

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**NOI BIOSENZORI PE BAZA UNUI
DESIGN RAȚIONAL AL INTERFEȚEI
BIOMOLECULĂ-TRADUCTOR**

**Doctorand,
Lucian-Gabriel Zamfir**

**Conducător doctorat,
Prof. univ. dr. Camelia Bala**

CUPRINS

(numerotarea paginilor este cea din teza de doctorat)

INTRODUCERE	8
PARTEA TEORETICĂ	10
1 Biosenzori	11
1.1 Biosenzori enzimatici	13
1.1.1 Biosenzori cu enzime din clasa colinesterazelor	16
1.1.1.1 Acțiunea biochimică a colinesterazelor	16
1.1.1.2 Mecanismul inhibiției acetilcolinesterazei	17
1.1.1.3 Biosenzori pentru detecția de inhibitori ai acetilcolinesterazei	19
1.2 Imunosenzori	23
1.2.1 Imunosenzori electrochimici	24
1.2.2 Imunosenzori SPR	24
2 Designul interfeței biomoleculă-traductor în biosenzori	27
2.1 Interfață modificată cu particule magnetice	27
2.2 Interfață modificată cu geluri pe bază de lichide ionice	28
3 Compuși de interes analitic	31
3.1 Micotoxine	31
3.2 Pesticide organofosforice	34
3.3 Medicamente de tip carbamat	36
4 Bibliografie	39
PARTEA EXPERIMENTALĂ	52
5 Imunosenzori modificați cu particule magnetice	53
5.1 Principiul de funcționare al imunosenzorului	53
5.2 Materiale și reactivi	53
5.3 Echipamente	54
5.4 Realizarea imunosenzorului	55
5.4.1 Imobilizarea anticorpilor pentru ocratoxina A pe particule magnetice	55
5.4.2 Modificarea suprafeței electrodului de aur	56
5.4.3 Modificarea suprafeței senzorului SPR	57
5.5 Rezultate și discuții	58
5.5.1 Caracterizarea electrochimică a imunosenzorului	58
5.5.1.1 Voltametria ciclică	58
5.5.1.2 Spectroscopia electrochimică de impedanță	59
5.5.2 Caracterizarea imunosenzorului prin SPR	61
5.5.3 Detecția prin spectroscopie electrochimică de impedanță a ocratoxinei A	61
5.5.4 Detecția ocratoxinei A utilizând imunosenzorul SPR	63
5.6 Concluzii	64
5.7 Bibliografie	66
6 Biosenzori cu acetilcolinesterază modificați cu materiale compozite	67
6.1 Principiul detecției pesticidelor organofosforice	67
6.2 Determinarea activității enzimatică a acetilcolinesterazei	68
6.3 Imobilizarea acetilcolinesterazei	71
6.4 Senzori pastă de cărbune modificați cu geluri de IL-MWCNT pentru tiocolină	73
6.4.1 Materiale și reactivi	73
6.4.2 Echipamente	75
6.4.3 Realizarea senzorilor MWCNT/CP, IL-MWCNT/CP și IL/CP	75
6.4.3.1 Prepararea gelului compozit IL-MWCNT	76
6.4.3.2 Prepararea senzorilor CP, MWCNT/CP, IL-MWCNT/CP și IL/CP	78
6.4.4 Rezultate și discuții	79
6.4.4.1 Studii de voltametrie ciclică	79
6.4.4.2 Influența pH-ului soluției de tiocolină asupra potențialului de oxidare	89
6.4.4.3 Studii de spectroscopie electrochimică de impedanță	91
6.4.4.4 Determinări cronoamperometrice	92

6.5	Biosenzori pastă de cărbune modificați cu geluri de IL-MWCNT	94
6.5.1	Rezultate și discuții	95
6.5.1.1	Optimizarea condițiilor de stocare a biosenzorilor	95
6.5.1.2	Optimizarea cantității de acetilcolinesterază imobilizată pe biosenzor	96
6.5.1.3	Studiul efectului IL asupra acetilcolinesterazei imobilizate	98
6.5.1.4	Aplicație. Detecția amperometrică a clorpirifosului	100
6.5.1.5	Studiul de regenerare cu obidoximă a răspunsului biosenzorului	101
6.5.2	Concluzii	106
6.5.3	Bibliografie	108
6.6	Biosenzori serigrafiați modificați cu amestecuri compozite de TCNQ-MWCNT	112
6.6.1	Introducere	112
6.6.2	Materiale și reactivi	113
6.6.3	Echipamente	114
6.6.4	Rezultate și discuții	114
6.6.4.1	Realizarea senzorilor pentru tiocolină MWCNT-TCNQ/SPE	114
6.6.4.2	Caracterizarea amestecurilor compozite MWCNT-TCNQ prin spectroscopie DR-UV-Vis și Raman	115
6.6.4.3	Studiile de voltametrie ciclică	117
6.6.4.4	Studii cronoamperometrice	121
6.6.4.5	Caracterizarea senzorilor TCNQ-MWCNT/SPE prin spectroscopie electrochimică de impedanță	123
6.6.4.6	Studii de voltametrie diferențială cu impulsuri și amperometrie	124
6.6.4.7	Realizarea biosenzorului AChE/MWCNT-TCNQ/SPE	126
6.6.4.8	Optimizarea răspunsului biosenzorului și regenerare cu obidoximă	127
6.6.4.9	Aplicație. Detecția amperometrică a clorpirifosului și a metil-paraoxonului	130
6.6.5	Concluzii	131
6.6.1	Bibliografie	133
6.7	Biosenzori pastă de cărbune modificați cu geluri TTF-TCNQ-IL	134
6.7.1	Materiale și reactivi	134
6.7.2	Echipamente	135
6.7.3	Rezultate și discuții	135
6.7.3.1	Realizarea senzorilor pentru tiocolină	135
6.7.3.2	Caracterizarea gelurilor prin spectroscopie FT-IR și microscopie electronică cu baleiaj	136
6.7.3.3	Studii de voltametrie ciclică	137
6.7.3.4	Studii de spectroscopie electrochimică de impedanță	141
6.7.3.5	Caracterizarea senzorului TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] prin studii amperometrice	143
6.7.3.6	Realizarea biosenzorului AChE/TTF-TCNQ-IL/CP	144
6.7.3.7	Optimizarea răspunsului biosenzorului AChE/TTF-TCNQ-IL/CP	144
6.7.3.8	Aplicație. Detecția amperometrică a neostigminei și eserinei	145
6.7.4	Concluzii	147
6.7.5	Bibliografie	149
7	Concluzii generale	151
8	Lista publicațiilor în domeniul tezei de doctorat	154

