z biorozpoznávacího prvku (samotný enzym, bakteriální buňka obsahující enzymy, celé tkáně buněk obsahující enzymy, lyzát buněk obsahující stále aktivní enzymy) a převodníku (transduktoru), se využívají metody chemické imobilizace, a to zejména připojení enzymu k matrici kovalentními vazbami. Díky jejich jednoduchosti a silné chemické vazbě mezi materiálem a biomolekulou nedochází k uvolnění molekul enzymů z povrchu nosiče [48].

Zde je důležité zmínit, že často ale dochází ke ztrátě aktivity v důsledku nežádoucí změny konformace enzymu během zesíťení. Kovalentní vazbou lze zakotvit enzym přímo na povrch transduktoru nebo na strukturu polymeru, který pokrývá transduktor. U elektrochemických biosenzorů představuje transduktor pracovní elektrodu [48].

Aby mohlo dojít ke kovalentnímu zakotvení enzymu nebo katalytického komplexu, musí mít enzym nebo ligand na svém povrchu volné funkční skupiny, jako  $-SH$  cysteinu,  $-NH_2$  lysinu a argininu,  $-COOH$  kyselin glutamové a asparagové atd. [49-51], kdy přírodní TYR má především  $-NH_2$  funkční skupiny [41]. Typy reakcí, které se mohou podílet na tvorbě kovalentní vazby, jsou diazotace [52], alkylace [53], tvorba Schiffovy báze [54], vznik amidové vazby [55], výměna thioldisulfidu [56] a esterifikace [57]. Obr. 3. ilustruje tři vybrané možnosti kovalentní imobilizace enzymu [58].



**Obr. 3.** Imobilizace enzymu na (a) karboxylovaném a (b) aminovaném povrchu spojením karbodiimidem; (c) Imobilizace enzymu na amino-funkcionalizovaných površích spojením glutaraldehydem [58].

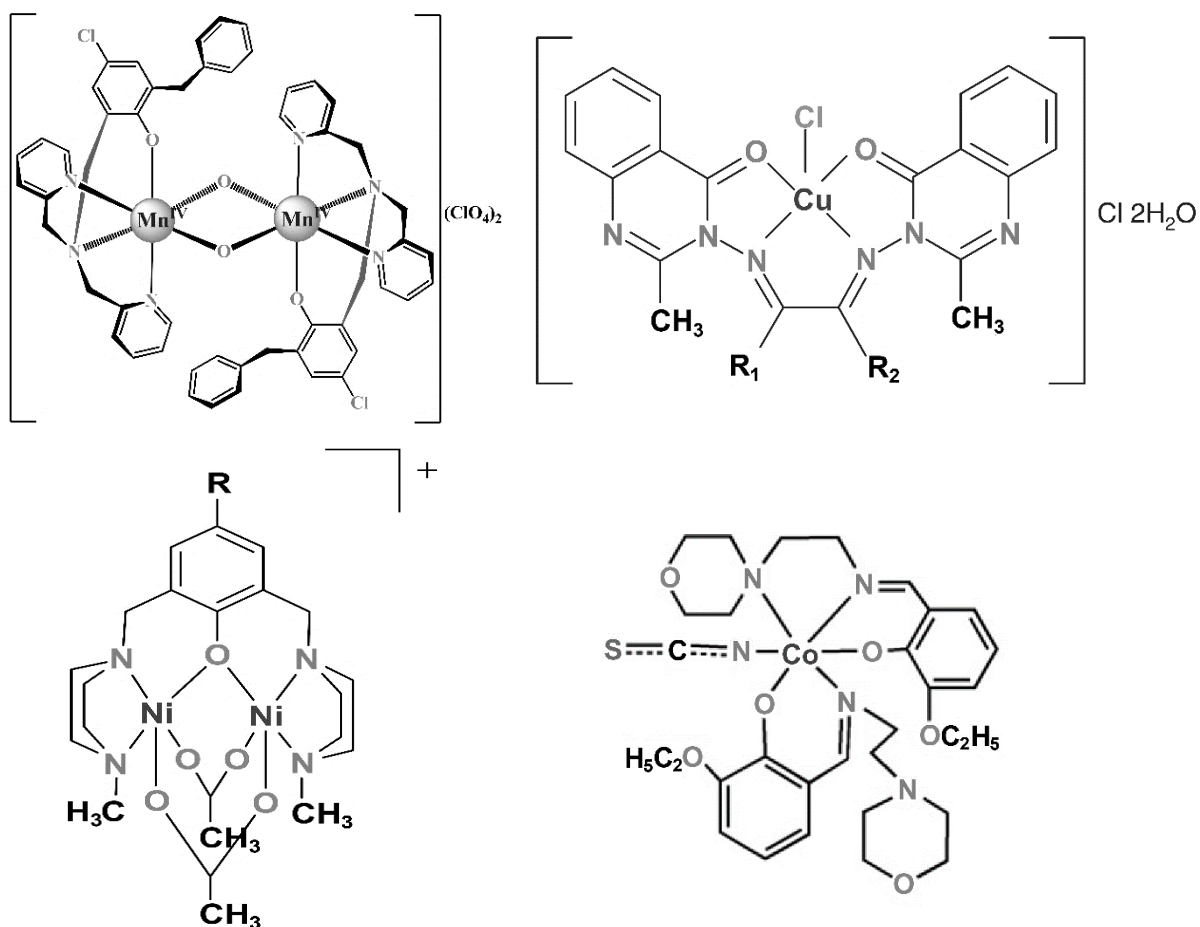
## 1.2. Komplexy mědi

Za posledních pár let bylo v literatuře popsáno mnoho druhů biosenzorů pro detekci fenolů, avšak většina z nich využívající enzym TYR. Princip bioelektrokatalytické přeměny fenolu na chinon je proto velmi dobře popsán. Díky difuzi projde fenol skrz citlivou membránu, kde je následně enzymaticky oxidován na chinon pomocí TYR za současné spotřeby kyslíku. Elektrochemickou redukcí těchto chinonů se substrát regeneruje, a právě tento krok je klíčový v případě senzorů na bázi TYR, protože to vede ke zvýšení produkce chinonů, čímž dochází k amplifikačnímu cyklu. Ve chvíli redukce chinonu na povrchu elektrody se zvyšuje redukční proud, který je úměrný koncentraci fenolového substrátu. Stále přetrvává krátká životnost těchto biosenzorů a z problematiky lze vyčíst, že je třeba zlepšit krok elektrochemické redukce [59,60].

Jednou z možností může být zlepšení katalytické účinnosti v citlivé vrstvě. Tento způsob popsal Hedenmo a kol. ve své publikaci, kde u imobilizovaného komplexu osmia (mediátor) a TYR zlepšili katalytický výkon díky efektivnějšímu zprostředkování elektroredukce [60]. Jako další způsob řešení této problematiky se nabízí usnadnění přenosu elektronů mezi aktivním místem enzymu a povrchem elektrody, redukcí nebo odstraněním proteinu (ochranného obalu) kolem aktivního místa. To lze uskutečnit pomocí uměle syntetizovaných aktivních míst v biomimetických komplexech [61], které napodobují katalytické vlastnosti TYR [43].

Tyto biomimetické komplexy by mohly být schopny nabídnout větší robustnost a stabilitu. Jednou z možností, jak vyvinout biomimetický TYR senzor je aproximace aktivního místa pomocí molekul obsahujících atomy mědi obklopených dusíkem. Tímto způsobem dostaneme senzor, který napodobuje deoxy formu TYR [38]. Například M. Sotomaoyor a kol. použili komplex chloridu tris-(2,2-bipyridil) měďnatého jako biomimetický katalyzátor TYR při konstrukci amperometrického senzoru pro stanovení dopaminu [43].

Jedním z hlavních důvodů výzkumu za posledních pár let byla skutečnost, že metaloenzymy katalyzují v přírodě spousty důležitých reakcí. V současnosti bylo napodobeno mnoho typů metaloproteinů s různou škálou iontů a ligandů. Mezi nejčastěji používané kationty kovů, které tvoří jádro katecholázových biomimetických enzymů patří Cu(II), Fe(II), Co(II), Zn(II), Mn(IV) a Ni(II) [62-65]. Na obr. 4. jsou znázorněny chemické struktury některých komplexů s katecholázovou aktivitou lišící se kovem v jádře.



**Obr. 4.** Chemické struktury vybraných komplexů s katecholázovou aktivitou [62-65].

Bezpochyby mezi nejčastěji syntetizovanou skupinu patří komplexy s dvojmocnou měď [43]. Při výzkumu se konstruují jak mono-, di-, tri-, tak i tetranukleární komplexy s různými ligandy, a tedy i různými vlastnostmi. Dalo by se říci, že ligand je nosná struktura, která koordinuje aktivní jádro a také zajišťuje vhodné prostředí pro katalytickou aktivitu. Jedním z důležitých faktorů je hydrofobicita, protože může usnadnit interakci ligandu se substrátem a tím pádem dostaneme lepší aktivitu komplexu [66]. Jak již bylo zmíněno, mezi nejčastější kovy pro tyto účely určitě spadá měď, pravděpodobně pro svojí vyšší aktivitu na rozdíl od ostatních kovů [67].

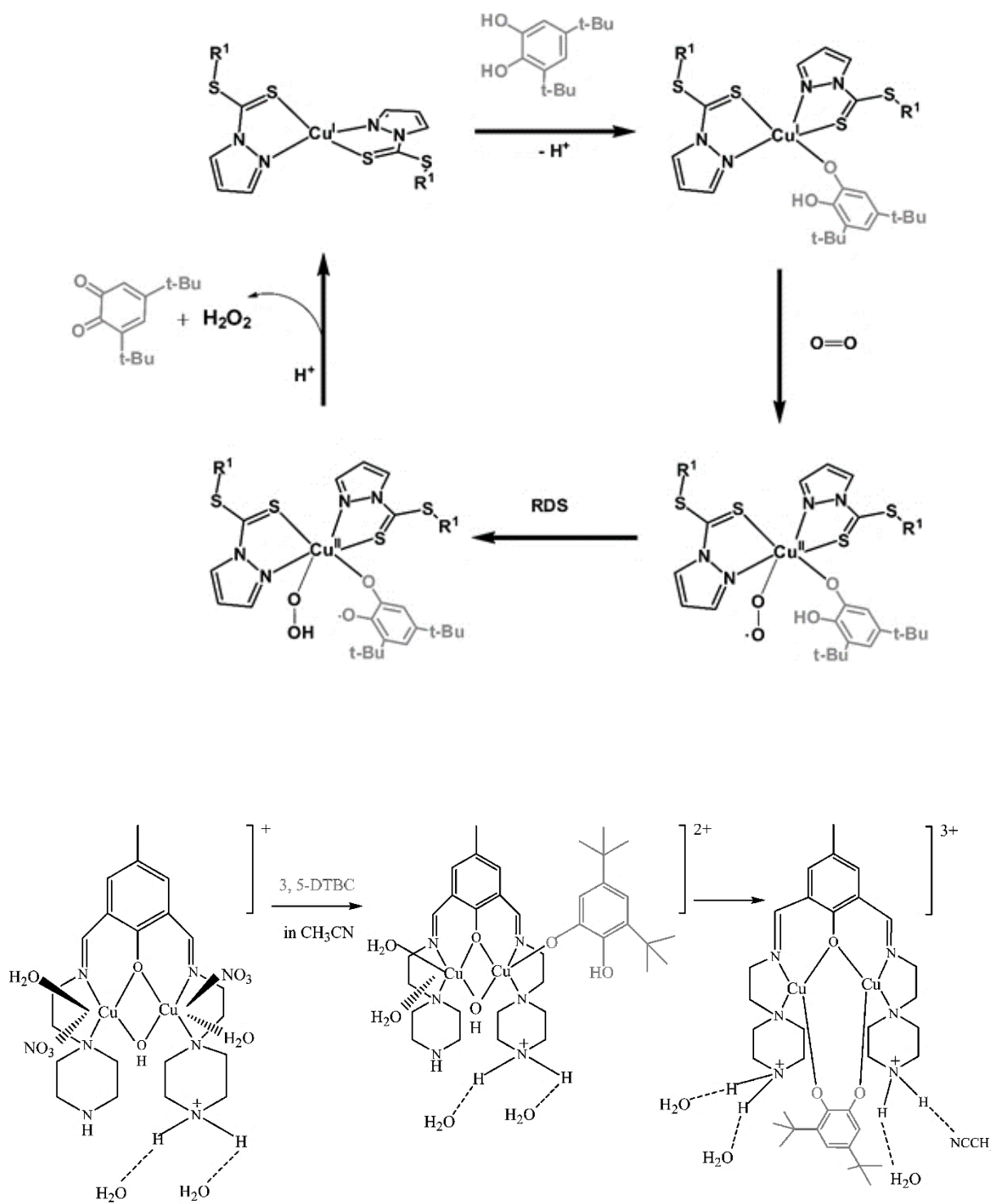
### 1.2.1. Motivy komplexů mědi

Kyslík je nezbytný pro katabolismus, a proto se stále studuje jeho interakce s biologickými organismy [68]. V tomto ohledu jsou velmi zajímavé metaloenzymy železa a

mědi, které se účastní procesů transportu a skladování dioxygeny a různých oxidačních reakcí. Enzym katechol-oxidáza všudypřítomný v rostlinách, hmyzu a korýšech [69] je protein mědi typu III obsahující binukleární aktivní místo, zaměřující se na dvou-elektronovou oxidaci širokého spektra *o*-difenolů (katecholů) na vysoce reaktivní chinony [38,70,71], které polymerují za vzniku pigmentu melaninu, který má za funkci chránit poškozené tkáně před patogeny [72]. Z toho vyplývá, že enzym katecholoxidáza hraje důležitou roli v odolnosti vůči chorobám u vyšších rostlin. Poznatky o katalytickém cyklu naznačují, že intramolekulární přenos vodíku z  $-OH$  skupiny substrátu na měď vázanou superoxo skupinou představuje zásadní krok určující rychlost oxidačního procesu [73].

Pro porozumění strukturních a funkčních vlastností katecholoxidázy se používají studie syntetického modelování. Jednoduché dvoujaderné komplexy mědi slouží jako modely pro studium enzymů, jako jsou TYR, laktáza či hemocyanin a další [74]. V poslední době se dvoujaderné komplexy mědi používají při výzkumu nových syntetických organických postupů pro reakce otevírání kruhu fenolů a *o*-difenolů, pro přípravu alkaloidů a pro přípravu polymerů obsahujících fenol [75]. I když několik dvoujaderných komplexů mědi úspěšně napodobuje enzym strukturně i funkčně [74], je důležité mít na paměti, že také velké množství mononukleárních komplexů mědi vykazuje významnou katecholázovou aktivitu [76,77].

Bylo zjištěno, že vzdálenost mezi atomy mědi v binukleárních komplexech mědi musí být menší než 5 Å, aby byl účinný přenos elektronů během katalytického procesu pro projevení katecholázové aktivity [78]. Pro aktivitu mononukleárních komplexů je důležitá nerovinná geometrie kolem aktivního centra komplexu. Katalytická aktivita mononukleárních komplexů může být přizpůsobena změnou geometrie a stericity kolem aktivního centra komplexu, díky čemuž můžeme studovat vztah struktury a katalytické aktivity komplexů [73]. Níže na Obr. 5. jsou uvedeny pravděpodobné katalytické cesty oxidace 3,5-di-*terc*-butylkatecholu (3,5-DTBC) jednojadernými a dvoujadernými komplexy mědi, kdy se předpokládá, že u dvoujaderných komplexů je katalytický cyklus totožný s TYR, a tedy že konečným produktem oxidace je voda a nikoli peroxid vodíku [79,80].



**Obr. 5.** Rozdíl mezi jednojadernými a dvoujadernými komplexy mědi během katalytické oxidace 3,5-DTBC [79,80].

### 1.2.2. Stabilita komplexů mědi

Stabilita komplexů je dána především silou koordinační vazby mezi centrálním atomem (Cu(II) či Cu(I) forma) a liganem, které mají volné elektronové páry, nejčastěji atomy kyslíku, dusíku a síry. Obecně je známo, že při kyselém pH dochází k protonaci těchto atomů a vyloučení mědi z koordinačního centra komplexů. Z tohoto důvodu se většina měření provádí v nevodném prostředí methanolu či acetonitrilu, nebo pokud jde o ve vodě rozpustné komplexy, tak je zapotřebí mít stabilní neutrální prostředí, tedy použít pufr.

Mezi další významné faktory, který ovlivňují stabilitu komplexů, lze zařadit rozpustnost. V případě, kdy se katalytická měření provádí v koncentrovaných pufrách, často dochází k jeho precipitaci. Z tohoto důvodu, se snaží syntetici, aby ligandy obsahovaly funkční skupiny, které umožní snadnější rozpustnost ve vodném prostředí.

V poslední řadě ovlivňuje stabilitu komplexů přítomnost organických látek bohatých na volné elektronové páry, kdy může docházet k rovnováze mezi distribucí centrálních atomů mědi uvnitř ligandu a vyvázaných atomů mědi přítomnou látkou, která má schopnost tvořit rovněž stabilní komplexy [43].

### 1.2.3. Aktivita komplexů mědi

Z předchozí kapitoly vyplývá, že katalytická aktivita komplexů úzce souvisí s jejich stabilitou. Nejčastěji jsou atomy mědi koordinovány atomy dusíku. Lze tedy předpokládat, že čím bude okolí dusíku bohatší na elektrony, tím silnější bude koordinační vazba mezi atomy mědi a dusíku. Dále je zřejmé, že čím více atomů dusíku bude obklopotvat atom mědi, tím stabilnější komplex bude.

Tyto faktory ale negarantují, že komplex bude stále katalyzátorem. Aby se dal komplex považovat za účinný katalyzátor, musí být vzdálenost mezi jádry mědi v rozmezí 2,90–2,99 Å, kdy vykazuje nejvyšší katalytickou aktivitu. Velmi důležitá je geometrie aktivního centra, která usnadňuje přístupnost k substrátu a navázání hydroxy skupin katecholu ke kationtům mědi, kdy okolní struktura ligandu nesmí bránit navázání substrátu, ale také musí omezovat přístup jiným látkám (potencionálním inhibitorům). V poslední řadě je nutné zmínit polaritu prostředí, kdy bylo zjištěno, že například při použití acetonitrilu je docíleno vyšší aktivity než u methanolu [1,67].

#### 1.2.4. Aktivita biomimetických senzorů

Na stabilitu a citlivost umělých senzorů využívajících komplexů mědi má především vliv koncentrace komplexu Cu(II) v membránovém roztoku, který se aplikuje na povrch transduktoru, pokud se bavíme o fyzikálním způsobu zakotvení. Podle studie M. Sotomayor a kol., kdy připravili senzor s různými koncentracemi komplexu mědi v roztoku dimethylformamidu lze říci, že při použití nižších koncentrací než  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  senzor není stabilní, z čehož lze usoudit, že komplex mědi nějakým způsobem napomáhá při sítování filmu na povrchu elektrody. Při použití koncentrace  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  má senzor dobrou stabilitu, ale vykazuje nižší citlivost. Z toho vyplývá, že s rostoucí koncentrací se snižuje citlivost senzoru. Tato skutečnost může být zapříčena množstvím center mědi a difúzí analytu, kdy se zvyšující se koncentrací dochází k obtížnější difúzi skrz membránu a odezva senzoru klesá [43].

Na rozdíl od koncentrace komplexu mědi tloušťka membrány z použitého polymeru nemá významný vliv na odezvu senzoru, pokud se pohybujeme v rozmezí od 15 do 46 nm. Můžeme tedy říci, že při použití polymerního filmu není ovlivněna interakce analytu s komplexem mědi. Tato skutečnost je důležitá pro zachování stejné odezvy v rozsahu tloušťky, což zajišťuje vysokou reprodukovatelnost. Stále je třeba mít na paměti možnost klesající odezvy při použití silnější tloušťky membrány, kde by použitý polymer mohl vytvářet přirozenou bariéru mezi komplexem a analytem [43].

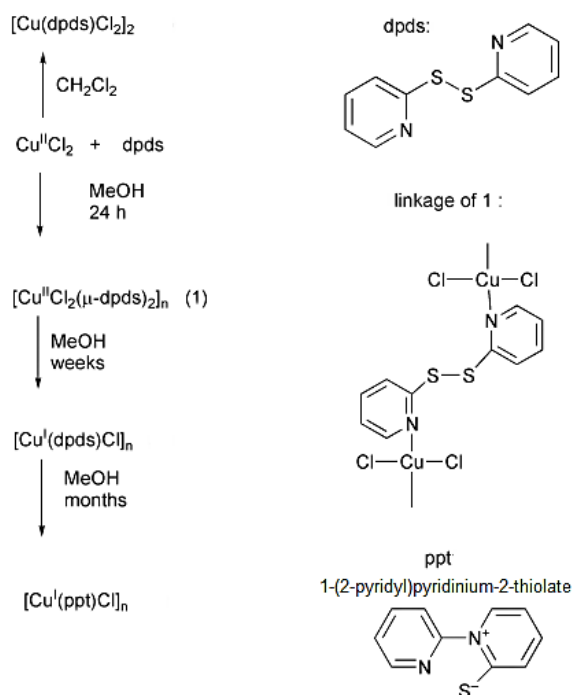
V případě kovalentního zakotvení může být koordinace centálních kovů ovlivněna typem chemické vazby ligandu s nosičem. Například u dvojjazvných ligandů závisí koordinace  $\text{Cu}^{2+}$  na způsobu imobilizace ligandů na nosič. Nicméně většina studií popisuje katalytickou aktivitu biomimetických komplexů pouze volně v roztocích, nikoli změny způsobené imobilizací, tak jak tomu je při vyvoji biosenzorů [73].

