

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

**ÎNDEPĂRTAREA OXIDATIVĂ A UNOR INHIBITORI
AI PROCESULUI DE AMPLIFICARE A ADN-ULUI**

REZUMAT

Doctorand,

PÎRLEA SORINA

Conducător de doctorat,

Profesor Dr. DUMITRU OANCEA

2017

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	3
I.1. IDENTIFICAREA DE PERSOANE PRIN AMPRENTA GENETICĂ	3
I.1.1. Importanța amprente genetice	3
I.1.2. Procesul de amplificare PCR	5
I.1.3. Electroforeza capilară – oglinda amplificării PCR (eficientă sau eșuată).....	8
I.1.4. Inhibitori ai procesului de amplificare PCR.....	9
I.2. METODE DE DEGRADARE A COLORANȚILOR TEXTILI, POSIBILI INHIBITORI AI REACȚIEI PCR	18
I.2.1. Metode fizice.....	20
I.2.2. Metode chimice.....	21
I.2.3. Metode biologice.....	24
I.2.4. Metode electrochimice	25
I.2.5. Degradarea coloranților textili cu permanganat de potasiu.....	27
I.2.6. Oxidarea cu permanganat de potasiu – mecanisme	28
II. PARTEA ORIGINALĂ.....	32
INTRODUCERE.....	32
MATERIALE ȘI METODE.....	33
II.1. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A UNOR COLORANȚI TEXTILI.....	36
Obiective	36
II.1.1. Testarea unor metode de degradare oxidativă a unor coloranți textili în condiții compatibile cu identificarea ADN-ului.....	36
II.1.2. Studiul degradării oxidative a β CuPcS4 cu KMnO_4 în mediu bazic	47
Concluzii	71
II.2. TESTAREA EFECTULUI INHIBITOR AL PERMANGANATULUI DE POTASIU ȘI AL UNOR COLORANȚI TEXTILI ASUPRA PROCESULUI DE AMPLIFICARE ADN PRIN METODA DE CUANTIFICARE REAL-TIME PCR.....	72
Obiective	72
II.2.1. Testarea efectului inhibitor al permanganatului de potasiu și al coloranților textili studiați la capitolul II.1, prin metoda Real-Time PCR cu kitul Investigator Quantiplex.....	73
Concluzii	81
II.2.2. Testarea efectului inhibitor al coloranților studiați după oxidarea acestora cu permanganat de potasiu în mediu bazic la 56 °C prin metoda Real-Time PCR cu kitul Investigator Quantiplex.....	82
Concluzii	86
II.3. IDENTIFICAREA ADN DIN PROBE BIOLOGICE CU COLORANȚI DIN DENIM	87
Obiective	87
II.3.1. Identificarea ADN din probe biologice (salivă) tratate cu permanganat de potasiu în prezența ftalocianinelor - β CuPcS4, Cl- α CuPc și β CuPc	88
II.3.2. Identificarea ADN din probe biologice (salivă, sânge, celule epiteliale) fixate pe denim.....	103
Concluzii	113
CONCLUZII GENERALE	114
ANEXE	117
BIBLIOGRAFIE	129
LISTĂ DE ABREVIERI.....	136

INTRODUCERE

În condițiile în care identificarea ADN-ului din probe biologice prelevate de pe materiale textile (în special denim) poate fi îngreunată de prezența coloranților în mediul de extracție, găsirea unei metode de degradare a coloranților este de mare interes. Majoritatea metodelor de oxidare avansată utilizate în industrie se desfășoară însă în condiții de pH acid, care duce și la degradarea ADN-ului [1], făcând imposibilă identificarea ulterioară a acestuia.

Ca urmare au fost testate câteva metode de oxidare enzimatică/chimică/electrochimică care au loc în mediu neutru sau bazic astfel încât să nu fie afectată structura ADN-ului. După găsirea metodei cele mai eficiente, aceasta a fost testată pe mai mulți coloranți textili și pe mai multe materiale de tip denim pentru a verifica eficiența metodei.

De mare ajutor a fost cuantificarea prin metoda Real-Time PCR, care, de câțiva ani, funcționează de kitul de cuantificare utilizat, oferă posibilitatea identificării probelor biologice cu inhibitori [2]. Astfel, coloranții utilizați au putut fi testați pentru efectul lor inhibitor prin această metodă. De asemenea, după oxidarea lor prin metoda considerată cea mai eficientă, au putut fi testați din nou pentru a se evidenția dacă mai au sau nu efect inhibitor asupra reacției de amplificare în lanț (PCR).

