

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р **Весела Цветанова Цакова-Станчева** – професор в **Институт по физикохимия, БАН**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**“ по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма *Физикохимия*

Автор: Мария Генова Пимпилова.

Тема: Модифициране на стъкловъглеродни електроди с електроотложено злато или 2D-наноматериали: характеризирание и приложения

Научен ръководител: доц. д-р Нина Димитрова Димчева – Пловдивски университет *Паисий Хилендарски*

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-21-245 от 30.01.2024 г. на Ректора на Пловдивския университет *Паисий Хилендарски* (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема *Модифициране на стъкловъглеродни електроди с електроотложено злато или 2D-наноматериали: характеризирание и приложения* за придобиване на образователната и научна степен *доктор* в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки; докторска програма: *Физикохимия*. Автор на дисертационния труд е Мария Генова Пимпилова – докторантка в редовна форма на обучение към катедра *Физикохимия* с научен ръководител доц. д-р Нина Димитрова Димчева от ПУ.

Представеният от Мария Пимпилова комплект материали е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- протокол от предварително обсъждане в катедра *Физикохимия*;
- дисертационен труд;
- автореферат на български и на английски език;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на на публикациите по темата на дисертационния труд;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

– справка за съответствие с минималните изисквания.

Докторантът е приложил две научни публикации в пълен текст. Списък на забелязани цитирания на трудовете на докторантката е включен в самия дисертационен труд (стр. 132).

2. Кратки биографични данни за докторанта

Мария Пимпилова в завършила бакалавърската програма по *Химия* в ПУ през 2017 г, а през 2018 г завършва магистратура по *Хранителна химия* към същия университет. Зачислена е за редовен докторант през март 2019 г. От януари 2020 г. до декември 2023 г. е изследовател в Център по технологии към ПУ като извършва научно-изследователска дейност в областта *Биосензори*. От март 2020 г. до сега заема длъжност *асистент* в катедра *Физикохимия* на университета. В периода 2019-2024 г участва в изпълнението на два договора, финансирани от *Фонд Научни изследвания* и на договор за Центъра за компетентност *Персонализирана иновативна медицина - ПЕРИМЕД*, финансиран по ОП НОИР. От 2022 г. изпълнява проект по програмата *Млади учени и постдокторанти - 2*, финансиран от МОН. Този проект е в областта на *Електрокатлитични свойства на модифицирани електродни материали* и е пряко свързан с темата на дисертацията.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Тематиката на дисертацията попада в областта на физикохимията и по-специално на използването на електроаналитични методи за детектиране на биологично-значими вещества. Дисертационният труд е посветен на получаването, характеризирането и използването на специфично модифицирани електродни материали като електрохимични сензори за катехоламини, допамин и L-епинефрин, и за водороден пероксид и негови органични хомолози. Темата на дисертацията е актуална и е свързана най-общо с търсенето на подходящи модифицирани електроди, осигуряващи бързо, надеждно и икономически изгодно определяне на вещества, участващи в биохимичните процеси в човешкия организъм.

В литературата съществуват значителен брой публикации, посветени на електрохимичната детекция на катехоламини и водороден пероксид. Независимо от това продължават изследванията на различни видове електродни материали, които биха могли да подобрят основни характеристики на електрохимичните сензорни материали като чувствителност, граница на откриване, концентрационна област на линеен електроаналитичен отговор, стабилност, дълготрайност и др. В дисертацията са поставени две основни задачи:

- получаване на ензимен електрод чрез електроотлагане на злато върху стъклевъглероден електрод и следваща ковалентна имобилизация на ензима лакказа за електрохимично определяне на катехоламини;

- модификация на стъклевъглеродни електроди с графитен въглероден нитрид ($g\text{-C}_3\text{N}_4$), чист или дотиран с метални оксиди, подходящ за определяне на пероксидни съединения (водороден пероксид и третичен бутил хидропероксид).

Опитите за използване на ензимни електроди на основата на лакказа за определяне на катехоламини започват още през 90-те години на миналия век с директна имобилизация на лакказа върху стъклевъглероден електрод. Впоследствие за имобилизация на ензима са използвани електроди от въглеродна паста, въглеродни нанотръбички, платина или злато. Изследвани са и електроди, получени чрез предварително синтезирани златни наночастици, смесени с въглеродна паста и лакказа. В настоящата дисертация е избран различен подход за комбиниране на злато и лакказа с оглед на получаване на по-голяма електроактивна повърхност на каталитичния метал и устойчиво ковалентно свързване на ензима с металната фаза.