Cílem této vědecké práce bylo zjistit vliv imobilizace na katecholázovou aktivitu vybraného dvoujaderného komplexu mědi, kdy nejprve bylo nutné vybrat vhodný způsob kovalentního zakotvení.

### 1.2.5. Syntéza komplexů mědi

Experimentální znalosti dnešní doby nám nabízejí mnoho postupů, jak komplex syntetizovat a jaké nejrůznější ligandy lze použít. Typ ligandu právě určuje celkové vlastnosti vzniklých komplexů, tedy i jejich případnou katalytickou aktivitu.

Většinou se pro syntézu komplexů mědi používá  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , který se například ponechá reagovat se Schiffovou bází za míchání buď ve vodném anebo nevodném prostředí, kterým bývá methanol, ethanol nebo acetonitril. Dále je možné použít roztok  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  v methanolu a za stálého míchání k němu přidat roztok ligandu taktéž v methanolu. Výsledná směs se zahřeje, snížením tlaku se odstraní těkavé látky a směs se promyje ethanolem. Velmi často se při syntéze komplexů a ligandů používá reflux a výsledný produkt následně získáme ve formě krystalků [1,43,81]. Další ze způsobů je použití methanolického roztoku triflátu měďnatého, ke kterému se za stálého míchání přidá ligand také v methanolu a roztok se v rámci několika hodin za stálého míchání ponechá reagovat a po přidání například diethyletheru se vyloučí sraženina, která se zfiltruje a vysuší [82]. Na obr. 6. je uvedena jedna z možností syntézy  $\text{CuCl}_2$  komplexů. Pro přípravu ligandů lze použít pyridin, thiolátové skupiny, benzimidazolyl, imidazolyl, benzenové skupiny, methylové a ethylové zbytky a amino skupiny. Výsledné ligandy ve většině případech obsahují  $\text{C}=\text{N}$  vazby [1,82,83]. Pro syntézu ligandu se používá například směs 2-formylpyridinu a ethylendiaminu bez rozpouštědla nebo směs 2-formyl-6-methoxypyridinu, ethylendiaminu a  $\text{MgSO}_4$  v tetrahydrofuranu [84,85].



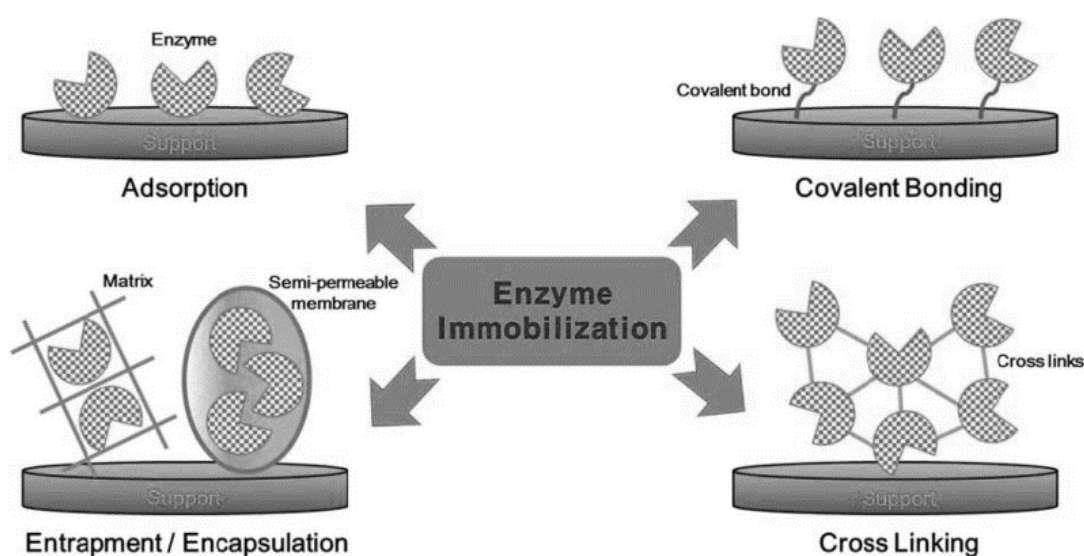
**Obr. 6.** Syntéza řady komplexů  $\text{CuCl}_2$  s 2,2-dipyridyldisulfidem (dpds) [82].



## 2. Možnosti zakotvení umělých komplexů pomocí polymerů

Zakotvení umělých i přírodních enzymů je velmi důležité ve vývoji bioenzorů, protože pomocí něho získáme kontakt mezi biomateriálem a převodníkem, a také nám napomáhá tento biomateriál stabilizovat pro opakované použití [86]. Vždy by měly být dodrženy tyto pracovní podmínky: úzký kontakt vybraného enzymu (přírodního nebo syntetického původu) s transduktorem, selektivní permeabilita bio-membrány, mechanická stabilita (zabránění nežádoucí eluci enzymů) a dostatečná vodivost biovrstvy.

V případě katalytických biosenzorů je vždy snaha docílit pevného zabudování katalyzátoru na povrch elektrody. Odpovídající techniky dělíme do dvou hlavních skupin: nekovalentní (fyzikální) imobilizace a imobilizace kovalentní (chemickou) vazbou. Volba typu imobilizace může do jisté míry snížit katalytické účinky zvoleného katalyzátoru, protože způsob zakotvení ovlivňuje orientaci bio-molekuly na povrchu elektrody, či zablokování aktivního místa [87,88]. Na Obr. 7 je schématicky znázorněn rozdíl mezi způsoby imobilizace enzymů (biologických katalyzátorů).



**Obr. 7.** Způsoby zakotvení enzymu na povrch transduktoru [89].

### 2.1. Vodivé polymery

Tato diplomová práce se především zaměřuje na kovalentní imobilizaci umělých enzymů prostřednictvím polymerů. Z toho důvodu jiné eventuální možnosti zakotvení nejsou popsány. Vodivé polymery jsou molekuly, které mají  $\pi$ -elektronový řetězec (konjugovaný systém s podélným střídáním jednoduchých a dvojných vazeb) a ten zodpovídá za jejich vlastnosti, mezi které se řadí elektrická vodivost, optické přechody s nízkou energií, nízký

ionizační potenciál a vysoká elektronová afinita [90]. U struktury běžných polymerů, které se získávají z jednoho druhu monomerní jednotky, většinou nenalezneme vážné problémy, co se týče chemického složení, snad s výjimkou účinků koncových skupin. V případě kopolymerů se však otázka složení stává velmi důležitou, protože poměr monomerů se může měnit. Důvodem je, že když směs monomerů polymerujeme, vytvořený kopolymer nemusí nutně mít stejné složení jako směs monomerů, ze kterého kopolymer syntetizujeme. Tedy výsledný kopolymer bude vykazovat heterogenitu ve složení [91].

Imobilizace biomolekul na pracovní elektrodu pomocí vodivých polymerů spadá mezi nejvyužívanější techniky při vývoji biosenzorů [92]. I přes to, že se tímto způsobem katalyzátory pevně zachytí, stále se substrát i produkty reakce mohou pohybovat, neboť polymer tvoří jakousi síť [91]. Na povrchu elektrody lze polymerní filmy vytvořit elektrochemickou depozicí [92] nebo přímou aplikací s odpařením použitých rozpouštědel (tzv. drop-casting) [59,93]. Obecně buď můžeme komplex přímo zabudovat do struktury polymeru na elektrodě, nebo ho vmícháme do směsi s polymerem, zesíťovadlem nebo i s nanočásticemi atd. za vzniku kompozitní vrstvy [93-95]. Díky použití vodivého polymeru dochází ke zvýšení specifického povrchu biosenzoru, čímž se zvýší významně citlivost [96].

Při přípravě biosenzorů lze využít *o*-fenylendiamin (OPD) či *p*-fenylendiamin (PPD) [97], polypyrrol (PPY) [98], polyanilin (PANI) [99], chitosan [100], cysteamin, Nafion® [46], poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) [101], epoxy pryskyřice [102] a polyvinylalkohol (PVA) [103]. Tyto polymery jsou schopné fungovat jako snímače a také imobilizační matrice pro zachycení i umělých enzymů [104]. Při použití polymerů, mající primární aminoskupinu ve své molekulové struktuře, jako imobilizačního činidla lze následně povrch na elektrodě zesíťovat pomocí glutaraldehydu (GTA) [98]. Musíme si uvědomit, že výsledné kompozity mohou obsahovat malé množství vody, které může způsobit zhoršení mechanických vlastností membrány a vést až k uvolnění zachycených komplexů [91]. Dalším významným parametrem je tloušťka vrstvy polymeru, kdy vysoká vrstva může způsobit popraskání výsledné membrány a zhoršení měřeného signálu. Zase velmi tenká vrstva nedovolí imobilizovat dostatečné množství biomolekuly. Z tohoto důvodu je nutné optimalizace a nalezení kompromisu mezi stabilitou a citlivostí výsledného senzoru.

Elektrochemická polymerace je jednoduchý přístup pro imobilizaci biomateriálu na povrchu elektrod. Tento proces lze pojímat tak, že provedeme elektrochemickou reakci (dominují anodické oxidace) monomeru z roztoku obsahující biomateriál a vytvoří se tak polymer na povrchu elektrody anebo se provede elektrochemická polymerace z roztoku a následně se na vytvořený polymer v dalších krocích zachytí biomateriál. Díky možnosti řídit

proces potenciálem elektrody lze přesně kontrolovat nejen tloušťku polymerního filmu, ale i množství biomateriálu zachyceného ve struktuře polymeru. Tuto techniku je možné využít k vytvoření vícevrstevných struktur polymeru a biomateriálu, buď s jedním nebo více biomateriály v jednom polymeru, nebo s jedním biomateriálem ve vícevrstevném kopolymeru. V důsledku těchto možností je možné tuto techniku uplatnit při výrobě biosenzorů, v molekulární elektronice a také při studiu heterogenní enzymové katalýzy v membránách [105,90].

Vodivé polymery mohou být nejčastěji syntetizovány buď chemickou nebo elektrochemickou oxidací či UV zářením, přičemž druhý přístup byl vybrán v rámci experimentální části. Velká výhoda elektropolymerace je, že jí lze provádět při laboratorní teplotě [90]. Zachycení biomateriálu v polymerních vodivých filmech umožňuje kontrolovanou lokalizaci na elektrodách [106]. Vodivé polymery umí přenášet elektrický náboj vzniklý biochemickými reakcemi do elektronického obvodu [107]. Díky tomu, že polymery mohou být nanášeny na definované oblasti elektrody a biomateriál lze zachytit během elektrochemické polymerace se tato metoda začala široce využívat pro výrobu amperometrických biosenzorů [108].

## 2.2. Fyzikální zakotvení biomimetických komplexů

Tento způsob reprezentuje čistě mechanické zakotvení na povrch elektrody. Spadá sem přímé zakomponování do elektrodového materiálu, kdy komplex přímo vmícháme k vodivému uhlíkovému prášku s lipofilním pojivem [109,110]. Další z možností je přímá adsorpce na povrch elektrodového materiálu, kdy na povrch elektrody nanášíme roztoky, které chceme imobilizovat [111]. Při této technice využíváme fyzikální interakce mezi povrchem elektrody a nanášeným roztokem, konkrétně Van der Waalovy síly, vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce [112,113]. Musíme mít také na paměti možnou eluci biomateriálu z povrchu elektrody, kterou může mít za následek změna pH, iontové síly nebo teploty [114]. Vhodný elektrodový materiál pro tento způsob zakotvení jsou formy uhlíku, lze použít i formy platiny a zlata [110].

### 2.2.1. Fyzikální zakotvení pomocí polymerů

Obecně mezi fyzikální zakotvení můžeme zařadit adsorpci a začlenění komplexu do sítě polymeru, tzv. vznik kapsulí [115]. Buď komplex přímo rozpustíme v roztoku s polymerem a tento roztok se nanese na povrch nosiče nebo postupně kapeme reagenty na povrch nosiče

(drop-casting) a necháme reagovat po předem stanovenou dobu a za vhodných podmínek, aby byla udržena aktivita enzymu. Neadsorbované molekuly se z povrchu nosiče odstraní promytím. Další možnost představuje ponoření elektrody pokryté polymerem do roztoku s komplexem po určitou dobu. Tento způsob imobilizace je levný, jednoduchý, rychlý a nedestruktivní vůči enzymové aktivitě. Na druhou stranu jsou enzymy volně vázány pouhými slabými fyzikálními silami a změna teploty, pH či iontové síly může vést k desorpci enzymu. Navíc takto vyrobené biosenzory nemusí vykazovat dobrou stabilitu při skladování [116].

### 2.3. Chemické zakotvení biomimetických komplexů

Metody chemického zakotvení zahrnují zejména připojení komplexu k matici kovalentními vazbami, zesílení mezi komplexem a maticí a zesílení komplexu multifunkčními činidly. Tyto postupy jsou velmi často využívány díky jejich jednoduchosti a silné chemické vazbě mezi materiálem a biomolekulou. Velmi důležitý aspekt je možnost ztráty aktivity v důsledku nežádoucí změny konformace komplexu během zesílení [48].

Kovalentní vazbou můžeme zakotvit komplex přímo na povrch elektrody nebo na strukturu polymeru, který pokrývá elektrodu, kdy se využívá vzniku chemické vazby mezi ligandem a polymerem. Tudíž aby mohl být komplex kovalentně zakotven, musí mít na svém povrchu volné funkční skupiny, které se zúčastňují kovalentní reakce. Zejména se jedná o  $-NH_2$  a  $-OH$  skupiny, ale i jiné jako například  $-SH$  a  $-COOH$  [117]. Mezi reakce, které se podílejí na tvorbě kovalentní vazby, patří diazotace [52], alkylace [53], tvorba Schiffovy báze [54], vznik amidové vazby [55] a výměna thioldisulfidu [56].

#### 2.3.1 Kovalentní zakotvení pomocí polymerů

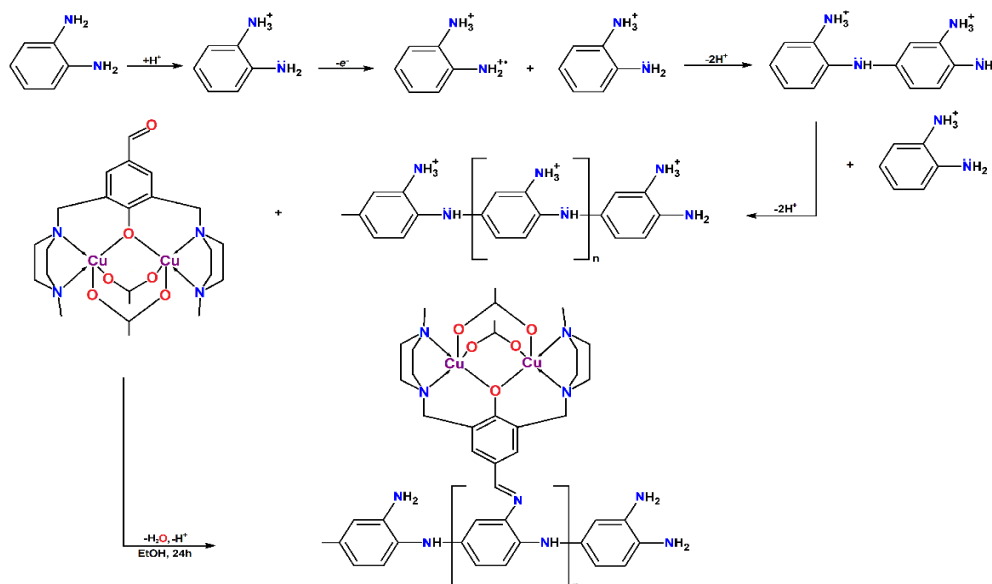
Mezi funkční skupiny, které lze použít při kovalentní vazbě patří: aminoskupina, karboxylová skupina, fenolová skupina, sulfhydrylová skupina, thiolová skupina, imidazolová skupina, indolová skupina a hydroxylová skupina [117]. Postup navázání komplexu na pevný nosič má dvě fáze: (i) aktivace povrchu pomocí molekul linkeru, jako je glutaraldehyd nebo karbodiimid, a (ii) kovalentní vazba komplexu na aktivovaný nosič. Linkerové molekuly jsou multifunkční činidla (glutaraldehyd nebo karbodiimid), které působí jako můstek mezi povrchem nosiče či polymeru a ligandu komplexu prostřednictvím kovalentní vazby [89].

Kovalentní imobilizace poskytuje silnou vazbu mezi komplexem a nosičem a nabízí možnost dobré kontroly množství imobilizovaného komplexu, což o fyzikální imobilizaci tvrdit nelze. Opět zde lze použít „drop-casting“, kapání roztoků komplexu a polymeru na povrch

nosiče nebo ponoření nosiče s polymerem do roztoku komplexu. Je nutné předem správně určit dobu prováděné imobilizace, aby měly všechny složky dostatečný čas spolu zreagovat a vytvořit kovalentní vazbu [89]. V této vědecké práci se upřednostovalo zakotvení vybraného komplexu mědi právě cestou kovalentní imobilizace, kterým byl binukleární komplex mědi využívající ligand s volnou aldehydickou skupinou  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ . U tohoto komplexu jsou vždy dva atomy mědi koordinačně vázány čtyřmi atomy dusíku a dvěma acetáty (OAc).

### 2.3.2. Elektropolymerace fenylendiaminů

Monomery jako *o*-fenylendiamin a *p*-fenylendiamin jsou velmi často využívány pro tvorbu polymerního filmu na elektrodě pomocí anodické oxidace. Syntéza se provádí v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí, jak ve vodném, tak i nevodném rozpouštědle. Během procesu elektropolymerace dochází k oxidaci aminoskupiny (jedné nebo obou) a polymerní film se ukládá na povrch pracovní elektrody, ale může dojít k tvorbě rozpustných oligomerů [118,119]. Při tomto procesu se používá tříelektrodové zapojení a polymer je v roztoku elektrolytu. Vlastnosti a tloušťka vrstvy výsledného polymeru může být ovlivněna volbou podmínek elektropolymerace, jako je pH, elektrolyt, použité potenciály, rychlost skenování, doba polymerace a počáteční koncentrace monomeru [118, 119]. Níže na Obr. 8 je navrženo schéma imobilizace  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu na povrch elektrody pokrytý vrstvou poly-*o*-fenyldiaminu.

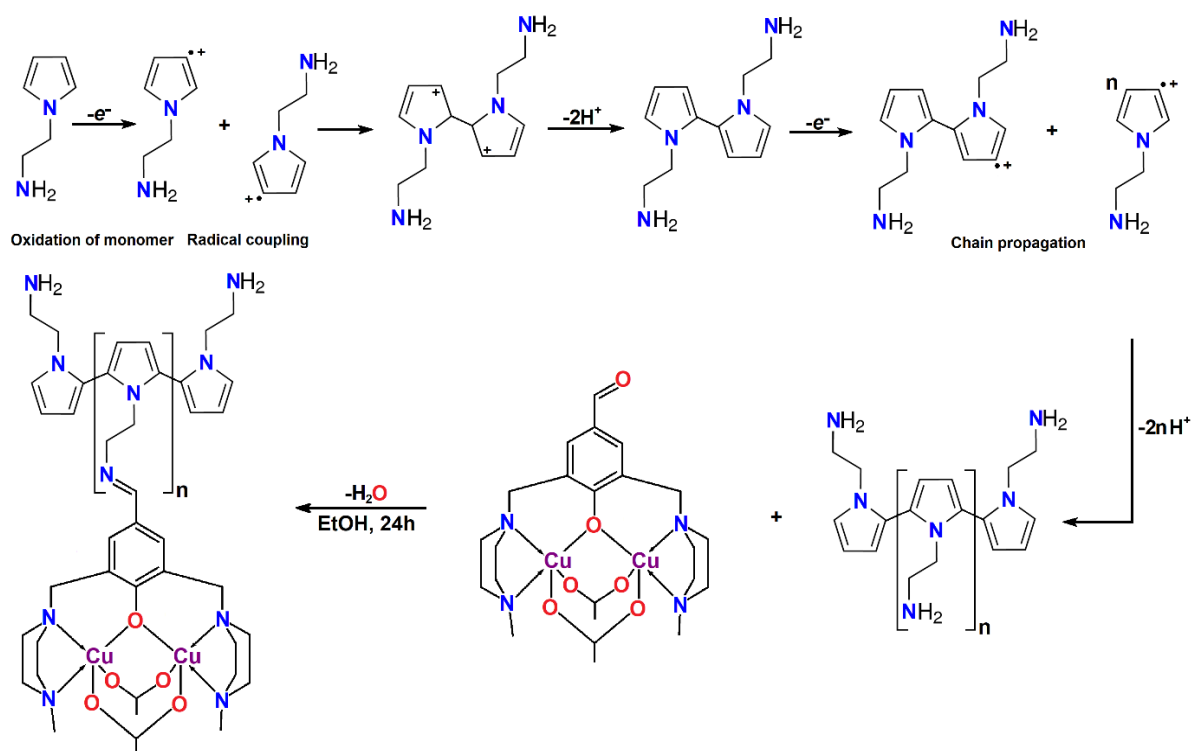


**Obr. 8.** Předpokládaná elektrochemická syntéza poly-*o*-fenyldiaminu s následnou reakcí komplexu mědi.

### 2.3.3. Elektropolymerace 2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanaminu

Mimo jiné i polymery odvozené od pyrrolu mají slibný potenciál pro vývoj biosenzorů. Důvodem jsou jejich velmi dobré vlastnosti, a to snadná příprava, vysoká vodivost a relativně vysoká stabilita vůči prostředí (teplota a vlhkost), proto byl pro elektropolymeraci kromě fenylendiamů vybrán i 2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanamin [120,121]. Tento monomer má opět ve své struktuře volné aminoskupiny, které by mohly zůstat volné během elektropolymerace pyrrolového kruhu, a tudíž posloužit pro tvorbu Schiffovy báze s aldehydickou skupinou ligandu. Níže na Obr. 9 je navržen pravděpodobný reakční schéma imobilizace  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu na povrch elektrody pokrytý vrstvou poly-2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanaminu.