Mai departe, funcție de rezultatele obținute, metoda s-a aplicat pe probe biologice în prezența coloranților cu efect inhibitor și ulterior, pe probe biologice depuse pe denim, așa cum ajung de obicei în laboratoarele de analize genetice pentru identificări de persoane pe baza ADN-ului.

Colorantul utilizat pentru studiile preliminare a fost o ftalocianină tetrasulfonată de cupru: Heliogen blue A. Acesta a fost ales deoarece face parte dintr-o clasă de coloranți foarte rezistenți la degradare și, de asemenea, se leagă de ADN, fiind astfel un inhibitor în procesul de identificare a ADN-ului [3].

Ftalocianinele, datorită stabilității lor fizice și chimice, fiind insolubile în apă și în majoritatea solvenților [4], sunt coloranți puternici utilizați în multe domenii precum fabricarea cernelurilor, pictură, colorarea textilelor, a plasticelor, a ambalajelor pentru mâncare [5], ca semiconductori, în industria calculatoarelor [6] etc. Aceste substanțe sunt folosite de asemenea și la colorarea textilelor pentru nuanțele de albastru și verde, în special a denimului pentru pantalonii tip blue jeans, obiecte vestimentare aproape indispensabile în rândul oamenilor din lumea întreagă [7]. Mai târziu s-a descoperit că ftalocianinele sunt capabile să formeze legături cu molecula de ADN mono- și bicatenar [8], fiind astfel testate ca fotosensibilizatori în terapia cancerului [9]. Relativ recent s-a propus utilizarea lor ca medicamente datorită efectelor lor antitumorale [10].

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

Reacția polimerazică în lanț (PCR) este un proces enzimatic prin care anumite secvențe ADN de interes sunt replicate (multiplicate) de 28-34 ori, generându-se cca. un bilion (10^9) copii [11]. Această reacție de multiplicare a regiunilor ADN țintă este extrem de importantă în obținerea unei cantități suficiente de ADN pentru determinarea de identificări pe bază de profile genetice. De aceea în această etapă este foarte importantă atât cantitatea inițială de ADN cât și calitatea acestuia respectiv lipsa inhibitorilor PCR sau a ADN-ului degradat în vederea obținerii unei multiplicări eficiente.

Inhibitorii procesului de amplificare PCR cunoscuți includ hemul din sânge [12], collagenul din țesuturi [13], acidul humic din sol și plante [14], coloranții din denim [15], melanina din păr și piele [16], ionii de calciu din lapte și oase [17] etc. În afară de indigo, ftalocianinele nesubstituie împreună cu ftalocianinele de cupru (II) mono- și polisulfonate sunt utilizate frecvent ca pigmenți de bază pentru denim (reactivul Blue 15, reactivul Blue 21 [18], Reactivul Blue 38 [19] și C.I. Direct Blue 199 [20]).

Aceste substanțe inhibitoare pot reacționa cu acizii nucleici în timpul extracției, pot degrada sau modifica secvențele de ADN țintă, pot interfera cu primerii din mediul de reacție PCR, pot degrada, altera sau inhiba polimeraza și nu în ultimul rând pot interfera cu proba sau cu fluoroforii acesteia. Inhibitorii pot fi depistați prin metoda Real-Time PCR care, în paralel, cuantifică ADN-ul existent în probă, metodă utilizată și în această cercetare [21].

Izolarea ADN-ului este prima etapă importantă în analizele probelor criminalistice și a celor medicale. Principalele metode de extracție a ADN-ului, utilizate de toate laboratoarele în domeniu, sunt cele manuale - metoda organică cu fenol-cloroform, metoda chelex și metoda cu hârtie FTA - și tehnicile de extracție în fază solidă (pe membrane de silice sau cu particule magnetice de silice) care pot funcționa și manual și automat [11, 22].

Degradarea coloranților textili, care pot fi inhibitori ai reacției PCR, se poate realiza prin diferite metode: fizice, chimice, biologice și electrochimice [23].