Съдържащите азот въглероди, в частност $g\text{-C}_3\text{N}_4$, са обект на значително внимание поради ролята на азота като силен електронен донор, който стабилизира π -връзките в структурата и води до подобряване на стабилността, скоростта на пренос на електрони, а оттам и на трайността на въглеродните носители при използването им за електрокаталитични цели. Наред с изследванията, посветени на чистия $g\text{-C}_3\text{N}_4$ интензивно се изучава и възможността за допълнителното му модифициране с метални оксиди с оглед на различни фотоелектрохимични и сензорни приложения. Сред металните оксиди, използвани в комбинация с $g\text{-C}_3\text{N}_4$ за електрохимични приложения (фотоелектрокатализ, суперкондензатори и др.), най-често са изучавани TiO_2 , ZnO и WO_3 . Комбинирането на $g\text{-C}_3\text{N}_4$ и метални оксиди като MgO , Bi_2O_3 и Co_3O_4 (предмет на настоящата дисертация) и тяхното приложение за електроаналитични цели, се среща рядко в литературата, а в случая на определяне на водороден пероксид не е било изследвано до сега. В този смисъл проблемът, разработван по тази задача от дисертацията, е актуален и отговаря на съвременните търсения, целящи от една страна, избягване на употребата на благородни метали, и от друга, подобряване на средата за работа на каталитични компоненти с ниска електрическа проводимост (каквато е Co_3O_4) при използването им за електроаналитични цели.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор, включен в дисертацията, заема 32 от общо 131 страници на дисертационния труд и се позовава на 218 публикации в международната литература. По същество обзорът се опитва да покрие три широкообхватни тематични области: (а) получаване на модифицирани електроди; (б) приложения на модифицирани електроди за

електроаналитични цели; (в) електрохимични методи за характеризиране на електроди и за електроаналитични изследвания.

Получаването на модифицирани електроди е предмет на хиляди публикации в научната литература, поради което покриването на такова широко поле на научни изследвания е амбициозна задача. Докторантката се насочва основно към модифицирането на въглеродни материали (стъклевъглерод, графен, графенов оксид, въглероден нитрид и др.) с метални микро- и наноструктури и оксиди на преходни метали. Това са и системите, които имат отношение към изследванията, представени в дисертационния труд. Що се отнася до електроаналитичните приложения на модифицираните електродни материали, акцент е поставен върху електроаналитичното определяне на водороден пероксид и на катехоламини. В частта, посветена на катехоламини, обзорът е ограничен до биосензори (т.е. ензимно-модифицирани електрод) с особено внимание, обърнато на ензима лакказа, използван в дисертационния труд. Последната част на литературния обзор, посветена на електрохимични методи, представя накратко всички електрохимични измерителни методи, използвани в дисертацията.

Литературната справка служи за основа при дефинирането на ясно поставената **цел** на дисертацията, а именно **разработването на модифицирани електроди като електрохимични сензори за два вида биологично-значими съединения – катехоламините, допамин и L-епинефрин, и водороден пероксид и неговите органични хомолози**. Несъмнено е, че докторантката познава състоянието на проблема и представя значителен по обем литературни източници, на базата на които и, изхождайки от най-висока степен на общност, извежда основните задачи на дисертацията.

5. Методика на изследването

В Експерименталната част (трета глава на дисертационния труд), са описани разнообразни препаративни техники, необходими за получаване на модифицираните електроди и подходящо избрани електрохимични измерителни методи, необходими за характеризиране на електродните материали и за електроаналитични измервания. Описанието на всички използвани техники е детайлно и дава възможност да се проследят всички експериментални подходи за получаване на каталитично активни стъклевъглеродни електроди чрез различен тип модификация: електроотлагане на злато; накапване на суспензии, съдържащи графитен въглероден нитрид ($g-C_3N_4$), чист или дотиран с метални оксиди като MgO , Bi_2O_3 , Co_3O_4 ; имобилизиране на ензима лакказа върху модифициран със злато стъклевъглероден електрод; имобилизиране на ензима каталаза върху стъклена подложка. За електрохимично характеризиране на модифицираните електроди във фонов електролит и в