Syntéza polymeru většinou probíhá v prostředí pufrů, kyselém vodném roztoku, ale i v nevodném prostředí, například v acetonitrilu [108,122]. Průběh procesu elektropolymerace a faktory ovlivňující vlastnosti výsledné polymerní vrstvy jsou totožné jako u fenylendiaminů [120-122].



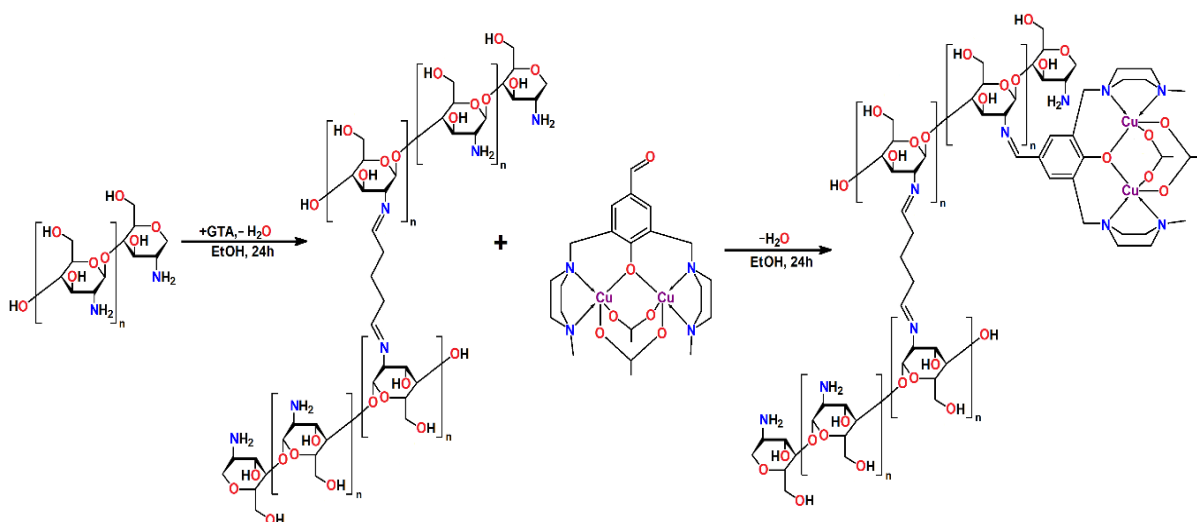
**Obr. 9.** Předpokládaná elektrochemická syntéza poly-2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanaminu s následnou reakcí komplexu mědi.

### 2.3.4. Chitosan zesíťený glutaraldehydem

Chitosan (nelineární polysacharid) je deacetylovaný produkt přírodního chitinového polymeru a je šetrný k životnímu prostředí. Netoxické, biologicky odbouratelné a biokompatibilní vlastnosti chitosanu velmi přispívají k využití v biotechnologických aplikacích [123].

Zajisté nejjednodušším přístupem je drop-casting, kdy postupně kapeme roztoky na povrch elektrody. Nejprve můžeme povrch modifikovat chitosanem a na elektrodě vytvořit chitosanový film (stupeň deacetylace kolem 90%), následně se elektroda pokape glutaraldehydem (GTA) pro zesíťení. Nebo se může roztok chitosanu rovnou smístit s GTA a tento roztok poté nanést na elektrodu [124]. Také lze nejprve povrch elektrody aktivovat pomocí GTA, následně pokapat chitosanem a zesíťit pomocí GTA, jako poslední vrstva se opět aplikuje chitosan. Aktivované amino-konce chitosanu s aldehydickou skupinou GTA vytvoří Schiffovu bázi. Elektroda se následně ponoří do roztoku s cílovou biomolekulou (komplex) a nechá se reagovat, kdy se biomolekula přes funkční skupiny naváže na polymerní film, jak je znázorněno na Obr. 10. Lze použít jak komerční síťotiskové elektrody, tak i klasické elektrody formy uhlíku, platiny a zlata [125,126]. V případě použití uhlíkové skelné elektrody můžeme zvolit i možnost elektrodepozice chitosanu na povrch elektrody [127].

Je velmi důležité zvolit správnou koncentraci chitosanu v roztoku fosfátovém pufru o pH 7. Při velké koncentraci může film chitosanu na elektrodě popraskat a při příliš malé koncentraci se nemusí navázat komplex mědi v dostatečném množství, i proto se chitosan nanáší ve více vrstvách. Než se elektroda ponoří do roztoku s komplexem, je nutné nezreagované zbytky opláchnout ethanolom. [123-126].



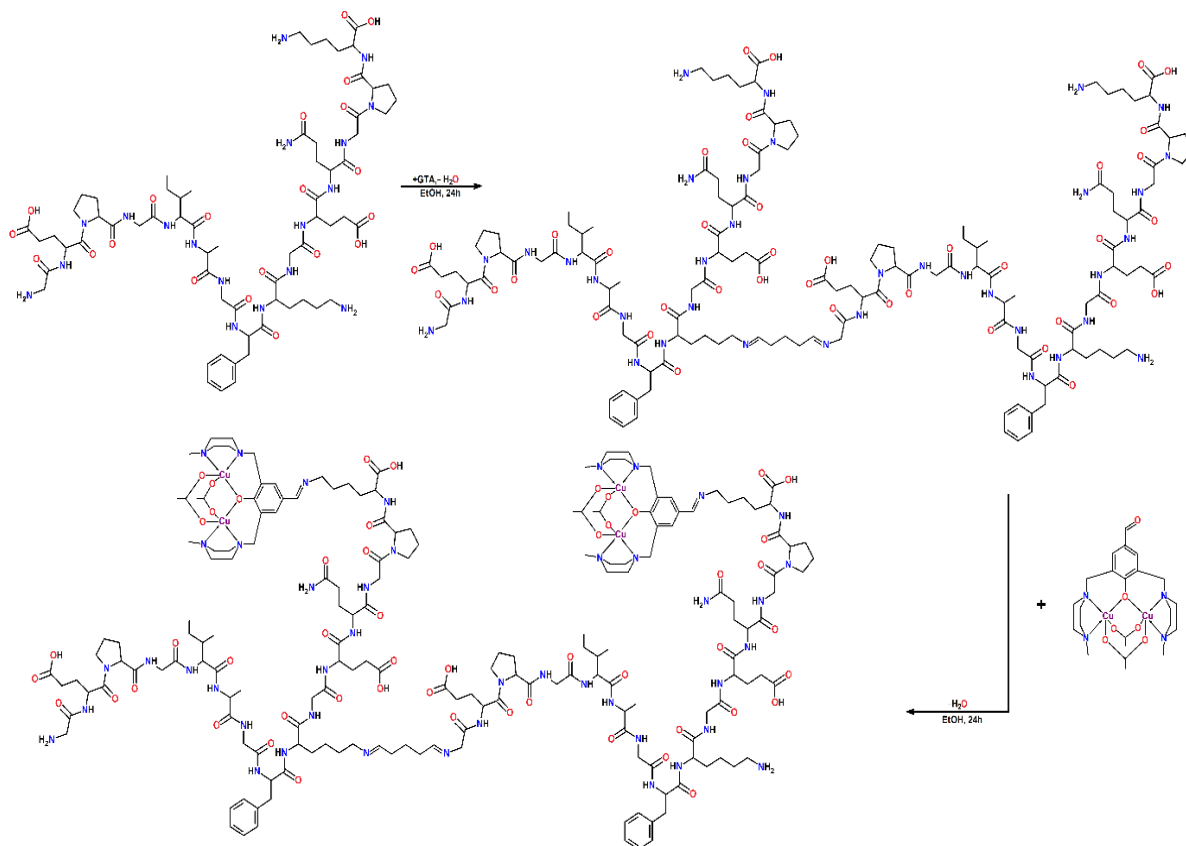
**Obr. 10.** Předpokládaný způsob kovalentní imobilizace komplexu mědi pomocí chitosanu

### 2.3.5. Kolagen zesítený glutaraldehydem

Kolagen spadá mezi proteiny a nachází se v těle zvířat i lidí, kde tvoří vrstvu kůže, kosti, chrupavky a šlachy. Existuje spousta druhů kolagenu, ale všechny mají struktury trojitě šroubovice, kde jsou vázány aminokyseliny (hydroxyprolin, glycinové a prolinové zbytky, arginin a lysin). Díky aminoskupinám je opět možné použít kolagen pro imobilizaci komplexu na povrch elektrody kovalentní vazbou (Obr. 11). Pro vědecké účely se používá kolagen extrahovaný ze zvířecích šlach, kolagen typu II [128].

Stejně jako u chitosanu se pro imobilizaci cílové biomolekuly může zvolit metoda drop-casting a postupy jsou totožné. Opět můžeme kolagen přímo smíchat v roztoku s GTA, nebo postupně po vrstvách kapat roztoky kolagenu a GTA. Také zde dojde ke tvorbě Schiffovy báze [54,89,128].

Zde je nutné zmínit špatnou rozpustnost polymerů, kdy roztok kolagenu nemohl mít vyšší koncentraci než  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ve fosfátovém pufru o pH 7. Z tohoto důvodu se doporučuje kolagen nanášet ve více vrstvách. Po zesítní GTA je vhodné membránu dostatečně opláchnout ethanolem, a až poté ponořit do roztoku komplexu.[129]



**Obr. 11.** Předpokládaný způsob kovalentní imobilizace komplexu mědi pomocí kolagenu.



### 3. Kinetické metody chemické analýzy

Enzymy se velmi často používají jako biorozpoznávací prvky při vývoji elektrochemických biosenzorů. Díky jejich vysoké specifitě je jejich odezva ve velké míře dána rychlostí katalýzy (kinetikou) těchto enzymů. Existuje zde řada metod k měření kinetiky enzymů, například radiometrie [130], ultrafialová viditelná (UV-VIS) spektrofotometrie [131], manometrie [132], elektrochemické metody a elektrosprejová ionizace s hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí [133]. Za nejčastěji využívanou metodu v tomto odvětví lze považovat UV-VIS spektrofotometrii, díky její neinvazivitě, citlivosti, nízké ceně a možnosti nepřetržitého monitorování enzymatických reakcí [134].

Obecně mají TYR a komplexy imitující její aktivitu schopnost katalyzovat oxidaci fenolových substrátů, které mají hydroxylovou skupinu v *ortho* poloze [135]. Z toho vyplývá, že pro kinetiku těchto reakcí je nutná dostupnost hydroxylových skupin. Enzymatickou reakci lze popsat pomocí Michaelisovy konstanty ( $K_M$ ) jako koncentraci substrátu v polovině maximální míry dosažené systémem ( $V_{max}$ ) [136]. Neboť se vybraný komplex mědi imobilizoval na pracovní elektrodu, byly diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a amperometrie zvoleny jako vhodné elektrochemické metody pro sledování změny kinetiky vyvolané zakotvením pomocí polymeru. Níže jsou stručně popsány analytické metody použité v rámci experimentu.

#### 3.1. UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je účinná metoda pro kvantitativní analýzu sloučenin s vícenásobnou vazbou, jako je aromatická struktura [137]. K určení kinetických parametrů se standardně využívá UV-VIS spektrofotometrie, kde se měří v čase pokles absorpce substrátu či nárůst absorpce produktu [138,139]. Nejčastěji se experimentální měření provádí při vlnové délce odpovídající maximální absorbanci produktu. V případě katecholázové aktivity se bavíme o absorpci vzniklých *o*-chinonů. Měřeným parametrem je počáteční rychlost působení enzymu ( $V_0$ ) v čase ( $t$ ) na vybraný substrát. Pokud je produkt stabilní chemické individuem, je možné zjistit kalibrační závislost mezi absorbancí a koncentrací produktu, a tudíž lze přesně spočítat koncentraci vzniklého produktu v čase [131].

#### 3.2 Elektrochemické metody

V případě, že zvolíme správné experimentální podmínky, můžeme elektrické proudy ( $I$ ) spojené s elektrooxidací nebo elektroredukcí substrátu či vzniklého produktu měřit v čase ( $t$ ).

Z tohoto důvodu v kinetických měření enzymů dominuje amperometrie, kdy lze kontinuálně měřit změnu proudu v čase vyvolané elektrochemickou přeměnou za konstantního potenciálu ( $E$ ). Pokud máme k dispozici pouze neelektroaktivní substráty/produkty, lze studovat kinetiku pomocí oxidačních stavů použitého redoxní mediátoru [1-3].

V současné době existuje mnoho studií, kde využívali elektroanalytické techniky ke kvantifikaci substrátů/produktů pomocí tyrozinázy v roztoku nebo imobilizované na elektrodě. Také ke studii katecholázové aktivity tyrozinázy již byly elektrochemické metody využívány [51,140]. V porovnání se standardní UV-VIS spektrofotometrií ampérometrie poskytuje obdobné kinetické parametry [134].

Pro získání kinetických parametrů elektrochemicky zprostředkované enzymové reakce lze použít cyklickou voltametrii, tak i pulzní techniky [137,140], kdy v této diplomové práci byla vyzkoušena DPV. Zde je nutné uvést, že produkty oxidace katecholaminů podléhají následným reakcím za vzniku polymerů, které nelze přesně definovat. Z toho důvodu se nabízí měřit s časem úbytek substrátu, kde může DPV nalézt své uplatnění, protože jen minimální množství zbylého substrátu je oxidováno na elektrodě.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. Kovalentní zakotvení vybraných komplexů mědi pomocí polymerů

Experimentální část obsahuje seznam chemikálií, popis syntézy vybraného umělého enzymu (dvojjaderný komplex mědi), přípravu několika polymerů, přístrojové vybavení, vlastní imobilizaci a konečnou charakterizaci biorozpoznávací vrstvy. Použité monomery pro vytvoření polymerního filmu byly hlavně *o*-fenyldiamin (OPD), *p*-fenyldiamin (PPD), chitosan a kolagen, dále pak i 2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethanamin (PyEA) a anilin (AN). Jako vhodný komplex pro studium vlivu zakotvení na katecholázovou aktivitu byl vybrán dinukleární komplex mědi využívající ligand  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ , kdy atomy mědi byly koordinačně vázány čtyřmi atomy dusíku a dvěma acetáty (OAc). Syntéza tohoto komplexu je detailně popsána v samostatné kapitole 4.2.

#### 4.1. Chemikálie

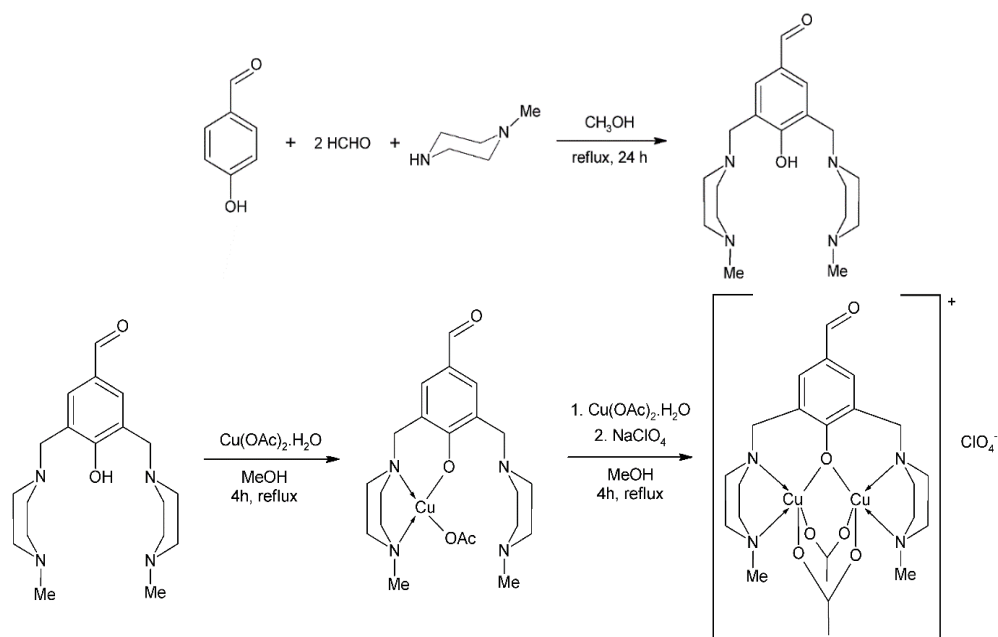
Chemikálie jako 98% 3,5-di-*terc*-butylkatechol (3,5-DTBC), 98% 3,5-di-*terc*-butyl-*o*-benzochinon (3,5-DTBQ), 98% dopamin hydrochlorid,  $\geq 95\%$  ( $\pm$ )-epinefrin hydrochlorid,  $\geq 97\%$  DL-norepinefrin hydrochlorid, 99,9% PyEA, 99,9% OPD, 99,9% PPD, bezvodý 99,9%  $\text{LiClO}_4$ , 25% glutaraldehyd (GTA), 1% chitosan, 1% kolagen (z hovězí achillovy šlachy) a anilin  $\geq 99,5\%$  byly zakoupeny od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Komplex  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  byl syntetizován na katedře obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice. Síran draselný a organická rozpouštědla jako acetonitril (MeCN) pro HPLC  $\geq 99,9\%$  a methanol (MeOH) pro HPLC  $\geq 99,9\%$  byly zakoupeny u firmy Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká Republika). Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát a dihydrogenfosforečnan sodný monohdrát potřebné pro přípravu  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku fosfátového pufru (PB) o pH 7 byly získány od firmy PENTA s.r.o. (Praha, Česká republika). Deionizovaná voda s vodivostí nižší než  $11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  byla připravena za použití purifikačního systému Milli-Q<sup>®</sup> od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo).

#### 4.2. Syntéza $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ komplexu

Dvojjaderný komplex mědi(II)  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  byl syntetizován následovně. Roztok 20 ml ligandu HL (1,00 g, 2,88 mmol) byl přidán k míchanému roztoku  $\text{Cu}(\text{OAc})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  (1,15 g, 5,76 mmol) v 20 ml methanolu při laboratorní teplotě. Reakční směs se zahřívala 7 hodin se zpětným tokem. Poté byl přidán jeden ekvivalent  $\text{NaClO}_4$  (0,35 g, 2,88 mol) v 10 ml

methanolu a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem další hodinu. Výsledný roztok se odpařil a vznikl tmavě zelený zbytek, který se rekrystalizoval z acetonitrilu, čímž byl získán tmavě zelený krystalický komplex. Výtěžek: 1,28 g (64%). Analytický výpočet pro  $C_{23}H_{37}N_4O_{10}ClCu_2$ : C, 39,9; H, 5,4. Nalezeno: C, 39,2; H, 5,2.

Ligand 2,6-bis(4-methylpiperazin-1-yl-methyl)-4-formylfenol (L) pro tento komplex  $[Cu_2(L)(OAc)_2]ClO_4$  byl syntetizován standardní Mannichovou reakcí, kde zpracuje 4-hydroxybenzaldehyd s *N*-methylpiperazinem a paraformaldehydem a vznikne 2,6-bis(4-*N*-methylpiperazin-1-yl-methyl)-4-formylfenol (L), jak je uvedeno v Obr. 12. Ligand (L) byl syntetizován podle protokolu uváděného Narayananem [141], kde se rozpustí 4-hydroxybenzaldehyd (3,05 g, 25 mmol) a paraformaldehyd (1,58 g, 50 mmol) v 100 ml methanolu a poté se zahřívají k refluxu po dobu 1 hodiny. Dále se přidá *N*-methylpiperazin (5,54 mL, 50 mmol) a výsledná reakční směs se zahřívá k refluxu po dobu 24 hodin. Poté se všechny těkavé látky odstraní pomocí snížení tlaku a zbytek se extrahuje 50 ml chloroformem. Odpařením chloroformu se získá ligand ve formě bílého práškového materiálu. Výtěžek: 7,5 g (86%). Všechny analytické údaje odpovídají údajům uvedeným v literatuře [85].



**Obr. 12.** Syntéza ligandu 2,6-bis(4-methylpiperazine-1-yl-methyl)-4-formylphenol a  $[Cu_2(L)(OAc)_2]ClO_4$  komplexu [139].