II. PARTEA ORIGINALĂ

Inițial s-a testat efectul inhibitor asupra reacției PCR, al mai multor coloranți utilizați în industria textilă: ftalocianinici, azoici, indigoizi și trifenilmetanici. Efectul inhibitor a fost verificat în etapa de cuantificare a ADN-ului cu ajutorul metodei Real-Time PCR, utilizând kitul Investigator Quantiplex la instrumentul Q Rotor-Gene [24]. S-a determinat parametrul cycle threshold (C_T) pentru probe de ADN/colorant și din valorile acestuia obținute pe canalul galben al instrumentului s-a constatat că beta-ftalocianina de cupru tetrasulfonată (βCuPcS_4) are cel mai mare efect inhibitor, urmată de betaftalocianina de cupru (βCuPc) și fucsină. Dealtfel ftalocianinele sunt coloranți deosebit de rezistenți la degradare și sunt practic insolubili în apă și în majoritatea solvenților. În cele din urmă coloranții ftalocianinici au fost solubilizați în mediu apos în prezența unui surfactant neionic alchil-poliglicozidic (APG), prin agitare continuă timp de două ore.

Următorul obiectiv a fost elaborarea unei metode de îndepărtare a ftalocianinelor din soluții în condiții compatibile cu extracția ADN-ului în prezența rășinii chelatoare chelex (la pH bazic și la temperatură de 55-56 °C), fără modificarea structurii ADN-ului dublu catenar. S-a utilizat inițial oxidarea enzimatică cu lacază și apoi cu peroxidază, fără să se observe o scădere semnificativă a concentrației de ftalocianină testată. Apoi s-a încercat îndepărtarea βCuPcS_4 prin electroliză în mediu acid, bazic și neutru (cu sulfat de potasiu). Degradarea oxidativă a fost urmărită calitativ prin decolorarea soluției.

S-a urmărit electroliza timp de minim 2 ore într-o celulă cu electrozi de inox, cu determinarea absorbantei soluției de la anod la diferite intervale de timp. În mediu acid, în prezența acidului sulfuric se obține un grad de decolorare de 89 % la 90 minute. Vizual, s-a observat schimbarea culorii de la albastru la verde apoi orange, cu formare de precipitat orange închis și decolorarea supernatantului după chiar 55 min. În mediu bazic, în prezență de NaOH, reacția decurge mult mai lent.

Pentru mediu neutru, s-a introdus în celula de electroliză o soluție de 0,05 % K_2SO_4 . S-a urmărit electroliza timp de 195 minute, cu măsurarea absorbantei produsului de electroliză din compartimentul anodic din 15 în 15 minute. Decolorarea are loc în aproximativ 2 ore, cu un grad de decolorare de 90%. Întrucât pH-ul soluției de electroliză cu sulfat de potasiu scade continuu de la 6,5 până la 1,5, s-a încercat ajustarea acestuia în timpul electrolizei cu o soluție de NaOH 1M, treptat, prin picurare, pentru menținerea unui pH bazic, potrivit pentru aplicațiile de interes (îndepărtarea ftalocianinei din probe biologice în etapa de extracție a ADN-ului). Rezultatele sunt expuse în figura II.1. Se observă că maximele celor două picuri sunt de data aceasta înregistrate la 627 nm respectiv 719 nm. Formarea precipitatului orange închis și decolorarea

vizibilă a soluției din compartimentul anodic, împreună cu scăderea maximă a absorbânței ftalocianinei se înregistrează la 150 minute.

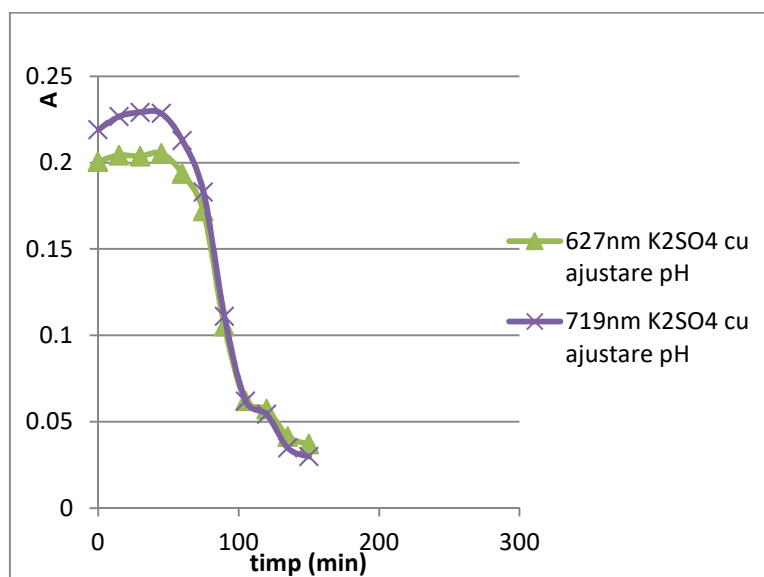


Figura II.1. Degradarea electrochimică a βCuPcS_4 cu sulfat de potasiu, cu ajustarea continuă a pH-ului (bazic).