присъствие на изследваните вещества са използвани цикличната волтаперометрия и електрохимична импедансна спектроскопия, допълнени с оптична или електронна микроскопия. Електроаналитични измервания са провеждани с методите на диференциална импулсна волтаперометрия и хроноамперометрия. С помощта на ротиращ дисков електрод е определен порядъкът на електрохимичната реакция в случая на редукция на водороден пероксид при използван на електрод, модифициран с Co-g-C₃N₄. Използваната комбинация от разнообразни електрохимични методи позволява да се постигнат целите на изследването и отговаря на съвременните подходи в електрохимичния експеримент.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Съдържанието на дисертационния труд е представено в пет глави: 1. Литературен обзор, 2. Постановка на изследванията, 3. Експериментална част, 4. Резултати и дискусия и 5. Изводи.

Изложението на същинската част на дисертацията (52 страници в четвърта глава) е структурирано в три основни теми: 1. Модифициран с електрохимично отложено злато стъкловъглероден електрод – получаване, охарактеризиране и приложения; 2. Стъкловъглероден електрод, модифициран с двумерни наноматериали на базата на графитен въглероден нитрид (g-C₃N₄); 3. Електрокаталитична активност на модифициран Co-g-C₃N₄/NafionTM електрод в неводна среда.

Първата част от експерименталните изследвания е посветена на получаването на биосензор за катехоламини като са използвани два алтернативни метода за електроотлагане на злато и е извършена оптимизация и по отношение на модификатора (цистеин или цистамин), използван за ензимна имобилизация. Установено е, че е възможно електроаналитично определяне на двата катехоламина (допамин и L-епинефрин) при граници на откриване 0.037 μM за допамин и 0.054 μM за L-епинефрин и при линейна зависимост на електроаналитичния сигнал от концентрацията до концентрации съответно 120 μM и 190 μM. Приложимостта на разработения биосензор е демонстрирана чрез измерване на концентрацията на двата катехоламина в инжекционни разтвори.

Частта, свързана с модифицирането на стъкловъглеродни електроди с чист графитен въглероден нитрид (g-C₃N₄) и с допълнително внедрени метални оксиди (MgO, Bi₂O₃ и Co₃O₄), представя значителните усилия за оптимизиране на електродните покрития във връзка с ролята на няколко фактора: вид на металния оксид, съотношение на нитридна и металооксидната фаза, вид (NafionTM или глутаров алдехид) и количество на свързващия агент, рН на буферния разтвор, както и параметри на електроаналитичното измерване. Извършена е значителна по обем експериментална работа, която позволява да се избере

модифициран електрод от типа (Co-g-C₃N₄)/NafionTM, който е подходящ за електрохимично детектиране на водороден пероксид и третичен бутилхидропероксид в широки концентрационни граници във водна среда. Така оптимизираният каталитичен електрод е използван за електрохимично проследяване на активността на ензима каталаза, имобилизиран върху стъклена подложка. Разликата в електрокаталитичните токове, измерени в отсъствие и присъствие на имобилизираната каталаза, е интерпретиран с уравнението на Михаелис-Ментен. Този нов електрохимичен подход за изследвана на ензимна активност е без аналог в научната литература.

Третата част от представянето на оригиналните резултати е посветена на използването на разработения пероксиден каталитичен електрод за определяне на водонерастворими органични пероксидни съединения (бензоилпероксид като моделен пероксид и окислено антицелулитно масажно масло като реална проба). Резултатите в тази част разкриват възможността за приложение на разработения пероксиден каталитичен електрод за електроаналитично определяне на пероксидни числа на растителни масла.