### 4.3. Příprava polymerů

Prvním typem byla elektropolymerace, kde byly vybrány anilin, OPD, PPD a PyEA. Veškeré postupy se řídily z dohledaných informací v odborné literatuře

[97,119,120,123,129,142-147] a elektropolymerace byla vždy prováděna pomocí cyklické voltametrie (CV). Protože komplex byl v ethanolickém roztoku a polymer vytvořený z vodného prostředí by se rozpouštěl, bylo pro elektropolymeraci zvoleno nevodné rozpouštědlo

Anilin byl připraven jako  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl a polymerace byla prováděna na vodivém optoelektronickém materiálu (oxid indium a cín, ITO) při potenciálovém rozsahu od  $-0,4 \text{ V}$  do  $+1,4 \text{ V}$ . Polymerace anilinu byla zvolena hlavně pro vyzkoušení metody a pro možné využití při tvorbě kopolymeru, protože jako samotný se nedá využít k imobilizaci komplexu z důvodu absence volné  $-\text{NH}_2$  skupiny pro navázání komplexu.

Tvorba OPD byla testována z vodného i nevodného prostředí. Byl použit  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD v prostředí  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  při potenciálovém rozsahu od  $0 \text{ V}$  do  $+1 \text{ V}$  a  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD v prostředí MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při potenciálovém rozsahu od  $-0,4 \text{ V}$  do  $+0,8 \text{ V}$ . Tato polymerace byla testována jak na ITO, tak na GCE a uhlíkové tištěné elektrodě (SPE), které byly dále použity k imobilizaci komplexu. Pomocí obou způsobů bylo dosaženo úspěšného vytvoření filmu polymeru na povrchu elektrod, ale polymer z vodného prostředí pro naše účely není dále použitelný. Důvodem je rozpustnost vzniklého polymeru v nevodném prostředí.

Dále byl polymerován PPD z  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku v prostředí MeOH s příměsí  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  na platinové elektrodě (PtE) a GCE při totožném potenciálovém rozsahu od  $-0,4 \text{ V}$  do  $+1,0 \text{ V}$ . Dále byla snaha vytvořit kopolymer z PPD a AN v poměrech 1:1 ( $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD:  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  AN) a 2:1 ( $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD:  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  AN) při potenciálovém rozsahu od  $-0,4 \text{ V}$  do  $+1,4 \text{ V}$ .

Jako poslední polymer byl zvolen  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PyEA, který byl polymerován z ACN s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při potenciálovém rozsahu od  $-2,0 \text{ V}$  do  $+1,8 \text{ V}$  a od  $0 \text{ V}$  do  $+2,0 \text{ V}$ . Tato polymerace byla prováděna na GCE, PtE a AuE.

Aby bylo dosaženo optimální polymerace byly zkoušeny různé typy polymerů, koncentrace a způsoby polymerace, protože polymer se během elektropolymerace může zacyklit, přecházet na jiné formy a volné  $-\text{NH}_2$  skupiny nemusí zůstat přístupné pro navázání komplexu. Také různé typy elektrod byly testovány, a to z důvodu, že z některých povrchů se může vzniklý polymer vymývat. To znamená, že polymer nemusí být optimálně adhezován.

Dalším způsobem přípravy polymerů použitým v mé diplomové práci byl drop-casting, kdy se postupně kapou na povrch elektrody chemikálie a nechají se spolu reagovat za vzniku polymerní vrstvy. V tomto případě byl použit chitosan a kolagen. Vždy byl nejdříve na povrch elektrody nakapán GTA  $5 \mu\text{l}$ , následně  $20 \mu\text{l}$  chitosanu/kolagenu o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , znovu GTA  $3 \mu\text{l}$ , opět chitosan/kolagen  $10 \mu\text{l}$  a nakonec opakovaně  $10 \mu\text{l}$  destilované vody,

aby nedošlo k vysušení reakční směsi po dobu dvou hodin a mohly spolu všechny složky zreagovat. Mezi veškerými kroky se vždy čekalo, až vrstva částečně zaschne, než se přidávala další. Takto deponované elektrody se následně ponořily do roztoku  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu v čistém ethanolu a ponechaly se v něm v řádu několika hodin až dnů, aby mohla vzniknout Schiffova báze mezi aldehydickou skupinou ligandu ( $\text{Ar}-\text{CH}=\text{O}$ ) a primární  $-\text{NH}_2$  skupinou polymeru.

#### 4.4. Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla prováděna v typickém tříelektrodovém uspořádání. Při měření v nevodném prostředí byla jako referenční elektroda použita nasycená kalomelová elektroda (SCE) se solným můstkem mající stejné prostředí jako elektrolyt. V případě měření ve vodném prostředí byla použita  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ . Pracovní elektroda byla zvolená podle druhu měření. Elektrochemická polymerizace byla prováděna na GCE, PtE a zlaté diskové elektrodě (AuE) o průměru 3 mm. Imobilizace pomocí chitosanu a kolagenu byla prováděna na komerčních SPE typu C-110 (uhlík) a DS-550 (platina) o průměru pracovní plochy 4 mm. Ve všech měřeních byla pomocná elektroda platinový drát. Všechny tyto elektrody byly zakoupeny od společnosti Metrohm (Praha, Česká republika) a byly připojeny k potenciostatu/galvanostatu AUTOLAB PGSTAT101 společnosti Metrohm (Praha, Česká republika), který byl provozován prostřednictvím softwaru MetroAm NOVA 1.11.

#### 4.5. Elektroanalytické metody

Jako první byl proměřen samotný elektrolyt používaný ve většině měření, a to  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$  v MeOH. Dále byl již proměřován samotný  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplex od  $-0,4 \text{ V}$  do  $+1,0 \text{ V}$ , vše pomocí cyklické voltametrie (CV). Dále bylo proměřeno elektrochemické chování  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  neurotransmiterů (adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu) a pro porovnání výsledků byla také uskutečněna CV  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliný kávové v potenciálovém rozsahu od  $-0,5 \text{ V}$  do  $+0,5 \text{ V}$  v PB pufru o pH 7.

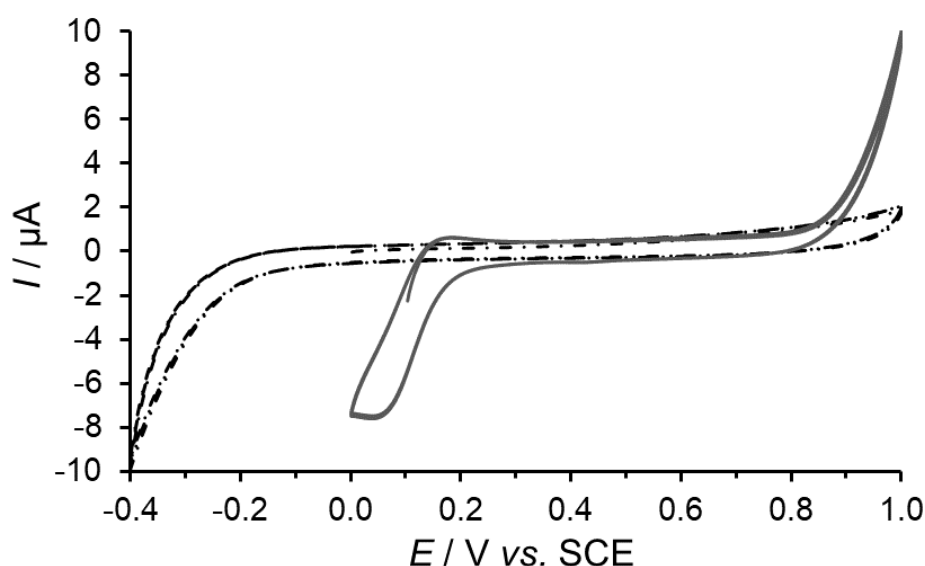
Také byla provedena optimalizace amperometrické detekce 3,5-DTBQ (produkt) vzniklého katalytickou oxidací 3,5-DTBC (substrát). Za tím účelem se musel proměřit  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok 3,5-DTBQ a 3,5-DTBC od  $-0,4\text{V}$  do  $+1,0 \text{ V}$ . Následně se provedlo amperometrické měření v sádkovém uspořádání, kdy se použilo 10 přídavek  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5-DTBQ do 10 ml pracovního media při různých potenciálech detekce, a to za konstantního míchání 400 rpm a při 0 V,  $-0,1\text{V}$ ,  $-0,2 \text{ V}$ ,  $-0,25 \text{ V}$  a  $-0,3\text{V}$ .

V poslední části experimentu byla DPV vyzkoušena jako možný alternativní způsob jak zjistit katalytickou aktivitu  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu vůči vybraným katecholaminům (úbytek substrátu), jejichž oxidační produkty podléhají polymeračním reakcím. Nejprve se proměřil samotný substrát o koncentraci  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a v dalším kroku  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5-DTBC s přítomností  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu při potenciálovém rozsahu od 0 V do +0,9 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě modulace 0,05 V, kdy rozdíl mezi pulzy byl 20 s. Obdobným způsobem byly pomocí DPV proměřeny i výše zmíněné neurotransmitery, kdy se pouze rozšířil potenciálový rozsah do 1,0 V.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Elektrochemické chování komplexu

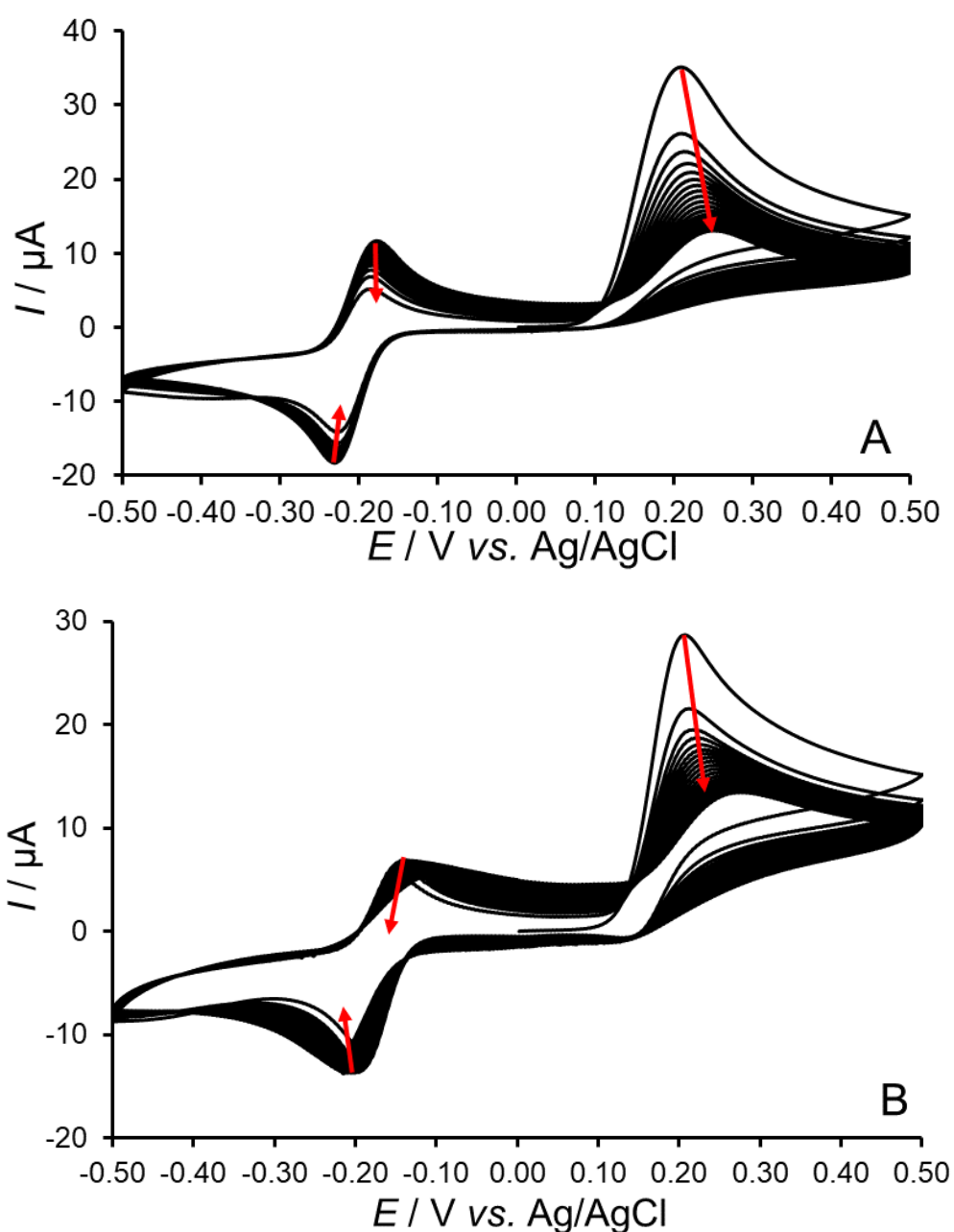
Nejprve bylo důležité zjistit elektrochemické chování dvoujaderného  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu pomocí CV (viz. Obr. 13). Kdy pro  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok komplexu byl zjištěn charakteristický redox pár mající vrcholy při +0,168 V a +0,051 V ( $\Delta E_p = 0,117 \text{ V}$ ), což by mohlo odpovídat přechodu Cu(I) na Cu(II). Pokud se pro imobilizovaný komplex objeví tento podobný redox pár, lze předpokládat, že se komplex kovalentně navázal. Z výšky redox píků lze poté usuzovat o množství navázaného komplexu.



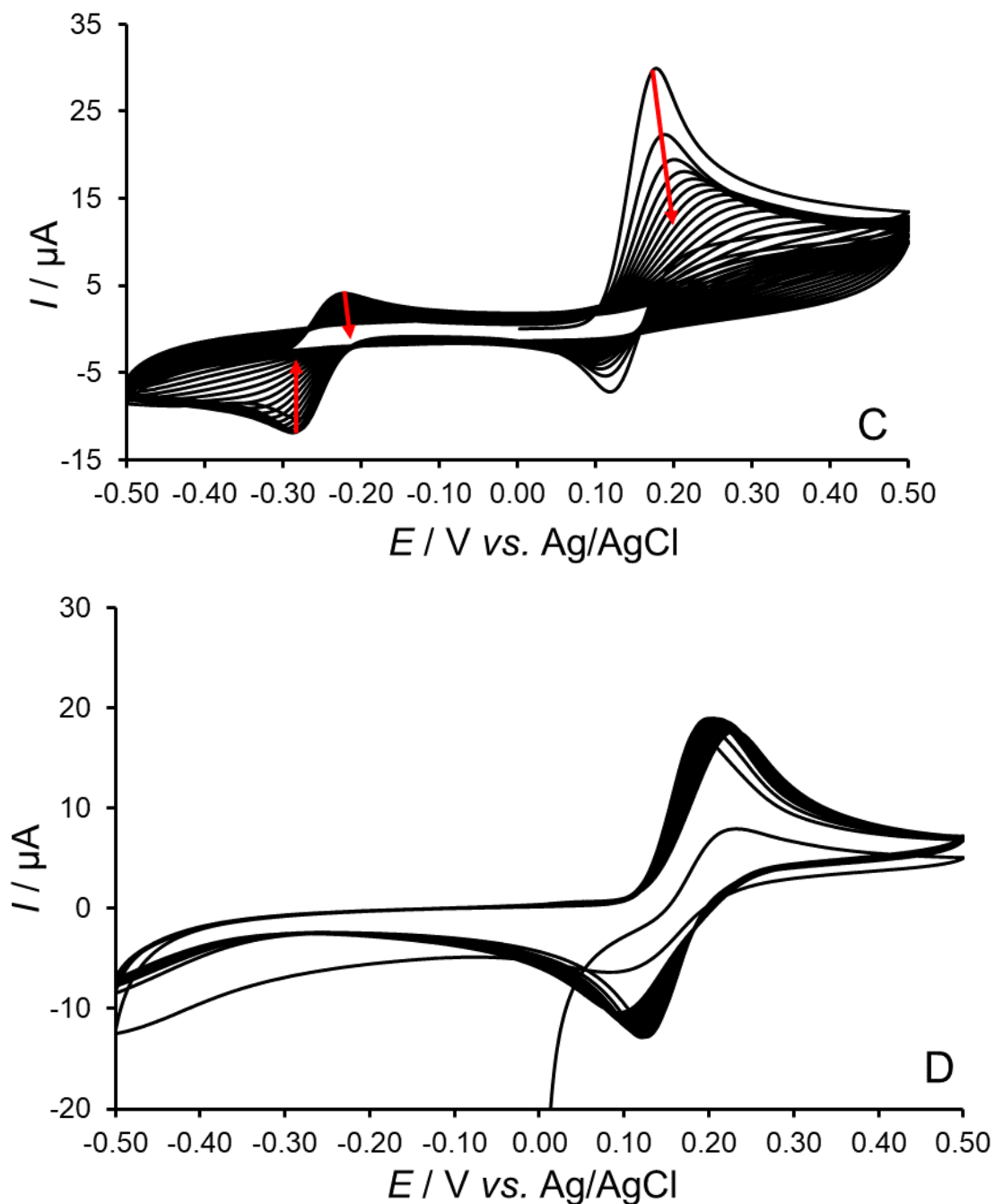
**Obr. 13.** Cyklické voltamogramy  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v MeOH (přerušovaná čára) a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu (plná čára) na GCE při rychlosti skenování  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku 2,5 mV.

## 5.2. Elektrochemické chování neurotransmiterů

Jako další v řadě bylo důležité zjistit elektrochemické chování vybraných neurotransmiterů, jmenovitě dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu. Pro tyto látky je typické, že mají ve své struktuře katecholický kruh (dvě hydroxy skupiny na benzenovém jádře) a alifatický řetězec s primární (dopamin a noradrenalin) a sekundární (adrenalin)  $-NH_2$  skupinou. Z tohoto důvodu jsou tyto hormony známé jako katecholaminy. Aby mohl být odhalen vliv přítomnosti aminoskupiny, byla kyselina kávová vybrána jako vhodný kandidát, neboť taktéž obsahuje katecholický kruh ve své molekulové struktuře. Elektrochemické chování těchto substrátů bylo měřeno pomocí CV (viz. Obr. 14).



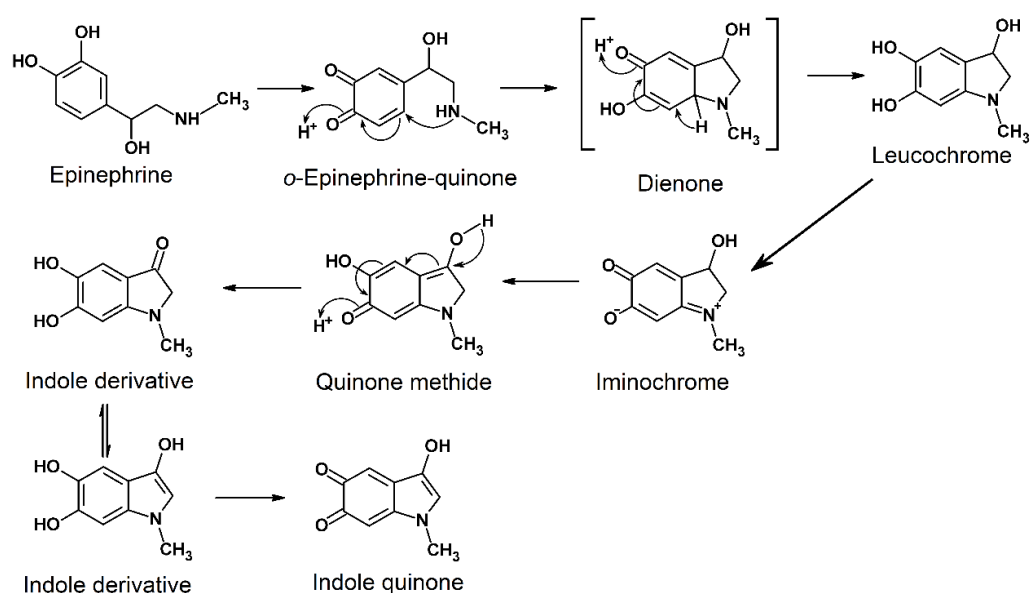




**Obr. 14.** Cyklické voltamogramy  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  adrenalinu (A), noradrenalinu (B), dopaminu (C) a kyseliny kávové (D) na GCE v  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PB (pH 7) při rychlosti skenování  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .

U všech neurotransmiterů pozorujeme oxidační pík již při prvním skenu a následný redoxní pár v druhém cyklu. Oxidační pík adrenalinu má vrchol při  $+0,212 \text{ V}$  a redox pár při  $-0,171 \text{ V}$  a  $-0,232 \text{ V}$  ( $\Delta E_p = -0,061 \text{ V}$ ), oxidační pík noradrenalinu  $+0,215$  a jeho redox pár s vrcholy při  $-0,176 \text{ V}$  a  $-0,215 \text{ V}$  ( $\Delta E_p = -0,039 \text{ V}$ ) a oxidační pík dopaminu  $+0,180 \text{ V}$  s vrcholy

redox páru při  $-0,219$  V a  $-0,288$  V ( $\Delta E_p = -0,069$  V). V dalších skenech již pozorujeme pouze pokles všech píků. Na základě tohoto zjištění lze přisuzovat, že redox pár odpovídá elektrochemickým reakcím vzniklého oxidačního produktu v prvním kroku, tzv. ECE mechanismus. Z dostupné literatury vyplývá, že tyto katecholaminy podléhají polymeračním reakcím za vzniku odpovídajícího analogu melaninu, jak je znázorněno na Obr. 15. Na rozdíl kyselina káвовá přechází pouze z katecholu na chinon, jenž postrádá nukleoflní amino skupinu, proto pozorujeme pouze redox pár při vrcholech  $+0,215$  V a  $+0,122$  V ( $\Delta E_p = -0,093$  V), který již výrazněji neklesá.