Se observă că are loc decolorarea aproape totală în 150 minute. În prima parte creșterea absorbânței poate fi atribuită formării unui intermediar care absoarbe la aceeași lungime de undă ca și ftalocianina.

Metoda a fost aplicată cu succes și pe o soluție de colorant obținută din 5 cm² denim albastru închis mărunțit, dizolvat în APG. Din spectrul inițial al soluției s-a obținut o absorbânță maximă la 660 nm care corespunde colorantului indigo. Reacția a fost urmărită timp de 6,5 h, cu determinări ale absorbânței produsului din 15 în 15 min.

Pentru determinarea constantei de viteză, respectiv a gradului de decolorare corespunzătoare βCuPcS_4 prin electroliză, a fost aleasă lungimea de undă de 718 nm, lungime de undă la care au fost realizate și prelucrările prin alte metode oxidative.

Se observă că decolorarea ftalocianinei are loc în maxim două ore. Din datele absorbânță în funcție de timp a fost estimată constanta de viteză de ordin aparent I prin fitarea ecuației rezultate pe datele experimentale.

Rezultatele arată că ambele tipuri de coloranți pot fi degradați prin electroliză, cu menținerea unui pH bazic.

Următoarea metodă oxidativă testată a fost cu KMnO_4 în mediu bazic. Aceasta s-a dovedit a fi cea mai eficientă și cea mai fezabilă în îndepărtarea ftalocianinelor și a altor coloranți concomitent cu izolarea ADN-ului din probe biologice. Astfel, s-a studiat degradarea oxidativă a βCuPcS_4 cu KMnO_4 în mediu bazic. Pentru aceasta s-au format amestecuri de soluții din ftalocianine (între 1,8 mg/L și 30 mg/L), permanganat de potasiu în exces (între 0,4 mM și 12 mM) și hidroxid de sodiu (între 30 mM și 100 mM) și au fost supuse reacției timp de cel puțin 7 ore, la temperaturi cuprinse între 40 și 70 °C și pH 10-12. Amestecurile au fost analizate spectrofotometric la lungimi de undă cuprinse între 200 și 900 nm, la intervale de 15 minute. În timpul reacției culoarea soluției se schimbă de la albastru la verde, apoi apare un precipitat verde și soluția devine galben deschis până la incolor. Timpul necesar decolorării complete a fost între 4 și 24 de ore, în funcție de concentrațiile reactanților. Analizele cinetice au fost efectuate la 714 nm deoarece la 615 nm ar putea fi câteva interferențe datorită formării ionului manganat (MnO_4^{2-}) la 608 nm pe parcursul reacției [25].

Curbele cinetice extinse arată o creștere a absorbantei, urmată de o descreștere exponențială. Culoarea este de asemenea mai intensă în perioada creșterii absorbantei.

În experimentele noastre valoarea pH-ului a variat între 10 și 12 astfel că putem considera că permanganatul se reduce formând toate stările de oxidare ale manganului - Mn(VI), Mn(V) și Mn(IV) [26]. Putem presupune că reacția are loc în cel puțin două etape consecutive, cu formarea unui intermediar stabil care are o culoare similară cu βCuPcS4 .

Reacția βCuPcS4 cu permanganat de potasiu în mediu alcalin este o reacție complexă fiind posibilă o varietate de mecanisme în care oxidarea are loc prin intermediul a unu sau doi electroni. Reacția nu poate fi simplificată la două etape consecutive dar forma curbelor $A = f(t)$ poate fi explicată prin formarea unui produs intermediar care absoarbe lumina la aceeași lungime de undă cu βCuPcS4 .

Un parametru important pentru degradarea coloranților este gradul de decolorare (D %) calculat ca:

$$D(\%) = \frac{A_{\max} - A_{\text{fin}}}{A_{\max}} \cdot 100$$
, unde $A_{\max}$ și A_{fin} reprezintă valorile absorbantei maxime și celei finale (la timpul stabilit).