Всички експериментални изследвания са представени с достатъчно подробности, позволяващи да се проследят изведените резултати и достоверността на направените заключения. Изводите са формулирани коректно на базата на основните резултати, получени в дисертацията. Много добро впечатление прави фактът, че във всяка една от частите има критичен анализ на стабилността на получените модифицирани електроди и пригодността им за дълготрайно използване.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приносите на докторската дисертация се отнасят до получаване и системно охарактеризиране на модифицирани електроди, които да намерят приложение като електрохимични сензори за определяне на биологично-значими вещества, участващи в човешкия метаболизъм, или такива, налични в продукти на козметичната или хранителната промишленост. Те могат да се резюмират, както следва:

(а) Разработен е биоензимен сензор за катехоламините допамин и L-епинефрин на основата на електроотложено злато и имобилизирана лакказа, който показва по-ниски граници на откриване и по-широки концентрационни интервали на линеен електроаналитичен сигнал в сравнение с разработени по-рано електроди, използващи предварително синтезирани златни наночастици и имобилизирана лакказа.

(б) Разработен е модифициран електрод, с висока електрокаталитична активност, основаващ се на синергичен ефект на катализатора Co-g-C₃N₄ и йономера NafionTM, подходящ

за определяне на водоразтворими пероксиди (водороден пероксид и третичен бутилхидропероксид) в широк диапазон от концентрации от 0.4 до 14 mM.

(в) Разработен е пионерен електрохимичен метод за определяне на активността на имобилизирания ензим каталаза, който е без аналог в научната литература.

(г) На базата на каталитичен електрод от типа Co-g-C₃N₄ и Nafion™ е разработен електрохимичен метод за определяне на пероксидно число на растителни масла като алтернатива на широко използваните титриметрични методи.

Като цяло оценявам високо приносите на дисертацията, които имат научно-приложен характер и са свързани с възможности за внедряване в практиката.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Дисертационният труд на Мария Пимпилова се основава на две публикации на английски език, излезли от печат през 2022 г. в реферирани международни списания, *Biosensors* и *Catalysts*. Двете списания са сред най-престижните в съответните специфични научни области и попадат както следва: *Biosensors* в първата четвъртина (Q1) в реда на списанията по импакт фактор в областта *Аналитична химия* и *Catalysts* във втората четвъртина (Q2) в реда на списанията по импакт фактор в областта *Физикохимия*.

Публикациите, представени от докторант Пимпилова, са резултат на колективен труд като освен докторантката и нейния научен ръководител като съавтори участват още двама изследователи от ПУ (в публикацията, посветена на редукция на водороден пероксид) и един от Техническия университет София - филиал Пловдив (в публикацията, посветена на окисление на допамин). Както става ясно от текста на дисертационния труд, съавторите от Химически факултет на ПУ, доц. Стоянова и гл. ас. Колчева, са синтезирали, охарактеризирали и предоставили катализаторите, използвани впоследствие от докторантката за модифициране на стъкловъглеродни електроди и електрохимични изследвания на редукция на водороден пероксид. В двете публикации, включени в дисертацията, докторантката е на първо място в реда на съавторите, което ми дава основание да смятам, че тя има основен принос при провеждането на всички електрохимични измервания и получаванто на основните експериментални резултати, представени в дисертацията.

Докторантката е съавтор и на заявка за патент (№ BG|P|2023|113803), регистрирана в Патентно ведомство на Република България на 27.10.2023 г. със заглавие *Електрохимичен метод за количествено определяне на пероксидни съединения* и автори В. Колчева, Н. Димчева, М. Стоянова, М. Пимпилова.

Списъкът с намерените цитирания на трудовете на докторантката показва, че статията, публикувана в *Biosensors*, има шест цитирания (без автоцитиране), а тази, публикувана в

Catalysts, има две цитирания (без автоцитиране). Тези отзиви от чуждестранни автори са получени за по-малко от две години след изилизване на публикациите, което е несъмнено указание за актуалността на тематиката и значимостта на получените резултати.

9. Лично участие на докторантката

Както бе отбелязано по-горе, докторантката е първи автор в двете публикации, на които се основава дисертационният труд. Това ми дава основание да считам, че представените експериментални изследвания са лично дело на докторантката. Прави впечатление и компетентното коментиране на въпроси, зададени ѝ по време на предварителното обсъждане на дисертацията, което свидетелства за отлично познаване на детайлите на експеримента и на научния проблем като цяло. Мария Пимпилова е докладвала научните си резултати пред шест международни и национални конференции и семинари, което показва активната ѝ роля в представянето на изследванията, включени в дисертационния труд.