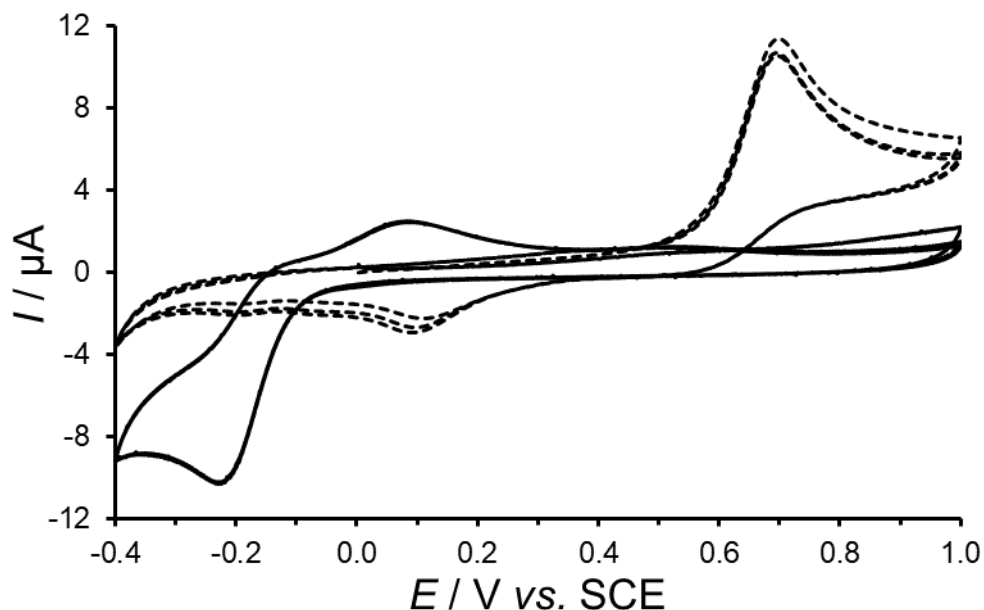
**Obr. 15.** Reakční schéma přeměny adrenalinu téměř až na deriváty indolu [148].

### 5.3. Optimalizace amperometrické detekce 3,5-DTBQ

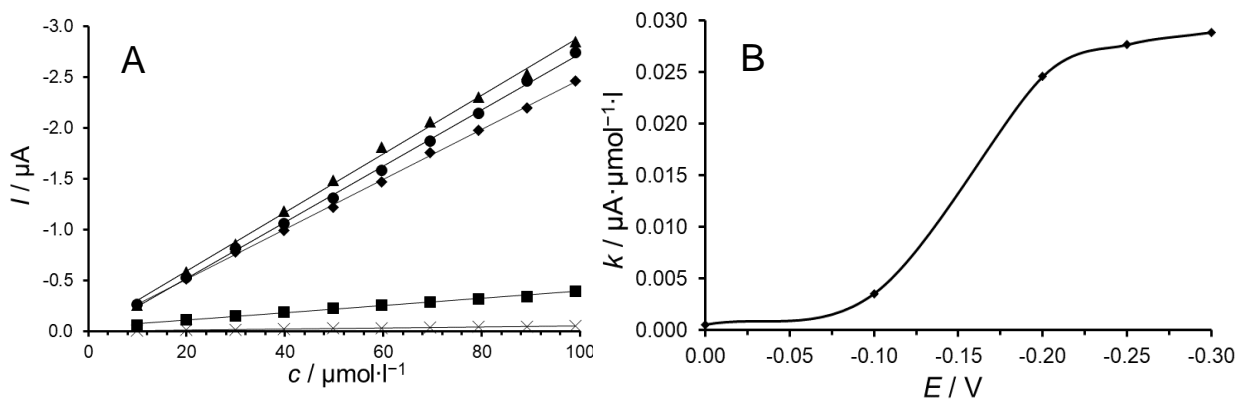
Protože cílem této práce bylo měření kinetiky kovaletně imobilizovaného dvoujaderného komplexu mědi na polymerních filmech vůči substrátu 3,5-DTBQ, obsahuje experimentální část i data týkající se optimalizace 3,5-DTBQ.

Komplex  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  katalyzuje oxidaci 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ za přítomnosti vzdušného kyslíku. Optimalizace byla prováděna pro správnou volbu potenciálu redukce vzniklého chinonu, kde na CV (viz. Obr. 16) pozorujeme redukční pík při  $-0,22$  V a podle toho bylo zvoleno rozmezí potenciálů amperometrické detekce. Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační přímky (viz. Obr. 17), kde po proložení přímek lineární regresí byly zjištěny hodnoty citlivostí ( $k$ )  $-0,0005$ ,  $-0,0035$ ,  $-0,0246$ ,  $-0,0277$  a  $-0,0289$   $\mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro  $0$ ,  $-0,1$ ,  $-0,2$ ,  $-0,25$  a  $-0,3$  V, kdy hodnota spolehlivosti  $R^2$  nebyla větší než  $0,9925$ . Na základě

použitých hodnot potenciálů a směrnic z kalibračních přímků byl sestaven graf, ze kterého můžeme vyčíst optimální hodnotu potenciálu  $-0,25$  V pro 3,5-DTBQ (viz. Obr. 17).



**Obr. 16.** Cyklické voltamogramy  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5 DTBQ (plná čára) a 3,5-DTBC (přerušovaná čára) v MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  LiClO<sub>4</sub> na GCE při rychlosti skenování  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .



**Obr. 17.** Kalibrační křivky standardních přídavek 3,5-DTBQ (A) a vliv nastaveného potenciálu na citlivost amperometrické detekce (B).

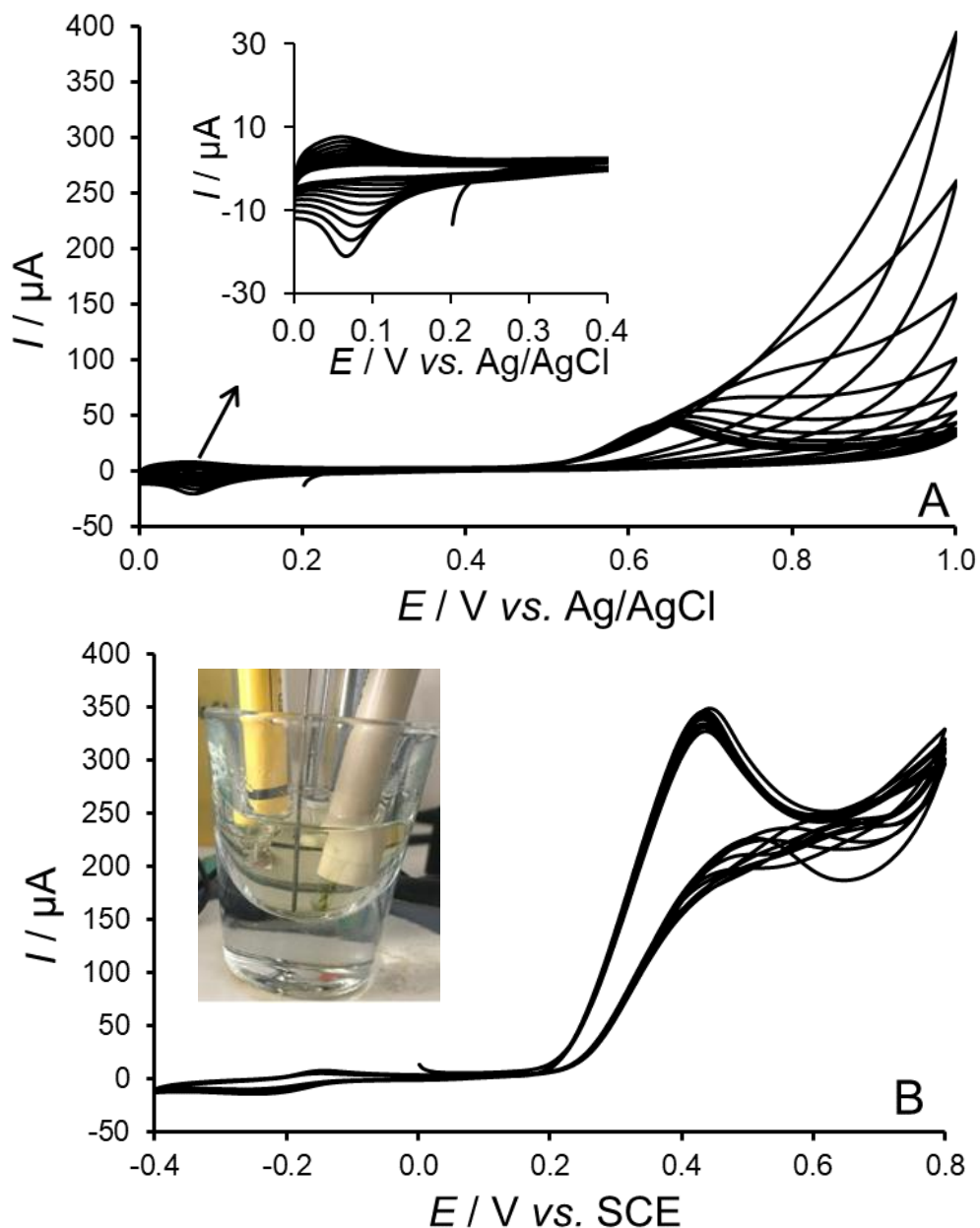
## 5.4. Elektrochemická depozice a charakterizace polymerů

### 5.4.1. *O*-polyfenylendiamin

Jako první polymer, který byl v rámci této diplomové práce elektrochemicky deponován na povrch ITO a GCE, je *o*-polyfenylendiamin, kde na CV (viz. Obr. 18) vidíme dva redox procesy při potenciálech  $+0,058$  V a  $+0,071$  V. Polymer se na elektrodě tvořil téměř okamžitě

a dobře na jejím povrchu držel, zatímco se roztok barvil do zelena. Z grafů také lze vyčíst, že volba elektrolytu a počáteční koncentrace monomeru má významný vliv na průběh polymerace. Vidíme zde málo výrazný pokles signálu naznačující, že se polymer tvoří ve velmi tenké vrstvě.

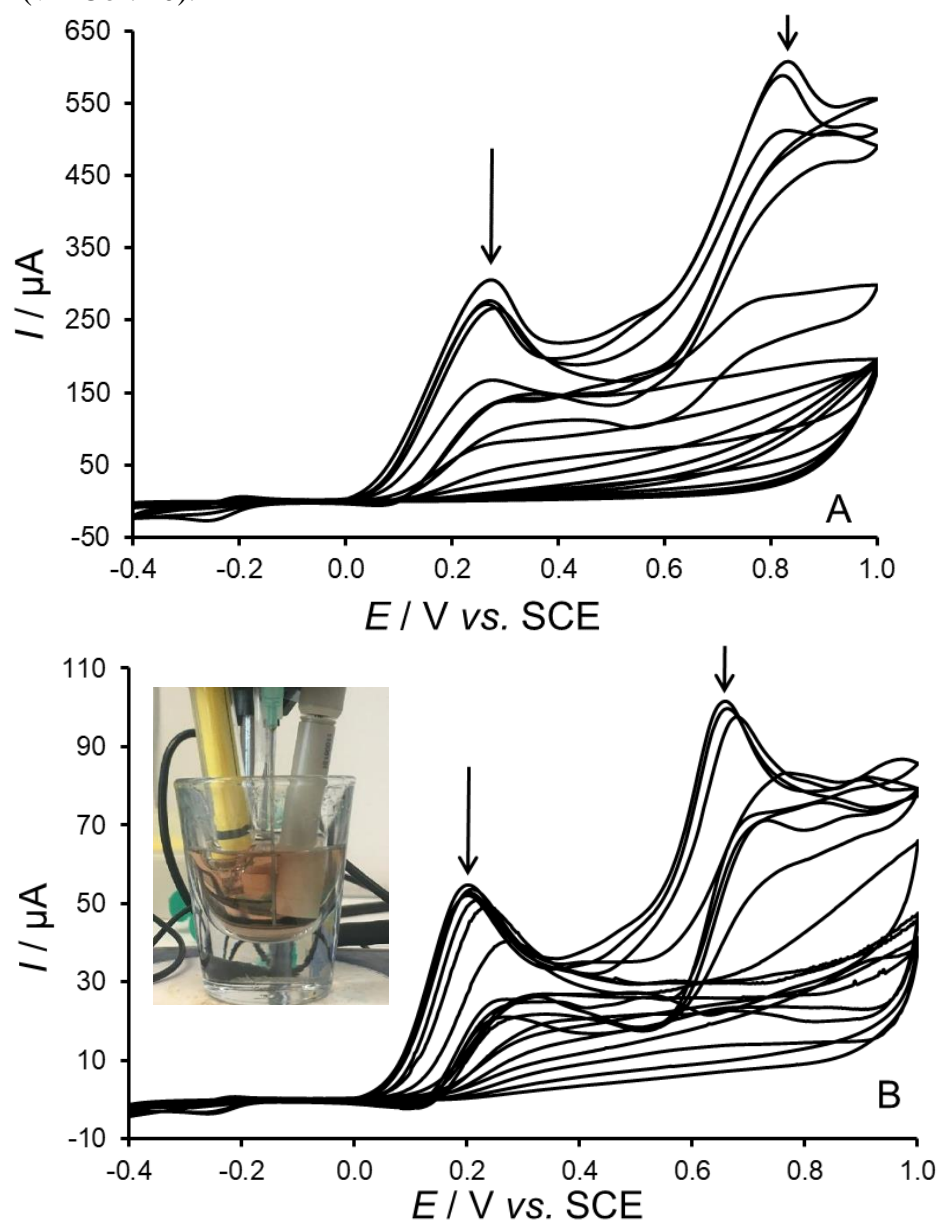
Nicméně komplex se nepodařilo na vrstvu polymeru zachytit pomocí tvorby Schiffovy báze. Důvodem může být nízká koncentrace  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu vůči citlivosti elektrochemických metod a nebo možné zacyklení polymeru během elektropolymerace s tím, že nezůstaly volně přístupné  $-\text{NH}_2$  skupiny pro navázání komplexu.



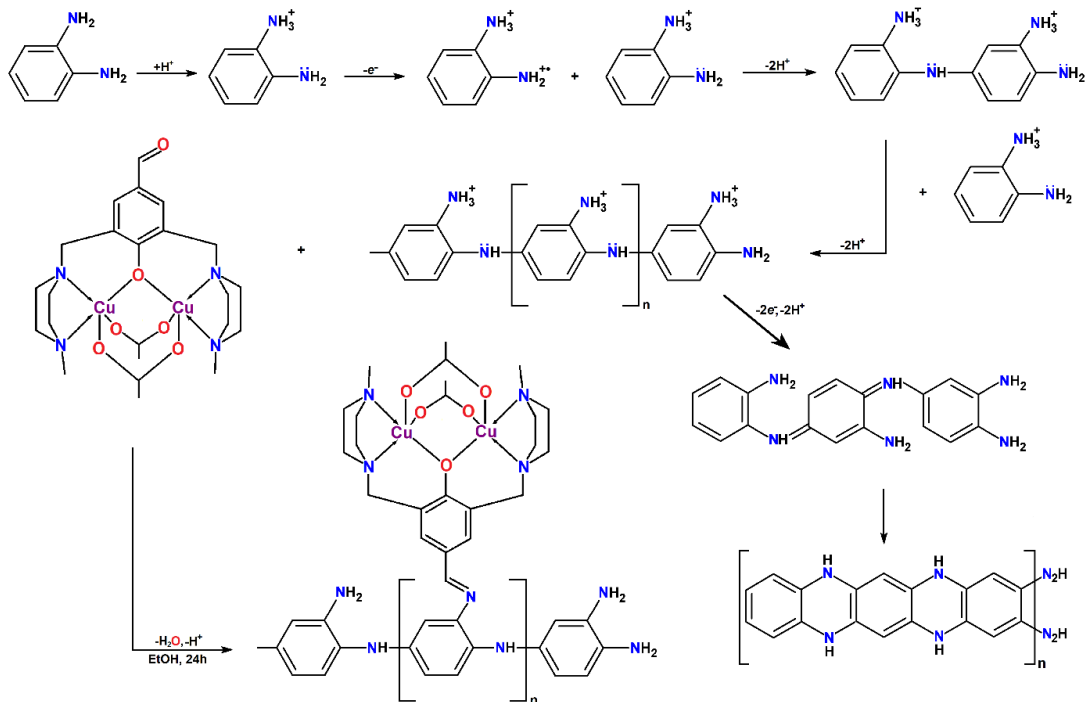
**Obr. 18.** Cyklické voltamogramy elektropolymerace  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD v elektrolytu  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{SO}_4$  na ITO (A),  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  OPD v MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  na GCE (B) při rychlosti skenování  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .

### 5.4.2. *P*-polyfenylendiamin

Jak je patrné z Obr. 19 při CV *p*-polyfenylendiaminu na PtE tak i na GCE byly pozorovány dva výrazné redox páry při +0,283 a +0,083 ( $\Delta E_p = 0,2$  V) a při +0,833 a +0,520 ( $\Delta E_p = 0,313$  V). Při opakovaných cyklech na stejném povrchu docházelo k poklesu jejich proudových odezev a celkovému zploštění všech píků. Tento monomer také velmi ochotně polymeroval a roztok se zde zbarvil do oranžova. Ani v tomto případě se nepodařilo do struktury polymeru komplex významně zachytit, a to pravděpodobně ze stejného důvodu jako v případě OPD (viz Obr. 20).



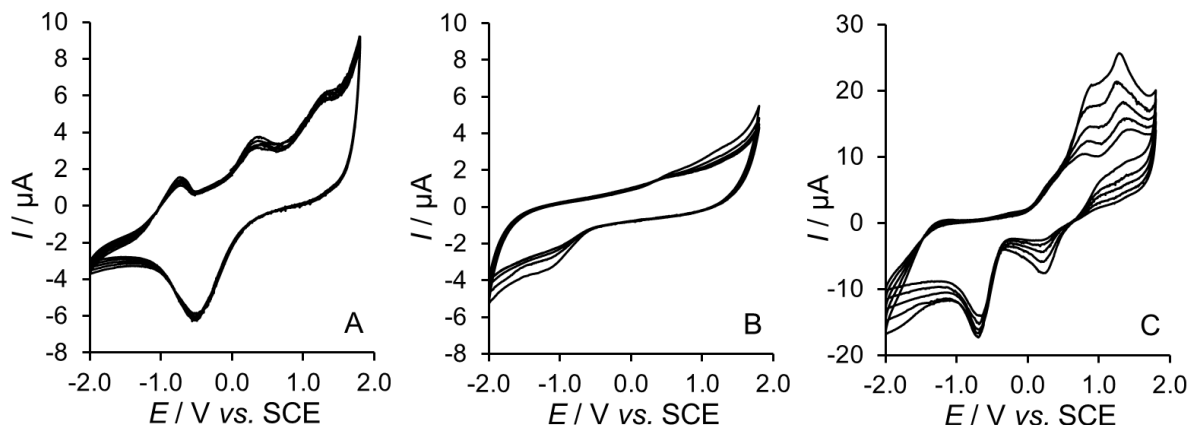
**Obr. 19.** Cyklické voltamogramy elektropolymerace (A)  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD na PtE; (B)  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD na GCE, v MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlosti skenování  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku 2,5 mV.



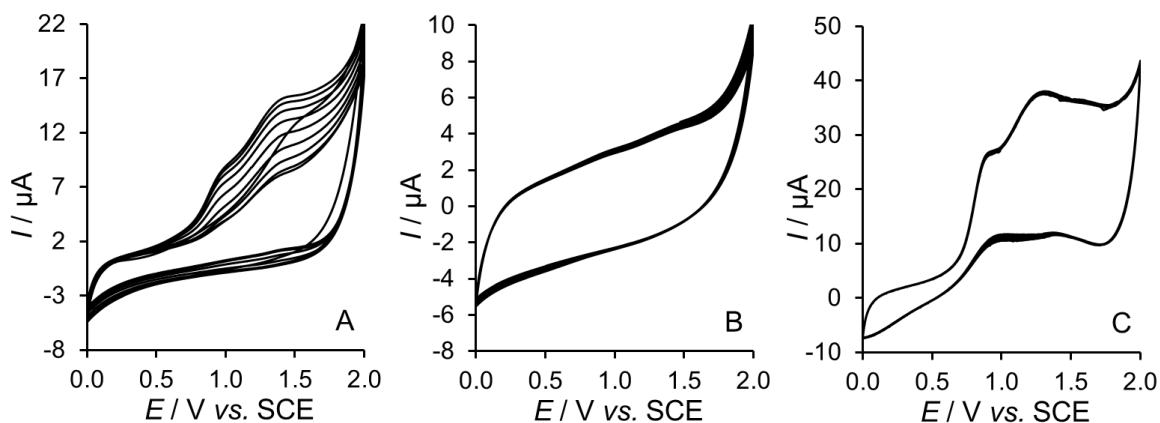
**Obr. 20.** Předpoklad zacyklení a důvod nenavázání  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu.