S-a studiat efectul concentrației de permanganat, de hidroxid de sodiu, de ftalocianină precum și efectul temperaturii asupra degradării βCuPcS4 și s-au stabilit astfel cei mai buni parametri ai procesului oxidativ: concentrație ftalocianină (18 mg/L), KMnO_4 (7,6 mM) și NaOH (0,066 M), la 56 °C – temperatura la care are loc izolarea ADN-ului din probe (figura II.2). În aceste condiții se atinge un grad de decolorare de peste 90% în 4 ore [27].

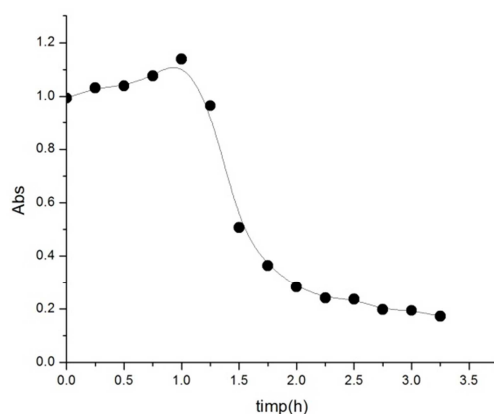


Figura II.2 – Curbă cinetică extinsă pentru degradarea βCuPcS4 la $[\text{KMnO}_4] = 7,6 \text{ mM}$, $[\beta\text{CuPcS4}] = 18 \text{ mg/L}$ și $[\text{NaOH}] = 0,066 \text{ M}$ la 56 °C.

Pentru explicarea creșterii absorbantei pe porțiunea inițială, a fost utilizat un model cinetic de două reacții singulare consecutive, din care a fost obținută o ecuație cinetică de forma absorbantă totală în funcție de timp care explică forma curbelor experimentale obținute:



Pornind de la evoluția în timp a concentrațiilor de reactant și intermediar (c_A și c_B) și presupunând că atât reactantul, cât și intermediarul au o absorbantă semnificativă (A_A și A_B) la aceeași lungime de undă, absorbanta totală măsurată (A) este dată de relația:

$$A = A_A + A_B = \epsilon_A c_A l + \epsilon_B c_B l \quad (2)$$

unde ϵ_j este absorbția molară a componentului j și l este lungimea drumului optic.

Se obține în final:

$$A = A_A^0 e^{-k_1 t} + \frac{\epsilon_B l c_A^0 k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3)$$

S-au estimat parametrii cinetici conform acestui model și s-a observat o bună concordanță între datele experimentale și modelul fitat (valorile coeficientului de determinare fiind cuprinse între 0,936 și 0,987).

S-au analizat produșii de reacție prin spectrometrie FTIR și spectrometrie de fluorescență cu raze X și s-a ajuns la concluzia că precipitatul poate conține MnO_2 și rest de ftalocianină iar faza apoasă (de interes pentru aplicațiile noastre) nu mai conține ioni de Cu și Mn.

Metoda de degradare cu KMnO_4 în mediu bazic a fost testată atât în condițiile înlocuirii NaOH cu soluție chelex 5% de pH 11, cât și pe alți coloranți din clase diferite. S-au utilizat aceleași condiții de reacție stabilite anterior ca fiind optime și s-a urmărit reacția timp de 150 minute. Metoda este eficientă pentru toate tipurile de coloranți, obținându-se grade de decolorare cuprinse între 41 și 90% după 60 minute de reacție.

Mai departe, coloranții oxidați cu KMnO_4 în mediu bazic au fost din nou testați pentru efectul inhibitor asupra reacției de amplificare PCR, prin metoda Real Time PCR, urmărindu-se valorile C_T pe canalul galben al instrumentului de măsurare (Q Rotor Gene). S-a constatat că niciunul nu mai avea valoare C_T compatibilă cu efect inhibitor PCR (> 31). De asemenea, a fost investigat efectul KMnO_4 ca posibil inhibitor în aceleași condiții, demonstrându-se că nu are niciun efect asupra reacției PCR.

Următorul obiectiv a fost aplicarea acestei metode pe probe biologice cu ftalocianine și alți coloranți din denim. S-au testat inițial probe de salivă, de concentrație cunoscută, de la persoane cu profil ADN cunoscut, amestecate cu trei ftalocianine: βCuPcS_4 , βCuPc și $\text{Cl-}\alpha\text{CuPc}$. Conform rezultatelor obținute, expuse în tabelul II.1, metoda a avut succes în special pentru probele cu ftalocianine cu efect inhibitor oxidate cu KMnO_4 [28].