Макар че мога да дам оценка за личното участие на докторантката само по косвени сведения, считам, че то е било определящо за извършената значителна по обхват експериментална работа по модифициране на електроди с различни типове модификатори и електрохимично изследване на техните отнасяния и възможности за електроаналитични приложения.

10. Автореферат

Авторефератът, представен на български и на английски език, се състои от 32 страници, в които са включени 27 фигури и три таблици. По обем той отговаря на изискването на Правилника за развитие на академичния състав на ПУ. Авторефератът е изготвен грижливо и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията, като същевременно позволява да се проследи цялостното провеждане на експерименталните изследвания и изведените заключения.

11. Критични забележки и препоръки

Критични бележки по същество нямам, а по-скоро някои общи наблюдения и бележки във връзка с изясняване на детайли от изложението:

Струва ми се, че обзорът щеше да спечели ако бе по-тясно фокусиран върху електрохимични и биоелектрохимични сензорни електроди за определяне на водороден пероксид и катехоламини. Един по-насочен преглед на литературата, посветена на сензори за допамин и епинефрин на базата на модифицирани с лакказа електроди и на такива модифицирани със злато и лакказа, би дал възможност да се коментират конкретните механизми на детектиране на изследваните аналити и да се разграничат ясно изследванията на докторантката в тази област. По отношение на втората задача, насочване към разработените

досега нанокompозити от g-C₃N₄ и метални оксиди и техните електрохимични и сензорни приложения би послужило да се открият по-добре пионерни приноси на настоящата дисертация.

Бележки във връзка с изясняване на детайли от изложението:

(а) еквивалентните схеми (Фиг. 3 В), използвани за интерпретация на данните от електрохимичния импеданс, са различни за „чистия“ стъклевъглероден електрод и за този, модифициран със злато; варбурговият импеданс, макар и коментиран в текста, не е включен в еквивалентната схема, съответстваща на стъклевъглероден електрод;

(б) с оглед на разбирането на ролята на лакказата би било полезно да се уточнят химическите форми на окислената и редуцираната форма на допамин и L-епинефрин, в механизма, показан на стр. 67 от дисертацията;

(в) изследванията по окисление на катехоламини са извършени при постоянна стойност на рН (рН 4) без да е споменато какво определя работа в тези условия;

(г) разликата в каталитичните токове, измерени в отсъствие и присъствие на каталаза (фиг. 37), е интерпретирана в тесен концентрационен интервал (до около 4.5 mM водороден пероксид), макар че експериментът е проведен при концентрации до 10 mM (фиг.36).

Накрая, има и някои чисто технически пропуски, например, мерните единици за тока и концентрацията в регресионното уравнение (стр. 88) вероятно са съответно [А] и [mol], а не [nA] и [mmol], регресионното уравнение, съответстващо на данните от фиг. 28, не е показано в текста и др.

Тези бележки не намаляват значимостта на представените изследвания и техните оригинални приноси.

12. Лични впечатления

Нямам лични впечатления от докторантката.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Считам, че разработените в дисертационния труд модифицирани електроди откриват перспектива за изследване на приложимостта им като електрохимични сензори и за други вещества. Например, електродът, модифициран с Co-g-C₃N₄ би могъл да се окаже подходящ за определяне на допамин или на фенолни съединения като бисфенол А, октилфенол и др. Пионерният подход за електрохимичното определяне на ензимна активност, изпробван в случая на имобилизирана каталаза, би могъл вероятно да се оптимизира по отношение на имобилизацията на ензима или да се приложи в разтвор на каталаза. Този нетрадиционен подход би могъл да бъде полезен и за изследване на активността на други ензими.

След оценка на подадената патентна заявка вероятно ще стане възможна по-нататъшна реализация на електрохимичния метод за оценка на пероксидното число в различни сфери на хранителната и козметичната промишленост, за които качеството на използваните растителни масла е от съществено значение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд показва, че докторантката Мария Пимпилова притежава задълбочени знания и експериментални умения по научна специалност *Физикохимия* като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и *предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“* на Мария Генова Пимпилова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма *Физикохимия*.

29.03.2024 г.

Рецензент:

/проф. дхн Весела Цакова-Станчева/