### 5.4.3. Poly-2-(1H-pyrrol-yl)ethanamin

Jako další monomer použitý při elektropolymeraci byl vybrán 2-(1H-pyrrol-yl)ethanamin. Při této depozici bylo zjištěno, že lepší vrstva polymeru vzniká při užším potenciálovém rozsahu. Důvodem bude, že při potenciálovém okně od  $-2$  V do  $+1,8$  V probíhá oxidace a redukce pyrrolu (viz. Obr. 21), na rozdíl při zúžení od  $0$  V do  $+2$  V probíhá reakce pouze již jedním směrem (viz. Obr. 22), tudíž se polymer tolik nezacykluje.



**Obr. 21.** Cyklické voltamogramy elektropolymerace  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PyEA na PtE (A), GCE (B) a AuE (C) v elektrolytu ACN s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlosti skenování  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (A,B) a  $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (C) a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .



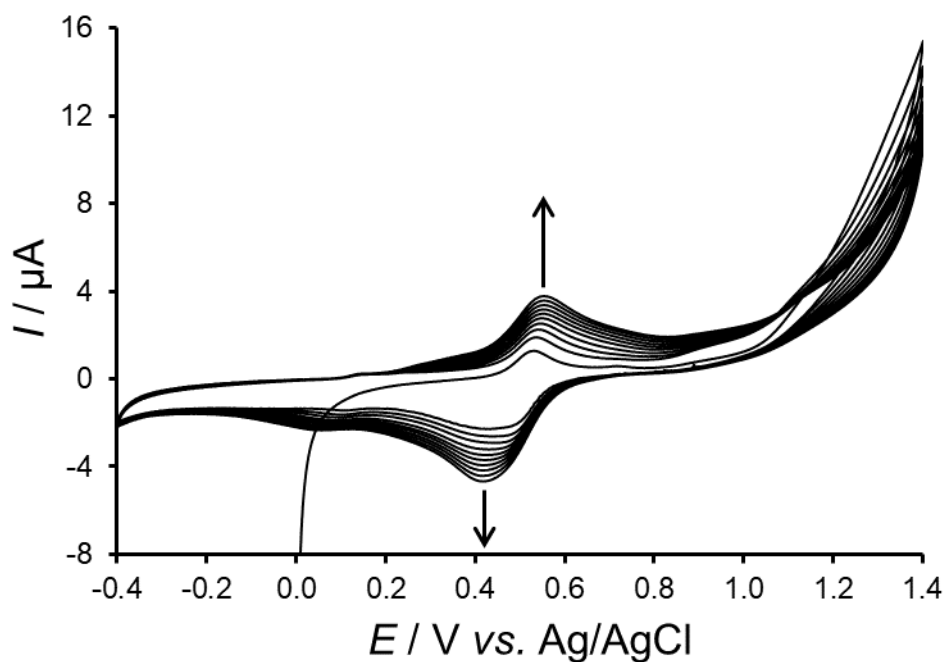
**Obr.22.** Cyklické voltamogramy elektropolymerace  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PyEA na PtE (A), GCE (B) a AuE (C) v elektrolytu ACN s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlosti skenování  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .

Také bylo zjištěno, že při navýšení rychlosti skenování vzniká lepší vrstva polymeru. Při tomto měření byl kromě rychlosti skenování navýšen i počet cyklů, aby na povrchu elektrody vznikla dostatečně silná a kompaktní vrstva polymeru. I přes to se komplex na polymer nezachytil a nebo se pomocí elektrochemického měření nepodařil prokázat. Kromě CV byla na důkaz mědi použita i DPV, která je citlivější, ale ani tak přítomnost mědi pozorována nebyla.

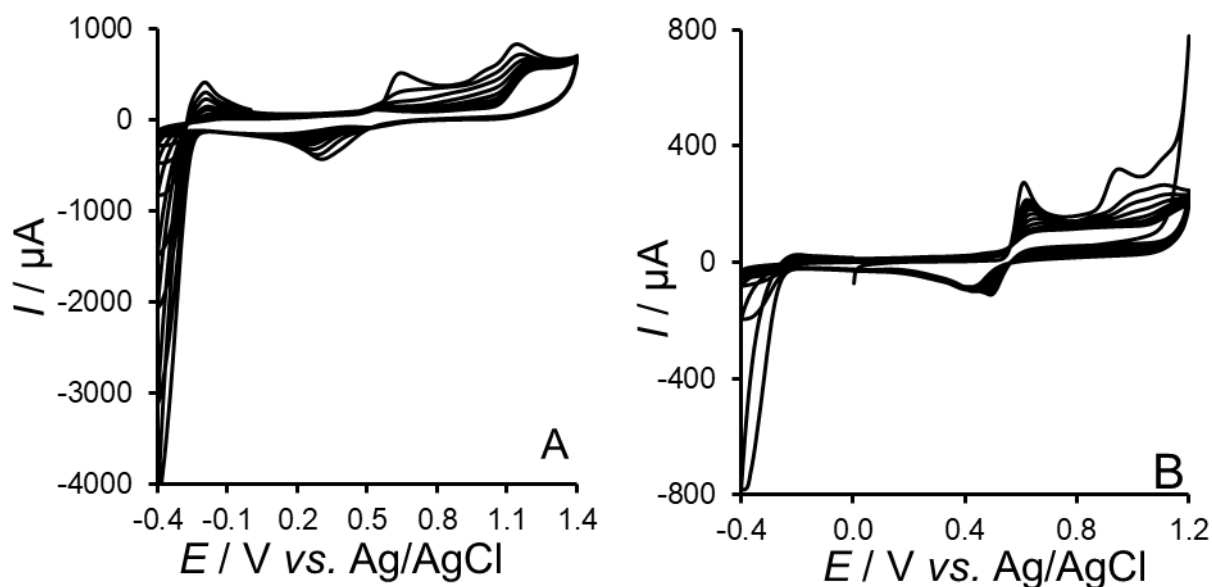
#### 5.4.4. Kopolymer z *p*-fenylendiaminu a polyanilinu

Protože se nepodařilo u předchozích případů docílit navázání  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu, byla zvolena možnost vytvoření kopolymeru. Zde byl vybrán anilin a *p*-polyfenylendiamin, protože polymerace anilinu je velmi dobře popsána a zde se nabízí možnost vzájemné kopolymerace. Tudíž bylo předpokládáno, že by se anilin vmezeřil do struktury *p*-polyfenylendiaminu a zabránil tak jeho zacyklení. Nicméně tento předpoklad nebyl experimentálně potvrzen. U samotného anilinu pozorujeme růst redox signálu při  $+0,564 \text{ V}$  a  $+0,422 \text{ V}$  ( $\Delta E_p = 0,142 \text{ V}$ ) (viz. Obr. 23), což naznačuje na izolaci povrchu elektrody vzniklým zeleným polymerem, který byl i mechnaicky stabilní.

Jak je na první pohled zjevné z porovnání opakujících se CV na Obr. 24 vzájemný poměr monomerů významně ovlivňuje jejich tvary. Na rozdíl od samotného AN, při polymeraci kopolymeru byl zjištěn pokles redox signálů. Dále nebyla pozorována žádná změna na povrchu použité tiskované platinové elektrody, proto lze usuzovat, že se kopolymer netvořil, tak jak bylo očekáváno.



**Obr. 23.** Cyklický voltamogram elektropolymerace  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  AN v  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl na ITO při rychlosti skenování  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$ .



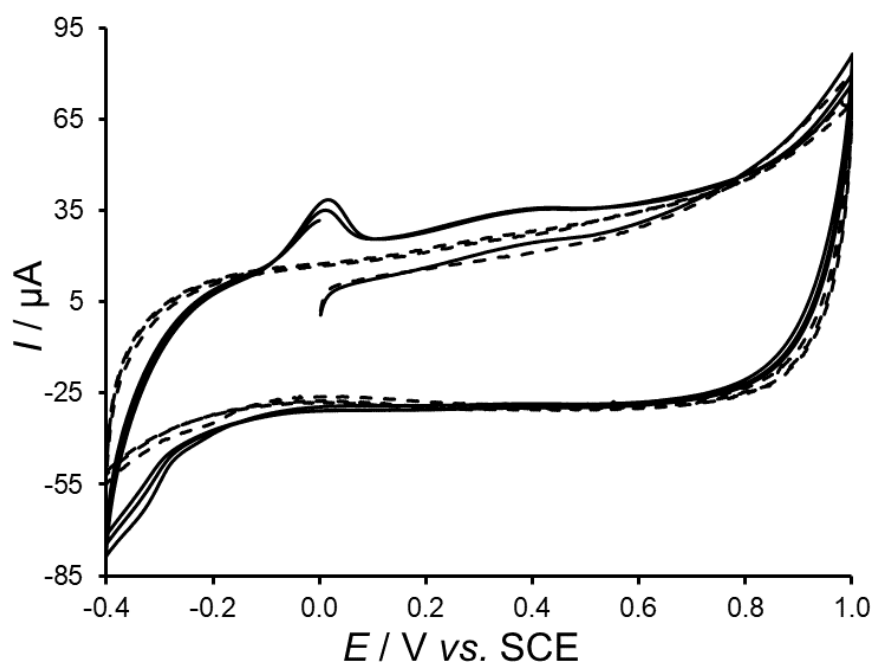
**Obr. 24.** Cyklické voltamogramy elektropolymerace kopolymeru z  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD a  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  AN při rychlosti skenování  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (A) a z  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  PPD a  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  AN při rychlosti skenování  $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (B) obojí v  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl a potenciálovém kroku  $2,5 \text{ mV}$  obdržené na na SPCE (typ DS-550).



## 5.5. Depozice pomocí drop-castingu a charakterizace polymerů

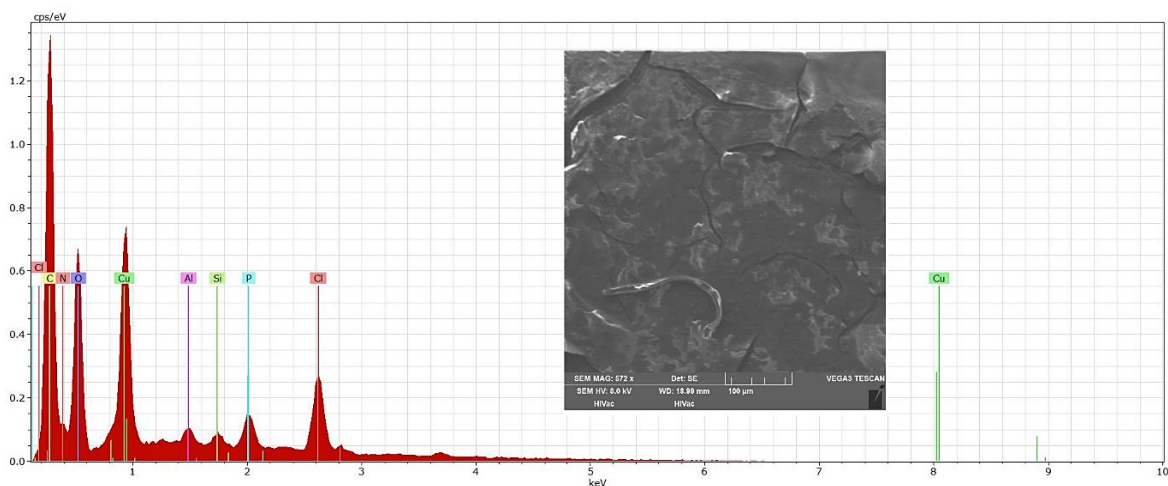
### 5.5.1. Chitosan

Protože se u polymerů vytvořených elektropolymerací nepodařilo komplex navázat, byl jako další způsob depozice zvolen mnohem jednodušší drop-casting, spočívající v nakapnutí roztoku polymeru na povrch pracovní elektrody a odpařením použitého rozpouštědla, kdy se mohou jednotlivé řetězce polymeru spojit pomocí zesít'ovadel. Chitosanový film vykazoval popraskání, zřejmě z důvodu silné tloušťky vrstvy. Nicméně, i tak došlo k navázání  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu pomocí tvorby Schiffovy báze, což se dokázalo přítomností mědi a zeleným zbarvením polymerního filmu. Na Obr. 25 je vidět typický signál anodické oxidace naredukované Cu(I) s vrcholem při +0,022 V a -0,359 V ( $\Delta E_p = 0,381$  V).



**Obr. 25.** Cyklické voltamogramy v MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  na SPCE (typ C 110) pokryté vrstvou chitosanu (přerušovaná) a SPCE pokryté vrstvou chitosanu s kovalentně navázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem (plná čára) při rychlosti skenování  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku 2,5 mV.

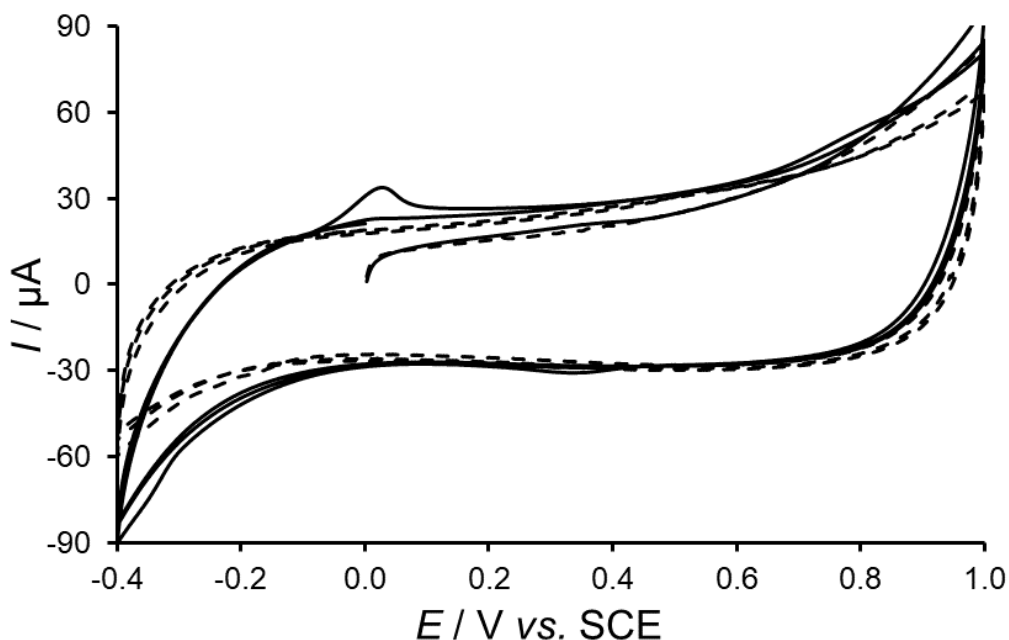
Samotná polymerní vrstva chitosanu zesítěna GTA a s kovalentně vázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem byla charakterizována pomocí SEM a EDX spektroskopie (viz. Obr. 26). Ze SEM je zřejmé, že až na drobné trhliny chitosan tvoří kompaktní hladký film. Z EDX spektroskopie byl zpočten normovaný obsah mědi na 22%. Z této hodnoty lze usuzovat, že film byl z hruba jednou pětinou pokryt  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem.



**Obr. 26.** EDX spektrum a SEM snímek (vložený) tištěné SCE (typ C 110) pokryté vrstvou chitosanu zesítěného GTA a s kovalentně navázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem.

### 5.5.2. Kolagen

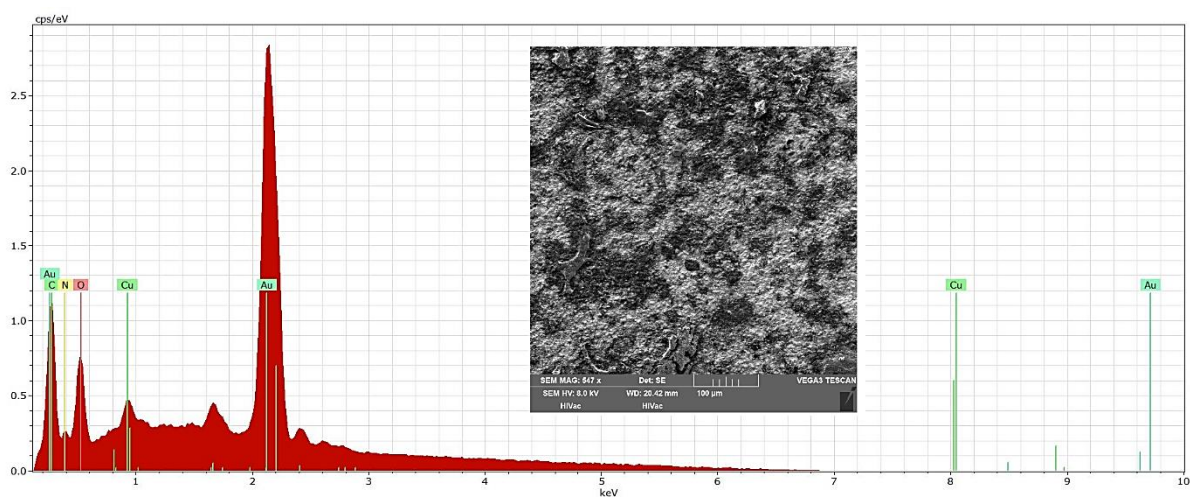
Film kolagenu oproti chitosanu na elektrodě velmi dobře držel a nepraskal. I v tomto případě se  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplex kovalentně navázal a důkaz vidíme na obdrženém CV, kde je pozorován pík anodické oxidace naredukované Cu(I) s vrcholem při +0,034 V a katodické redukce Cu(II) při -0,369 ( $\Delta E_p = 0,403$  V), jak je zobrazeno na Obr. 27.



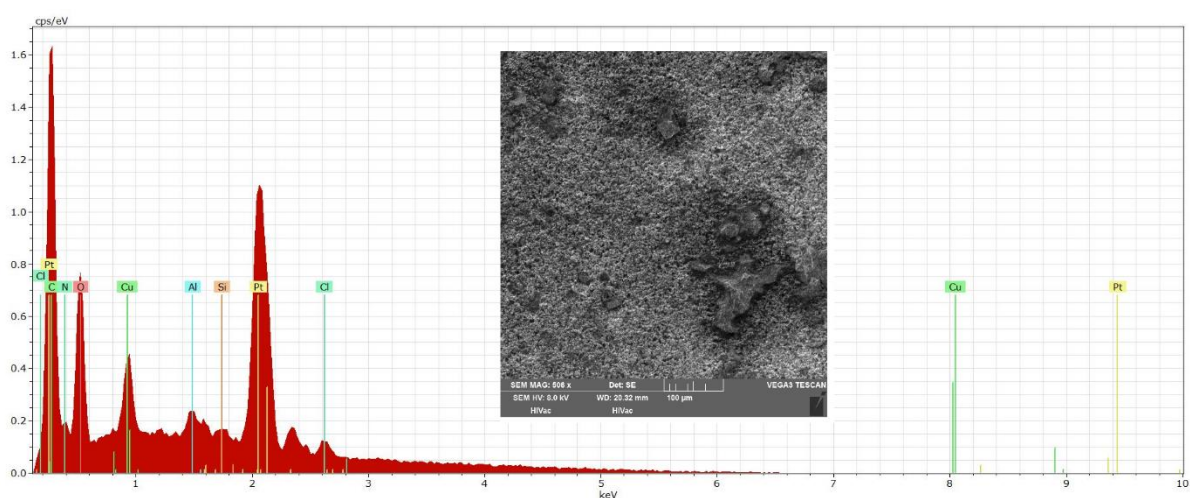
**Obr. 27.** Cyklické voltamogramy MeOH s  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$  na SPCE (typ C 110) pokryté vrstvou kolagenu (přerušovaná) a SPCE pokryté vrstvou kolagenu s kovalentně navázaným

$[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem (plná čára) při rychlosti skenování  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku 2,5 mV.

Vzniklá polymerní vrstva kolagenu zesítěna GTA a s kovalentně vázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem byla také charakterizována pomocí SEM a EDX spektroskopie (viz. Obr. 28 a 29). Zde byly použity dva druhy elektrodových substrátů, a to AuE s PtE. Ze SEM na povrchu AuE je zřejmé, že film polymeru má hrubozrnný charakter, zatímco na povrchu PtE spíše houbovitý charakter (porézní vrstva). Z EDX spektroskopie byl zpočten normovaný obsah mědi na 2,3% pro kolagenový film na AuE a 7,9%. Z těchto hodnot je patrné, že na chitosanový film bylo kovalentně zachyceno větší množství  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu, než u filmu z kolagenu. Důvodem bude zřejmě větší obsah  $-\text{NH}_2$  skupin v monomerní jednotce polymeru.



**Obr. 28.** EDX spektrum a SEM snímek (vložený) tištěné AuE (typ 250AT) pokryté vrstvou kolagenu zesítěného GTA a s kovalentně navázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem.