Proba ADN	Cantitate ADN (ng/ μL)	Valoare C_T	Cantitate extract utilizat (μL)	Profil genetic complet? / (număr de markeri genetici)	Înălțimea medie a picurilor
Salivă + βCuPcS_4 fără KMnO_4	0,161	32,4	6	Nu (5)	354
Salivă + βCuPcS_4 + KMnO_4	0,087	30,2	9,5	Da (16)	5345
Salivă + βCuPc fără KMnO_4	0,032	32,0	9,5	Nu (12)	323
Salivă + βCuPc + KMnO_4	0,145	29,9	7	Da (16)	1076
Salivă + $\text{Cl-}\alpha\text{CuPc}$ fără KMnO_4	0,170	30,6	6	Da (16)	1223
Salivă + $\text{Cl-}\alpha\text{CuPc}$ + KMnO_4	0,226	30,5	4,5	Da (16)	1343

Tabelul nr. II.1. – Rezultatele obținute din analizele genetice ale probelor biologice amestecate cu ftalocianine.

Apoi metoda a fost aplicată cu succes și pe probe biologice (sânge, salivă, celule epiteliale) fixate pe denim albastru închis. S-au făcut testări și pentru aceleași tipuri de probe fixate pe denim albastru deschis dar fără mari diferențe între rezultatele obținute din probele biologice tratate cu permanganat și cele fără permanganat, datorită, probabil, cantității scăzute de colorant din denim. Totuși, în cazul celulelor epiteliale fixate pe denim albastru deschis, s-a

remarcat o amplificarea eşuată, conform figurii II.3, cauzată de doi factori: cantitate insuficientă de ADN matrice și prezența inhibitorilor. În figura II.4. sunt prezentate electroforeramele corespunzătoare probei biologice de referință (amplificare reușită) pentru comparații.

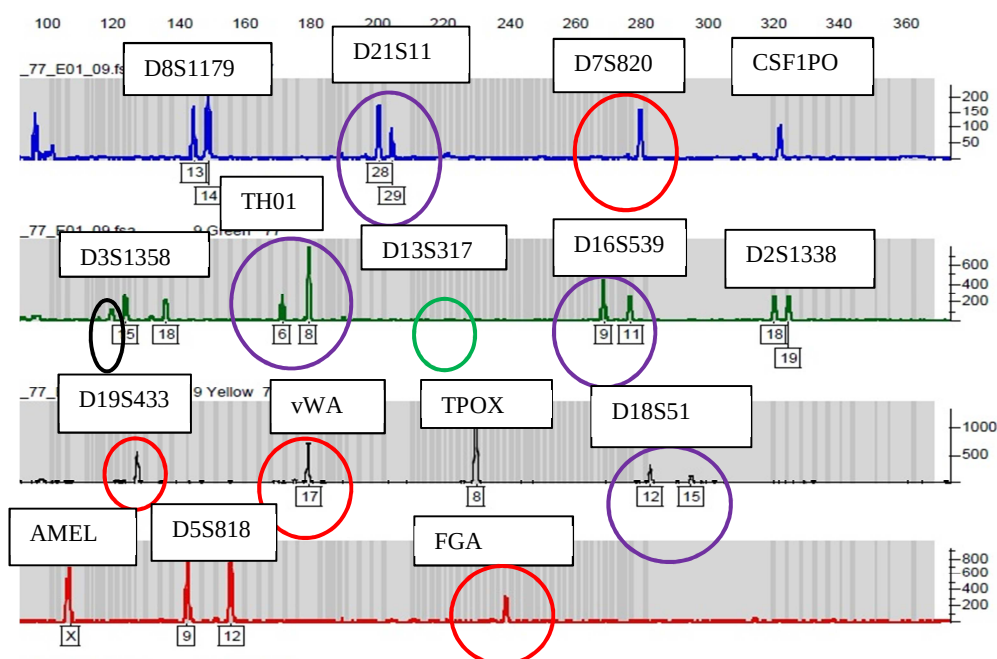


Figura II.3 - Electroforeramele pentru proba biologică (celule epiteliale) depusă pe denim albastru deschis, netratată cu KMnO_4 . **Amplificare eşuată** a probei: 4 loci fals homozigoți (marcați cu roșu), 4 loci cu dezechilibru heterozigot (marcați cu violet), o alelă drop-out (marcată cu verde) și un produs stutter cu înălțime de alelă (marcat cu negru) - rezultate care nu pot fi luate în considerare pentru identificare ADN.

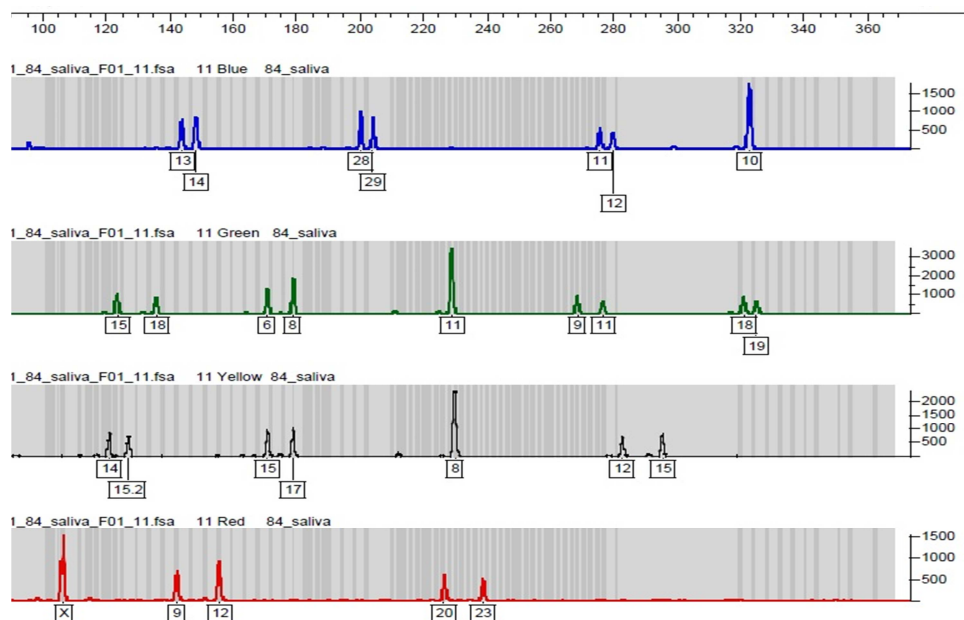


Figura II.4. Electroforeramele probei biologice de referință, cu profil genetic real și complet, necesară pentru comparații.

În concluzie, metoda de oxidare a inhibitorilor PCR din categoria coloranți textili cu permanganat de potasiu este eficientă; efectul inhibitor al coloranților textili poate fi înlăturat

chiar și prin metoda de extracție convențională Chelex, fără alte etape de purificare, prin oxidarea acestora cu permanganat de potasiu, simultan cu izolarea ADN-ului. Permanganatul de potasiu nu afectează integritatea moleculelor de ADN. Reducerea cantității de colorant textil se poate urmări cu ochiul liber prin dispariția în timp a culorii. ADN-ul nu se degradează dacă stă mai mult timp la 56 °C. În plus, permanganatul de potasiu poate fi adăugat suplimentar, cu prelungirea timpului de incubare, până la dispariția vizibilă a culorii supernatantului care conține moleculele de ADN. Acest sistem chelex/permanganat este mai convenabil din punct de vedere economic și poate mai eficient pentru probele biologice fixate pe materiale textile decât alte proceduri mai scumpe și de durată mai mare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