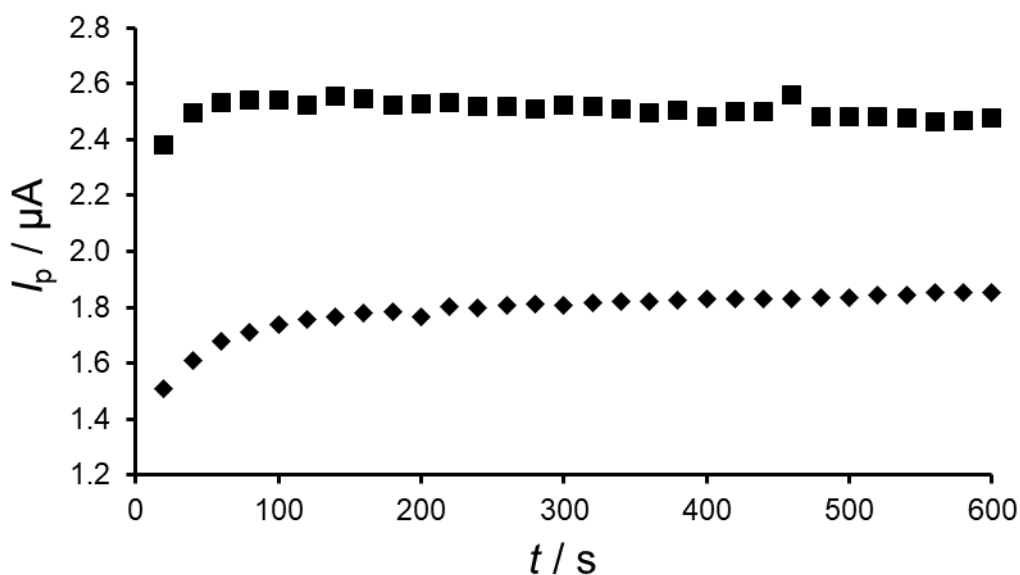


**Obr. 29.** EDX spektrum a SEM snímek (vložený) tištěné PtE (typ 550BT) pokryté vrstvou kolagenu zesítěného GTA a s kovalentně navázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem.

## 5.6. Elektrochemická kinetická studie

Katalytická (katecholázová) aktivita  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu v roztoku MeOH s přítomností  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  vůči 3,5-DTBC (modelový substrát) a vybraných neurotransmiterů byla studována pomocí DPV. Tato pulzní voltametrická technika byla využita pro měření úbytku substrátu v čase, kdy vždy bylo provedeno 30 měření s časovou prodlevou mezi jednotlivými skeny v trvání 20 s. Během této prodlevy byl roztok kontinuálně míchán při 400 ot./min. U takto navržené procedury, se sledoval pokles výšky oxidační píku studovaného substrátu.

V praxi to znamenalo, že se nejprve proměřila DPV vždy roztoku samotného substrátu (blank) a následně substrátu s přítomností  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu. Poté byly odečteny výšky píků v maximu a vyneseny v grafech proti času měření, jak je uvedeno na Obr. 30 a 31. Nejprve se studovala katalytická aktivita vůči 3,5-DTBC, kde byl pozorován okamžitý pokles signálu po přidání komplexu, nicméně s déle trvající časovou prodlevou nebyl pozorován pokles signálu, jak se očekávalo (viz. Obr. 30).

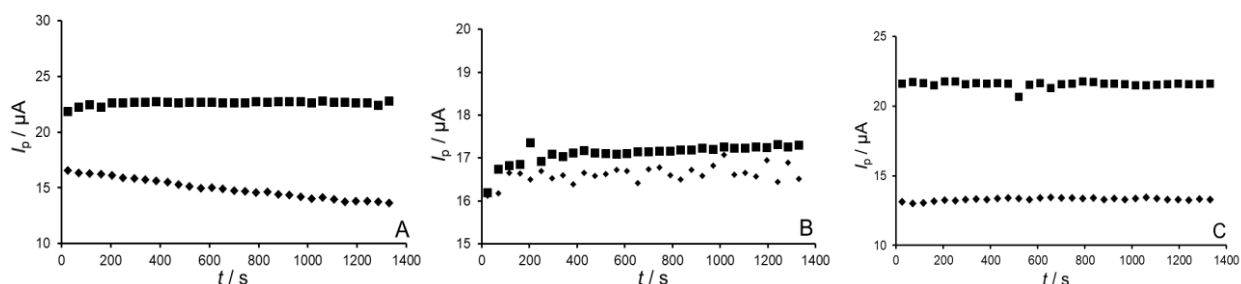


**Obr. 30.** Kinetické křivky  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5-DTBC (čtverec) a  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5-DTBC s přítomností  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu (kosočtverec) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v MeOH.

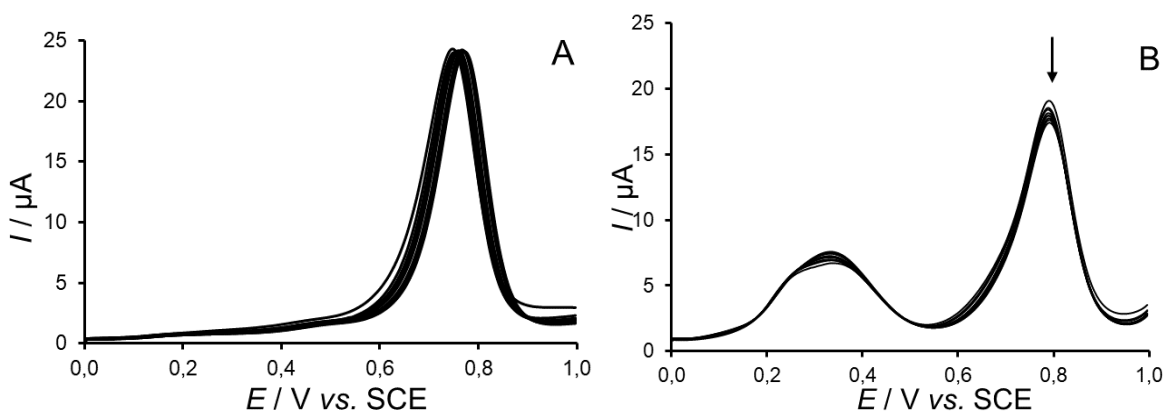
Dále byly stejným způsobem proměřeny neurotransmitery adrenalin, noradrenalin a dopamin. Opět zde pozorujeme okamžitý pokles proudových odezev po přidání komplexu u

adrenalinu a dopaminu. To naznačuje, že tyto neurotransmitery se rychle katalyticky oxidují, zatímco u noradrenalinu pokles pozorován téměř nebyl.

Za zmínku stojí, že proudová odezva adrenalinu v přítomnosti  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu má klesající trend oproti adrenalinu samotnému, což značí, že podléhá oxidační katalýze nejnádhěji ze všech studovaných neurotransmiterů. Noradrelanin s dopaminem mají trend téměř shodný jako bez přítomnosti  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}$  komplexu (viz. Obr. 31). Níže na Obr. 32 jsou k vidění voltamogramy anodické oxidace adrenalinu, kde je pokles signálu s každým měřením dobře viditelný.



**Obr. 31.** Kinetické křivky samotných  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  neurotransmiterů (čtverec), a to adrenalinu (A), noradrenalinu (B) a dopaminu (C) a s  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem (kosočtverec) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v  $\text{MeOH}$ .



**Obr. 32.** Diferenční pulzní voltamogramy  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  adrenalinu bez (A) a s přítomností  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu (B) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v  $\text{MeOH}$  při potenciálovém kroku  $5 \text{ mV}$  a amplitudě modulace  $0,05 \text{ V}$

Zde je nutné konstatovat, že z dat získaných kinetických křivek pro různé koncentrace neurotransmiterů nebylo možné vypočíst jednotlivé kinetické parametry. Lze však říci, že

uvedená metoda DPV by mohla nalézt své uplatnění při studiu katalytické aktivity umělých enzymů u substrátů, jejichž produkty nepředstavují chemicky stálá individua.

Dále byla vyzkoušena i amperometrie, kdy se tištěná elektroda pokryta polymerním filmem s kovalentně vázaným  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexem připevnila ke stěně voltametrické nádoby (nezpojena do elektrického obvodu). Do zvoleného tříelektrodeového systému obsahující GCE byly do kontinuálně míchaného média ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$  v MeOH) přidávány přídavky zásobního roztoku 3,5-DTBC. Nicméně žádný pokles proudu při  $-0,25 \text{ V}$  nebyl pozorován, tudíž lze usuzovat, že množství  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu imobilizovaného v polymerní vrstvě nebylo dostačující.

## 6. Závěr

Výsledky prezentované v této diplomové práci ukazují, že kovalentní imobilizace  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu imitujícího TYR pomocí polymeru je realizovatelná, tudíž i jiné komplexy mající katalytickou aktivitu by mohly být imobilizovány obdobným způsobem, ať už pro budoucí vývoj biomimetických senzorů pro klinickou analýzu, tak i v nejrůznějších technologiích zabývajících se syntézou či odbouráváním fenolických látek v životním prostředí.

Nicméně je nutné upozornit, že samotná depozice polymeru představuje složitý proces, který musí být optimalizován, neboť se zjistilo, že volba pracovních podmínek, jako je počáteční koncentrace monomeru a výběr elektrody, má významný vliv na výsledné vlastnosti polymerní vrstvy. Kolagen se prozatím ukázal jako nejvhodnější kandidát pro zachycení  $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$  komplexu chemickou reakcí v polymerní vrstvě.

Na otázku, zda má způsob imobilizace komplexu významný vliv na katecholázovou aktivitu, jako tomu je u přírodních enzymů, nebyla nalezena odpověď z důvodu omezeného času na experimentální část. Tudíž je toto téma stále otevřené budoucím vědeckým pracím.

## Seznam použité literatury

- [1] Silavi R., Divsalar A., Saboury A.A.: A short review on the structure–function relationship of artificial catecholase/tyrosinase and nuclease activities of Cu-complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **30** (2012) 752–772. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00397>
- [2] Davis J. H., Ward T.R.: Artificial metalloenzymes: Challenges and opportunities. *ACS. Cent. Sci.* **5** (2019) 1120–1136. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00397>

- [3] Murakami Y., Kikuchi J., Hisaeda Y., Hayashida O.: Artificial enzymes, *Chem. Rev.*, **96**, (1996) 721–758. <https://doi.org/10.1021/cr9403704>
- [4] Bjerre J., Rousseau C., Marinescu L., Bols M.: Artificial enzymes, “chemzymes”: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81** (2008) 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1653-5>
- [5] Gunnlaugsson T., Nieuwenhuyzen M., Nolan C.: Synthesis, X-ray crystallographic, spectroscopic investigation and cleavage studies of HPNP by simple bispyridyl iron, copper, cobalt, nickel and zinc complexes as artificial nucleases. *Polyhedron.* **22** (2003) 3231–3242. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(03\)00471-6](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(03)00471-6)
- [6] Uma V., Castineiras A., Nair B. U.: Copper(II) complexes of N<sub>4</sub> tetradentate ligands with flexible alkyl spacers: crystal structure, DNA binding and cleavage studies. *Polyhedron.* **26** (2007), 3008–3016. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.02.020>
- [7] Zhu L., Kostic N. M.: Sequence-dependent cleavage of albumins with palladium(II) complexes: role of serine residue in controlling the high regioselectivity of protein cleavage. *Inorg. Chim. Acta* (2002) **339**, 104–110. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(02\)00928-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(02)00928-3)
- [8] Alves W. A., de Almeida-Filho S.A., Santos R.H. de A., Ferreira da Costa A.M.: Diimine copper(II) complexes as building blocks for microporous catalytic materials. *Inorg. Chem. Commun.* **6** (2003) 294–299. [https://doi.org/10.1016/S1387-7003\(02\)00757-8](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(02)00757-8)
- [9] Alves W.A., de Almeida-Filho S.A., de Almeida M. V., Paduan-Filho A. , Becerra C.C., Da Costa Ferreira A.M.: Comparative kinetic studies on tyrosinase-like catalytic activity of dinuclear imidazole-containing copper(II) complexes. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **198** (2003) 63–75. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(03)00003-7)
- [10] Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R.: Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme. Microb. Technol.* **40** (2007) 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- [11] Rosati F., Roelfes G.: Artificial Metalloenzymes. *Chem. Cat. Chem.* **2** (2010) 916–927, <https://doi.org/10.1002/cctc.201000011>.
- [12] Andreescu S., Sadik O. A.: Correlation of Analyte Structures with Biosensor Responses Using the Detection of Phenolic Estrogens as a Model. *Anal. Chem.* **76** (2004), 552–560. <https://doi.org/10.1021/ac034480z>
- [13] Rahman S. F., Min K., Park S-H., Park J-H.Yoo, J. Ch., Park D-H.: Selective determination of dopamine with an amperometric biosensor using electrochemically

- pretreated and activated carbon/tyrosinase/Nafion®-modified glassy carbon electrode. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **21** (2016) 627–633. [10.1007/s12257-016-0382-3](https://doi.org/10.1007/s12257-016-0382-3)
- [14] Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón J. M.: Immunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus* using a tyrosinase–mercaptopropionic acid modified electrode as an amperometric transducer. *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008) 837–845. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1810-1>
- [15] Hasebe Y., Yokobori K., Fukasawa K., Kogure T., Uchiyama S.: Highly sensitive electrochemical determination of *Escherichia coli* density using tyrosinase-based chemically amplified biosensor. *Anal. Chim. Acta* **357** (1997) 51–54. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00544-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00544-8)
- [16] Che Y., Li Y., Slavik M.: Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. *Biosens. Bioelectron.* **16** (2001), 791–797. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00222-6)
- [17] Campanella L., Martini E., Pintore M., Tomassetti M.: Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors.* **9** (2009) 2202–2221. <https://doi.org/10.3390/s90302202>
- [18] Chuang MC., LIU CC., Yang MC.: An electrochemical tyrosinase-immobilized biosensor for albumin-toward a potential total protein measurement. *Sens. Actuators B Chem.* **114** (2006) 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.001>
- [19] Mossberg M., Vernick S., Ortenberg R., Markel G., Yosi SD., Rishpon J.: A Direct Electrochemical Detection Method of Melanoma Based on Melanoma Biomarker. *Electroanal.* **26** (2014), 1671–1675. <https://doi.org/10.1002/elan.201400150>
- [20] Mousa S. A., Bohunicky B.: Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **4** (2011) 1–10. <https://doi.org/10.2147/NSA.S13465>
- [21] Tohill I. E.: Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20** (2009), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.015>
- [22] Mann D.M., Yates, P.O. Neurotransmitter deficits in Alzheimer’s disease and in other dementing disorders. *Hum. Neurobiol.* **5** (1986) 147–158.
- [23] Geldenhuys W. J., Van der Schif C.J. et. al., Role of Serotonin in Alzheimer’s Disease. *CNS Drugs.* **25** (2011), 765–781. <https://doi.org/10.2165/11590190-000000000-00000>
- [24] Godridge H., Reynolds G. P., Czudek C., Calcutt N. A., Benton. M.: Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **50** (1987), 775–778. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.50.6.775>



- [25] Sigolaeva L. V., Makower A., Eremenko A. V., Makheva G. F., Malygin V. V., Kurochkin I. N., Scheller F. W.: Bioelectrochemical Analysis of Neuropathy Target Esterase Activity in Blood. *Anal. Biochem.* **290** (2001), <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4822>
- [26] Lopez M. S-P., Charmantray F., Helaine V., Heyquet L., Mousty Ch.: Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **26** (2010), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.023>.
- [27] Torriero A. A. J., Salinas E., Marchevsky E. J., Raba J., Silber J. J.: Penicillamine determination using a tyrosinase micro-rotating biosensor. *Anal. Chim. Acta* **580** (2006) 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.07.067>
- [28] Valero E., Carrión P., Varón R., Garcia-Carmona F.: Quantification of acetaminophen by oxidation with tyrosinase in the presence of Besthorn's hydrazone. *Anal. Biochem.* **318** (2003). [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00213-6)
- [29] Campanella L., Gregori E., Tomassetti M.: Salicylic acid determination in cow urine and drugs using a bienzymatic sensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.020>
- [30] Masuda T., Yamashita D., Takeda Y., Yonemori S.: Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** (2014), 197–201. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>
- [31] Gelb D. J., Oliver E., Gilman S.: Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* **56** (1999) 33–39. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.1.33>
- [32] Apetrei I. M., Apetrei C.: Biosensor based on tyrosinase immobilized on a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for detection of epinephrine. *Int. J. Nanomedicine* **8** (2013) 4391–4398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52760>
- [33] Apetrei I. M., Apetrei C.: Amperometric tyrosinase based biosensor for serotonin detection. *Rom. Biotechnol. Lett.* **18** (2013) 8253–8262.
- [34] Holm R. H., Kennepohl P., Solomon E. I.: Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem. Rev.* **96** (1996), 2239–2314. <https://doi.org/10.1021/cr9500390>
- [35] Liu Z., Liu Y., Yang H., Yang Y., Shen G., Yu R.: A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* **533** (2005), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.077>

- [36] Wang B., Zhang J., Dong S.: Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase–based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **15** (2000), 397–402. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00096-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00096-8)
- [37] Liu S., Yu J., Ju H.: Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* **540** (2003) 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(02\)01276-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(02)01276-7)
- [38] Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T. E.: Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, **7** (1996) 2563–2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>.
- [39] Sánchez-Ferrer Á., Rodríguez-López J. N., García-Cánova F., García-Carmona F.: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247** (1995) 1–11. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-T](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-T)
- [40] Gentshev P., Lüken M., Möller N., Rompel A., Krebs B.: Synthesis of a novel  $\mu$ -acetate bridged dinuclear Cu(II) complex as model compound for the active site of tyrosinase: crystal structure, magnetic properties and catecholase activity. *Inorg. Chem. Commun.* **4** (2001) 753–756. [https://doi.org/10.1016/S1387-7003\(01\)00317-3](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(01)00317-3)
- [41] Ismaya W. T., Rozeboom H. J., Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J., Dijkstra B. W.: Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochem.* **50** (2011), 5477–5486. <https://doi.org/10.1021/bi200395t>
- [42] Wichers H. J., Recourt K., Hendriks M., Ebbelaar C. E. M., Biancone G., Hoeberichts F. A., Mooibroek H., Soler-Rivas C.: Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from Agaricus bisporus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61** (2003) 336–341. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1194-2>
- [43] Sotomayor M. D. P. T., Tanaka A. A., Kubota L. T.: Tris (2,2-bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction. *Electrochim. Acta* **48** (2003) 855–865. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00777-6](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00777-6).
- [44] Chang T.: An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10** (2009) 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- [45] Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H., Sugiyama M.: Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *J. Biolog. Chem.* 2006 **281** (13) 8981–8990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509785200>
- [46] Sýs M., Pekec B., Kalcher K., Vytrás K.: Amperometric enzyme carbon paste-based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8** (2013) 9030–9040.

- [47] Wolcox D. E., Porras G. A., Hwang Y. T., Lerch K., Winkler E. M., Solomon E. I.: Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 4015–4027. <https://doi.org/10.1021/ja00299a043>
- [48] Kuswandi B., Andres R., Narayanaswamy R.: Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *Analyst.* **126** (2001) 1469–1491. <https://doi.org/10.1039/b008311j>
- [49] Starodub N. F., Samodumova I. M., Starodub V. N.: Usage of organosilanes for integration of enzymes and immunocomponents with electrochemical and optical transducers. *Sens. Actuators. B Chem.* **24** (1995) 173–176. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(95\)85037-6](https://doi.org/10.1016/0925-4005(95)85037-6)
- [50] Brüning C., GROBE J.: Aldehyde-functionalized ethoxysilanes as new enzyme immobilization reagents. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **22** (1995), 2323–2324. <https://doi.org/10.1039/C39950002323>
- [51] Szałapata K., Osińska-Jaroszuk M., Bryjak J., Jaszek M., Jarosz-Wilkolażka A.: Novel Application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin. *Braz. J. Chem. Eng.* **33** (2016), 251–260. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160332s20140111>
- [52] Woychik J.H., Wondolowski M. V.: Covalent bonding of fungal  $\beta$ -galactosidase to glass. *Biochim. Biophys. Acta* **289** (1972) 347–351. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(72\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0005-2744(72)90085-X)
- [53] Royer G. P., Liberatore F. A., Green G. M.: Immobilization of enzymes on aldehydic matrices by reductive alkylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64** (1945) 478–484. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90346-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90346-0)
- [54] Rao S. V., Anderson K. W., Bachas L. G.: Oriented immobilization of proteins. *Mikrochim. Acta* **128** (1998) 127–143. <https://doi.org/10.1021/bm201865r>
- [55] Montalbetti C. A. G. N., Falque V.: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* **61** (2005) 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
- [56] Gulla K. C., Gouda M. D., Thakus M. S. Karanth N. G.: Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. *Biosens. Bioelectron.* **19** (2004) 621–625. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00258-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00258-6)
- [57] Marion R., Muthusamy G., Geneste F.: Impact of nature and length of linker on the catecholase activity of a covalently immobilized copper(II) complex in continuous flow catalysis *J. Molec. Catalys. A: Chem.* **377** (2013) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.04.027>

- [58] Pereira A.R., Sedenho G.C., De Souya J.P., Crespolho F.N.: Advances in enzyme bioelectrochemistry. *An. Acad. Bras. de Ciênc.* **90** (2018) 825–857. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170514>
- [59] Nistor C., Emnéus J., Gorton L., Ciucu A.: Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta* **387** (1999) 309–326. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00071-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00071-9)
- [60] Hedenmo M., Narváez A., Domínguez E., Katakis I.: Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **425** (1997) 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)04966-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)04966-2)
- [61] Breslow R.: Biomimetic Control of Chemical Selectivity. *Acc. Chem. Res.* **13** (1980) 170–177. <https://doi.org/10.1021/ar50150a002>
- [62] Mondal D., Majee M. Ch.: Synthesis and structural characterization of a new high-valentbis(oxo)-bridged manganese(IV) complex and its catechol oxidase activity. *Inorg. Chim. Acta* **465** (2017) 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.073>
- [63] El-Motaleb A., Ramadan M., Ibrahim M. M., Shaban Y.: Synthesis, characterization, and tyrosinase biomimetic catalytic activity of copper(II) complexes with schiff base ligands derived from  $\alpha$ -diketones with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. *J. Mol. Struct.* **1006** (2001) 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.09.031>
- [64] Bharathi S. K., Sreedaran S., Rahiman K. A., Rajesh K., Narayanan V.: Synthesis, spectral, magnetic, electrochemical and kinetic studies of copper(II), nickel(II) and zinc(II) acetate complexes derived from phenol based ‘end-off’ ligands: Effect of p-substituents. *Polyhedron*. **26** (2007) 3993–4002. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.04.033>
- [65] Ghosh K., Drew G. B. M., Chattopadhyay S.: Synthesis and structure of a cobalt(III) complex containing pendant Schiff base ligand: Exploration of its catechol oxidase and phenoxazinone synthase like activity. *Inorg. Chim. Acta* **482** (2018) 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.05.025>
- [66] Anbu S., Kandaswamy M.: Electrochemical, magnetic, catalytic, DNA binding and cleavage studies of new mono and binuclear copper(II) complexes. *Polyhedron*. **30** (2011) 123–131, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2010.09.041>
- [67] Wendel A. A., Bagatin A. I., Da Costa Ferreira A. A.: Equilibria and tyrosinase activity of a dinuclear and its analogous tetranuclear imidazolate-bridged copper(II) complexes. *Inorg. Chim. Acta* **321** (2001) 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00490-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00490-X)
- [68] Klinman J.: Life as aerobes: are there simple rules for activation of dioxygen by enzymes? *J. Biol. Inorg. Chem.* **6** (2001) 1–13. <https://doi.org/10.1007/s007750000172>

- [69] Hughes A.: Evolution of the arthropod prophenoloxidase/hexamerin protein family. *Immunogenetics*. **49** (1999) 106–114. <https://doi.org/10.1007/s002510050469>
- [70] Gerdemann C., Eicken Ch., Krebs B.: The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. *Acc. Chem. Res.* **35** (2002) 183–191. <https://doi.org/10.1021/ar990019a>
- [71] Solomon E. I., Baldwin M. J., Lowery M. D.: Electronic Structures of Active Sites in Copper Proteins: Contributions to Reactivity. *Chem. Rev.* **92** (1992) 521–542. <https://doi.org/10.1021/cr00012a003>
- [72] Deverall B.: Phenolase and Pectic Enzyme Activity in the Chocolate Spot Disease of Beans. *Nature* **189** (1961) 311. <https://doi.org/10.1038/189311a0>
- [73] Panda M. K., Shaikh M. M., Butcher R. J., Ghosh P.: Functional mimics of catechol oxidase by mononuclear copper complexes of sterically demanding [NNO] ligands. *Inorg. Chim. Acta* **372** (2011) 145–151, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.01.081>
- [74] Selmeczi K., Réglér M., Giorgi M., Speier G.: Catechol oxidase activity of dicopper complexes with N-donor ligands. *Coord. Chem. Rev.* **245** (2003) 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2003.08.002>.
- [75] Butcher R. J., Diven G., Erickson G., Jasinski J., Mockler G. M., Pozdniakov R. Y., Sinn E.: Binuclear copper(II) complexes containing phenols and catechols. *Inorg. Chim. Acta* **239** (1995) 107–116. [https://doi.org/10.1016/0020-1693\(95\)04726-3](https://doi.org/10.1016/0020-1693(95)04726-3)
- [76] Grigoropoulou G., Christoforidis K. C., Louloudi M., Deligiannakis Y.: Structure-Catalytic Function Relationship of SiO<sub>2</sub>-Immobilized Mononuclear Cu Complexes: An EPR Study. *Langmuir* **23** (2007)10407–10418. <https://doi.org/10.1021/la700815d>
- [77] Chen Z.F., Liao Z. R., Li D. F., Li W. K., Meng X. G.: Crystal structure and catecholase-like activity of a mononuclear complex [Cu(EDTB)]<sup>2+</sup> (EDTB=N, N, N', N',-tetrakis(2-benzimidazolyl methyl)-1,2-ethanediamine). *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1315–1318. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.006>
- [78] Than R., Feldmann A. A., Krebs B.: Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. *Coord. Chem. Rev.* **182** (1999) 211-241, [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00234-3)
- [79] Santra A., Mondal G., Acharja M., Bera Pr., Panja A., Mandal K. T., Mitra P., Bera Pu.: Catechol oxidase mimetic activity of copper(I) complexes of 3,5-dimethyl pyrazole derivatives: Coordination behavior, X-ray crystallography and electrochemical study. *Polyhedron* **113** (2016) 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.03.055>

- [80] Banu S. K., Chattopadhyay T., Banerjee A., Bhattacharya S., Suresh E., Nethaji M., Zangrando E., Das D.: Catechol Oxidase Activity of a Series of New Dinuclear Copper(II) Complexes with 3,5-DTBC and TCC as Substrates: Syntheses, X-ray Crystal Structures, Spectroscopic Characterization of the Adducts and Kinetic Studies. *Inorg. Chem.* **47** (2008) 1083–7093. <https://doi.org/10.1021/ic701332w>
- [81] Nunes C. J., Borges B. E., Nakao L. S., Peyroux E., Hardré R., Faure B., Réglie M., Giorgi M., Bach Prieto M., Columbano Oliveira C., Da Costa Ferreira A. M.: Reactivity of dinuclear copper(II) complexes towards melanoma cells: Correlation with its stability, tyrosinase mimicking and nuclease activity. *J. Inorg. Biochem.* **149** (2015) 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.05.007>
- [82] Kinoshita I., Wright L. J., Kubo S., Kimura K., Sakata A., Yano T., Miyamoto R., Nishioka T., Isobe K.: Design and synthesis of copper complexes of novel ligands based on the pyridine thiolate group. *Dalton Trans.* **24** (2003) 993–2003. <https://doi.org/10.1039/B210420M>
- [83] Casella L., Monzani E., Gullotti M., Cavagnino D., Cerina G., Santagostini L., Ugo R.: Functional Modeling of Tyrosinase. Mechanism of Phenol ortho-Hydroxylation by Dinuclear Copper Complexes. *Inorg. Chem.* **35** (1996) 7516–7525. <https://doi.org/10.1021/ic9601100>
- [84] Hoffert W. A., Mock T. M., Appel A. M., Yang J. Y.: Incorporation of Hydrogen-Bonding Functionalities into the Second Coordination Sphere of Iron-Based Water-Oxidation Catalysts. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2013) 3846–3857. <https://doi.org/10.1002/ejic.201201499>
- [85] Amenuvor G., Rono K. Ch., Darkwa J., Makhubela B. C. E.: Multidentate pyridyl-aminophosphinite and pyridylphosphoramidite ruthenium(II) complexes: Synthesis, structure and application as levulinic acid hydrogenation pre-catalysts. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019** (2019) 3940–3940. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900640>
- [86] D'Souza S.F.: Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16** (2001), 337-353, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00125-7)
- [87] Durán N., Rosa A. M., D'Annibale A., Gianfreda L.: Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **31** (2002) 907–931. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4)
- [88] Feng W., Ji P.: Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnol. Adv.* **29** (2011) 889–895. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4)

- [89] Nguyen H. H., Kim M.: An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.* **26** (2017) 157–163. <http://dx.doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- [90] Manju G., Chaubey A., Malhotra B. D.: Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 345-359, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8)
- [91] Weetall H. H.: Immobilized enzymes: Analytical applications. *Anal. Chem.* **46** (2008) 602–615. <https://doi.org/10.1021/ac60343a721>
- [92] Beck F.: Electrodeposition of polymer coatings. *Electrochim. Acta* **33** (1988) 839-850, [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(88\)80080-X](https://doi.org/10.1016/0013-4686(88)80080-X)
- [93] Apetrei C., Rodríguez-Mendéz M. L., De Saja J. A.: Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochim. Acta* **56** (2011) 8919–8925. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.07.127>
- [94] Apetrei C.: Novel method based on polypyrrole-modified sensors and emulsions for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. *Food Res. Intl.* **48** (2012) 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.010>
- [95] Rodríguez-Mendéz M. L.: Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. *Electrochim. Acta* **53** (2008) 5867–5872. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.04.006>
- [96] Pérez-López B. and Merkoçi A.: Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. *Microchim. Acta* **179** (2012) 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0871-9>
- [97] Durgaryan A. H., Durgaryan A. N., Arakelyan R. H., Miraqyan A. N.: Copolymerization of aniline p-phenylenediamine in an acetic acid medium. *Chem. Eng. Polym.* (2017). <https://doi.org/10.1201/9781315365985-1>
- [98] Apetrei I. M., Apetrei C.: Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples. *Sens. Actuators B Chem.* **178** (2013) 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.064>
- [99] Wang B., Zheng J., He Y., Sheng Q.: A sandwich-type phenolic biosensor based on tyrosinase embedding into single-wall carbon nanotubes and polyaniline nanocomposites. *Sens. Actuators B. Chem.* **186** (2013) 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.016>
- [100] Wang S., Tan Y., Zhao D., Liu G.: Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles–chitosan nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **23** (2008) 1781–1787. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.02.014>

- [101] Lupu S., Lete C., Balaure P. C., Caval D. I., Mihailciuc C., Lakard B., Hihn J-Y., del CAmpo F. Ch.: Development of Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Tyrosinase-Conducting Polymer Composite Electrodes. *Sensors* **13** (2013) 6759–6774. <https://doi.org/10.3390/s130506759>
- [102] Wang J., Fang L., Lopez D.: Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase–graphite–epoxy biocomposite. *The Analyst* **119** (1994) 455–458. <https://doi.org/10.1039/AN9941900455>
- [103] Rodríguez-Sevilla E., Ramirez-Silva M. T., Palomar-Pardavé M., Romero-ROmo M., Marty J. L., Ibarra-Escutia P.: A Novel Tyrosinase Base Biosensor for the Quantification of Antioxidant Capacity: Evaluation on Infusions of Medicinal Plants. *ECS Trans.* **64** (2014) 49–57. <https://doi.org/10.1149/06401.0049ecst>
- [104] Rajesh, Takashima W., Kaneto K.: Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *React. Funct. Polym.* **59** (2004) 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.006>.
- [105] Adhikari B., Majumdar S.: Polymer in sensor applications. *Prog. Polym. Sci.* **29** (2004) 699–766. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.03.002>
- [106] Sharma A. L., Singhal R., Kumar A., Rajesh, Pande K. K., Malhotra B.D.: Immobilization of glucose-oxidase onto electrochemically prepared poly (aniline co fluoroaniline) films. *J. Appl. Polym. Sci.* **91** (2004) 3999–4006. <https://doi.org/10.1002/app.13553>
- [107] Taxis Du Poet P., Miyamoto S., Murakami T., Kimura J., Karube I.: Direct electron transfer with glucose oxidase immobilized in an electro polymerized poly (N methyl pyrrole) film on gold microelectrode. *Anal. Chim. Acta* **235** (1990) 255–263. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)82082-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)82082-6)
- [108] Barlett P.N., Cooper J.M.: A review of the immobilization of enzymes in electropolymerised film. *J. Electroanal. Chem.* **362** (1993) 1–12. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80001-X](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80001-X)
- [109] Skládal P.: Mushroom tyrosinase-modified carbon paste electrode as an amperometric biosensor for phenols. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **56** (1991) 1427–1433. <https://doi.org/10.1135/cccc19911427>
- [110] Gorton, L.: Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanal.* **7** (1995) 23–45. <https://doi.org/10.1002/elan.1140070104>



- [111] Dempsey E., Diamond D, Collier A.: Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. *Biosens. Bioelectron.* **20** (2004) 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.02.007>
- [112] Albareda-Sirvent M., Merkoçi A., Alegret S.: Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sens. Actuators B Chem.* **69** (2000) 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00536-0)
- [113] Sýs M., Metelka R., Mikysek T., Vytřas K.: Improvement of enzyme carbon paste-based biosensor using carbon nanotubes for determination of water-soluble analogue of vitamin E. *Chem. Pap.* **69** (2015) 150–157. <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0608-9>
- [114] Mello L. D., Kubota L. T.: Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* **77** (2002) 237–256. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00104-8)
- [115] Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier D. B.: Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- [116] Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A.: An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29** (2015) 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- [117] Novick S.J., Rozzell J.D.: Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment. *Microb. Enzym. Biotransformation* **17** (2005) 247–271. <https://doi.org/10.1385/1-59259-846-3:247>.
- [118] Arce R., del Río R., Ruiz-León D., Velez J., Isaacs M., del Valle M. A., Aguirre M. J.: Evidence for the Formation of a Copolymer by Simultaneous Electropolymerization of p-Tetraaminophenyl Porphyrin Cobalt (II) and o-Phenylenediamine on Glassy Carbon. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7** (2012) 11596–11608.
- [119] Do Nascimento G. M., Sestrem R. H., Temperini M. L. A.: Structural characterization of poly-para-phenylenediamine–montmorillonite clay nanocomposites. *Synth. Met.* **160** (2010) 2397–2403. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.09.016>
- [120] Ribeiro J. F. F., Melo J. R. S., Silva K. B. O., Cabral Filho P. E., Santos B. S., Pereira G. A. L., Ribeiro R. T., Silva L. C., Fontes A.: CdTe quantum dots in a glassy carbon electrochemical platform modified by N-substituted polypyrrole: Increasing the functional active surface for conjugation. *Surf. Interfaces.* **19** (2020) 100532. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100532>

- [121] Ding L., Zhao X., Huang Y., Yan J., Li T., Liu P.: Ultra-broadband and covalently linked core-shell CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@PPy nanoparticles with reduced graphene oxide for microwave absorption. *J. Colloid Interface Sci.* **595** (2021) 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.03.019>
- [122] Sukmawardani Y., Ihsanawati, Buchari: Optimization of Pyrrole Electropolymerization on a Steel Gauze Electrode Using the Cyclic Voltammetry Method. *Key Eng Mater.* **811** (2019) 133–138. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.811.133>
- [123] Aybastier Ö., Demir C.: Immobilization of *Candida antarctica* Lipase A on, Chitosan Beads for Production of Fatty Acid Methyl Ester from Waste Frying Oil. *Energ. Source Part A.* **36** (2006) 2313–2319. <https://doi.org/10.1080/15567036.2011.567233>
- [124] Wang Q., Zhang B., Lin X., Weng W.: Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–muti-walled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sens. Act. B.* **156** (2011) 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.02.004>
- [125] Miao Y., Tan S. N.: Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Analyst* **125** (2000) 1591–1594. <https://doi.org/10.1039/B003483P>
- [126] Dong W., Wang K., Chen Y., Li W., Ye Y., Jin S.: Construction and Characterization of a Chitosan-Immobilized-Enzyme and  $\beta$ -Cyclodextrin-Included-Ferrocene-Based Electrochemical Biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection. *Materials.* **10** (2017) 868. <https://doi.org/10.3390/ma10080868>
- [127] Zhang Y., Ji Ch.: Electro-Induced Covalent Cross-Linking of Chitosan and Formation of Chitosan Hydrogel Films: Its Application as an Enzyme Immobilization Matrix for Use in a Phenol Sensor. *Anal. Chem.* **82** (2010) 5275–5281. <https://doi.org/10.1021/ac100714s>
- [128] Sugawara K., Hirabayashi G., Kamiya N., Kuramitz H.: Evaluation of concanavalin A-mannose interaction on the electrode covered with collagen film. *Talanta* **68** (2006) 1176–1181. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.07.036>
- [129] Ahlers M., Stein N., Broch L., Brand I.: Study of the potential driven changes in a collagen film self-assembled on a polycrystalline gold electrode surface. *J. Electroanal. Chem.* **706** (2013) 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.08.010>
- [130] Rau I., Kajzar F.: Biopolymers for application in photonics. *J. Mater. Sci.* **10** (2014) 29–41. <http://dx.doi.org/10.15688/jvolsu10.2014.4.4>
- [131] Garcia-Molina F, Munoz J.L., Varon R., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F., Tudela J.: A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and

- diphenolase activities of tyrosinase. *J. Agr. Food. Chem.* **55** (2007) 9739–9749. <https://doi.org/10.1021/jf0712301>
- [132] Gibson Q.H., Swoboda B.E., Massey V.: Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* **239** (1964) 3927–3934. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91224-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91224-X)
- [133] Ge X., Sirich T.L., Beyer M.K., Desaire H., Leary J.A.: A strategy for the determination of enzyme kinetics using electrospray ionization with an ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **73** (2001) 5078–5082. <https://doi.org/10.1021/ac0105890>
- [134] Rassaei L., Cui J., Goluch E. D., Lemay S. G.: Substrate-dependent kinetics in tyrosinase-based biosensing: amperometry vs. Spectrophotometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **403** (2012) 1577–1584. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5964-0>
- [135] Solem E., Tuzcek F., Decker H.: Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angew. Chem.* **55** (2016) 2884–2888. <https://doi.org/10.1002/anie.201508534>
- [136] Johnson K. and Goody S. R.: The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochem.* **50** (2011) 8264–8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>
- [137] Rountree E. S., McCarthy B. D., Eisenhart T. T., Dempsey J. L.: Evaluation of Homogeneous Electrocatalysts by Cyclic Voltammetry. *Inorg. Chem.* **53** (2014) 9983–10002. <https://doi.org/10.1021/ic500658x>
- [138] Keleti K.: Kinetic power: basis of enzyme efficiency, specificity and evolution. *J. Mol. Catal.* **47** (1988) 271–279. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(88\)85051-X](https://doi.org/10.1016/0304-5102(88)85051-X)
- [139] Kermasha S., Bao H., Bisakowski B.: Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **11** (2001) 929–938. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00163-6)
- [140] Yokoyama K., Kayanuma Y.: Cyclic Voltammetric Simulation for Electrochemically Mediated Enzyme Reaction and Determination of Enzyme Kinetic Constants. *Anal. Chem.* **70** (1998) 3368–3376. <https://doi.org/10.1021/ac9711807>
- [141] Rajesh K., Rahiman A. K., Bharathi K. S., Sreedaran S., Gangadevi V., Narayanan V.: Synthesis, characterization and bioactive evaluation of copper(II) 5, 0,15,20-tetrakis[ $\alpha,\alpha,\alpha$ -2-(2,6-bis(4-methylpiperazine-1-yl-methyl)-4-iminomethylphenol)phenyl] porphyrin: A picket-fence porphyrin. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **77** (2010) 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.07.005>

- [142] Durgaryan A. A., Arakelyan R. A., Durgaryan N. A.: Oxidative polymerization of *p*-phenylenediamine. *Russ. J. Gen. Chem.* **84** (2014) 1095–1100. <https://doi.org/10.1134/S1070363214060073>
- [143] Sayyah S. M., Abd El-Rehim S. S., El-Deeb M. M., Kamal S. M., Azooz R. E.: Electropolymerization of *p*-Phenylenediamine on Pt-Electrode from Aqueous Acidic Solution: Kinetics, Mechanism, Electrochemical Studies, and Characterization of the Polymer Obtained. *J. Appl. Polym. Sci.* **117** (1010) 943–952. <https://doi.org/10.1002/app.31476>
- [144] Yang C.-H., Wen T.-C.: Electrochemical copolymerization of aniline and *para*-phenylenediamine on IrO<sub>2</sub>-coated titaniumnelectrode. *J. Appl. Electrochem.* **24** (1994) 166–178. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(98\)80094-5](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(98)80094-5)
- [145] Figueiró S. D., Góes J. C., Moreira R. A., Sombra A. S. B.: On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydr. Polym.* **56** (2004) 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.01.011>
- [146] Arce R., del Río R., Ruiz-León D., Velez J., Isaacs M., Del Valle M. A., Aguirre.: Evidence for the Formation of a Copolymer by Simultaneous Electropolymerization of *p*-Tetraaminophenyl Porphyrin Cobalt (II) and *o*-Phenylenediamine on Glassy Carbon. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7** (2012) 11596–11608.
- [147] Stočes M., Kalcher K., Švancara I., Vytřas K.: A New Biosensor for Glucose Based on Carbon Paste and Enzyme Immobilized onto the Polyaniline Film. *Int. J. Electrochem. Sci.* **6** (2011) 1917–1926.
- [148] Sugumaran M.: Reactivities of Quinone Methides versus Quinones in Catecholamine Metabolism and Eumelanin Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2017) 1576. <https://doi.org/10.3390/ijms17091576>