-
- [1] P. Hermann, E. Frederick The role of the AT pairs in the acid denaturation of DNA, *Nucleic Acids Research* (1977), 4 (8): 2939-2947.
 - [2] S.B. Seo, H.Y. Lee, A.H. Zhang, H.Y. Kim, D.H. Shin, S.D. Lee, Effects of humic acid on DNA quantification with Quantifiler human DNA Quantification kit and short tandem repeat amplification efficiency, *Int. J. Legal Medicine* (2012), 126, 961-968.
 - [3] H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi and N. Sugimoto, Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications, *Chem. Commun.*, (2012), 48, 6203–6216
 - [4] A. Heinfling, M. Bergbauer, U. Szewzyk, Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (1997), 48 (2), 261-266.
 - [5] E. Marechal, Polymeric dyes — synthesis, properties and uses. *Progress in Organic Coatings*, (1982), 10 (3), 251-287.
 - [6] H. Cao, W. He, Y. Mao, X. Lin, K. Ishikawa, J.H. Dickerson, W.P. Hess, Recent progress in degradation and stabilization of organic solar cells. *Journal of Power Sources*, (2014), 264, 168-183.
 - [7] M. Sanchez, Dyeing of denim yarns with non-indigo dyes. In: Paul R (edition) *Denim. Woodhead Publishing*, (2015), 5 , 107-157.
 - [8] C. Uslan, S.B. Şebnem, Synthesis of novel DNA-interacting phthalocyanines. *Dyes and Pigments*, (2012), 94 (1), 127-135.
 - [9] C-K Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong K, Y.H. Seo, W.D. Jang, C.R. Park, S.Y. Park, S. Kim, I.C. Kwon IC, Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer, *Cancer Letters* (2013), 334 (2), 176-187.
 - [10] C-K Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong K, Y.H. Seo, W.D. Jang, C.R. Park, S.Y. Park, S. Kim, I.C. Kwon IC, Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer, *Cancer Letters* (2013), 334 (2), 176-187.
 - [11] J. M. Butler, Fundamentals of Forensic DNA Typing, *Academic Press*, USA, (2009).
 - [12] A. T. Hall, A. M. Zovanyi, D.R. Christensen, J.W. Koehler, T. Devins Minogue, Evaluation of Inhibitor-Resistant Real-Time PCR Methods for Diagnostics in Clinical and Environmental Samples, *PLoS ONE*, (2013), 8 (9), e73845.
 - [13] C.H. Kim *et al.* Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, (2001), 84, 74–83.
 - [14] S. Schmedes, P. Marshall, J. King, B. Budowle, Effective removal of co-purified inhibitors from extracted DNA samples using synchronous coefficient of drag alteration (SCODA) technology, *Int J Legal Med*, (2013), 127, 749-755.
 - [15] R. Alaeddini, Forensic implications of PCR inhibition—A review, *Forensic Science International: Genetics*, (2012), 6, 297-305.
 - [16] L. Eckhart *et al.* Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and

inhibits its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 271, 726–30.

[17] H. A. Powell *et al.* Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* (1994), 18, 59–61.

[18] M.C. Silva, A.D. Corrêa, M.T.S.P. Amorim, P. Parpot, J.A. Torres, P.M.B. Chagas, Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2012), 77, 9–14.

[19] A. Heinfling, M. Bergbauer, U. Szewzyk, Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*, *Appl Microbiol Biotechnol*, (1997), 48, 261–266.

[20] H.-Y. Shu, M.-C. Chang, Decolorization and mineralization of a phthalocyanine dye C.I. Direct Blue 199 using UV/H₂O₂ process, *Journal of Hazardous Materials*, (2005), 125, 96–101.

[21] S.B. Seo, H.Y. Lee, A.H. Zhang, H.Y. Kim, D.H. Shin, S.D. Lee, Effects of humic acid on DNA quantification with Quantifiler human DNA Quantification kit and short tandem repeat amplification efficiency, *Int. J. Legal Medicine* (2012), 126, 961–968.

[22] F. Stanciu, V. Cuțăr, S. Pîrlea, V. Stoian, I.M. Stoian. Population data for Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs in South-East Romania, *Legal Medicine (Tokyo)*, (2010), 12(5), 259–64

[23] W. Azmi, R.K. Sani, U.C. Banerjee, Biodegradation of triphenylmethane dyes, *Microbial Technology*, (1998), 22, 185–191.

[24] Investigator Quantiplex Handbook, *QIAGEN Sample and Assay Technologies*, March (2011).

[25] R.M. Mulla, S.T. Nandibewoor, Mechanistic and spectral investigation of the oxidation of 4-hydroxycoumarin by aqueous alkaline permanganate using the stopped flow technique, *Polyhedron*, (2004), 23 (16), 2507–2513.

[26] S. Dash, S. Patel, B.K. Mishra, Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects, *Tetrahedron* (2009), 65 (4), 707–739.

[27] S. Pîrlea, A. Răducan M. Puiu and D. Oancea, Kinetic insights into mild oxidation of phthalocyanine dyes: potential application in forensic analysis, *Revue Roumaine de Chimie* (2017).

[28] S. Pîrlea, A. Răducan M. Puiu and D. Oancea, Permanganate assisted removal of PCR inhibitors during the DNA CHELEX extraction from stained denim samples, *Int. J. Legal Med.* (2017), 131, 323–331.