(numerotarea tabelor, figurilor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat)

Teza este structurată în două părți principale: PARTEA TEORETICĂ, care descrie datele din literatura de specialitate cu privire la tematicile de cercetare abordate, și PARTEA EXPERIMENTALĂ care prezintă contribuțiile originale.

În primul capitol sunt prezentate aspecte generale referitoare la biosenzorii cu exemplificare pentru cei enzimatici și imunosenzori. În al doilea capitol sunt discutate căile de modificare a designul interfeței biomoleculă-traductor utilizând particule magnetice sau diferite materiale compozite bazate pe nanotuburi de carbon, lichide ionice și mediatori redox. În capitolul trei sunt prezentați compușii care au prezentat interes analitic în teza de doctorat, respectiv: ocratoxina A, pesticidele organofosforice și medicamentele de tip carbamat.

În partea experimentală se prezintă construcția, caracterizarea și stabilirea parametrilor de performanță pentru: imunosenzori impedimetriци și SPR pentru detecția ocratoxinei A modificați cu particule magnetice, senzori electrochimici pentru detecția tiocolinei modificați cu materiale compozite diferite (IL-MWCNT, MWCNT-TCNQ și TTF-TCNQ-IL) și biosenzorii corespunzători, utilizați în detecția de compuși organofosforici sau carbamați.

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat constă în modificarea interfeței biomoleculă-traductor dintr-un biosenzor, cu materiale diferite, simple sau compozite, care să îmbunătățească considerabil caracteristicile de performanță ale acestora.

În dezvoltarea biosenzorilor s-au avut în vedere alegerea unui bioreceptor (anticorp sau enzimă) corespunzător pentru analitul de interes, stabilirea principiilor de realizare a biosenzorilor, elaborarea strategiei pentru designul interfeței traductor – bioreceptor, realizarea și caracterizarea biosenzorilor modificați și detecția compușilor de interes.

Aplicarea conceptului de designul rațional în dezvoltarea de biosenzori modificați cu materiale compozite constă în selectarea de precursori ai unor materiale compozite care prin efectul sinergic generat de acestea să conducă la obținerea de caracteristici de performanță superioare celor asigurate de precursorii.

Prima aplicație descrisă în cadrul părții experimentale constă în utilizarea de particule magnetice funcționalizate pentru dezvoltarea de imunosenzori pentru ocratoxina A (OTA). Particulele magnetice (PM) au fost utilizate ca suport pentru legarea de anticorpi specifici ocratoxinei A și realizarea de imunosenzori impedimetriци și optici. Următoarele aplicații se referă la utilizarea de nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT), lichide ionice cu cation imidazolic (IL) și mediatori electrochimici (TTF, TCNQ) pentru a prepara amestecuri compozite. Materialele obținute, IL-MWCNT, MWCNT-TCNQ și TTF-TCNQ-IL, au fost utilizate la dezvoltarea de senzori electrochimici pentru determinarea tiocolinei (TCh). Iar senzorii pentru tiocolină au fost dezvoltați în biosenzori bazați pe inhibiția acetilcolinesterazei (AChE) pentru detecția de pesticide compuși organofosforici și medicamente de tip carbamat.

5. IMUNOSENZORI MODIFICAȚI CU PARTICULE MAGNETICE

Particulele magnetice permit imobilizarea unui număr mare de anticorpi (Ac) pe suprafața unui senzor și manipularea lor facilă, cu ajutorul unui magnet. Metoda de imobilizare utilizată în pentru realizarea unui imunosenzor pentru OTA a constat în legarea de anticorpi specifici OTA pe suprafața unor PM modificate cu grupări carboxil. Detecția OTA are loc în urma interacției de afinitate dintre Ag-Ac care duce la o variație a rezistenței măsurată de către imunosenzorul impedimetric. Imunosenzorul astfel obținut nu necesită elemente de marcare și poate fi reutilizat.

Imobilizarea anticorpilor anti-OTA pe PM s-a realizat prin formarea de legături covalente între grupările carboxil ale PM și cele amino ale Ac. În acest scop s-a utilizat o carbodiimidă, EDC, pentru activarea grupărilor carboxilice ale PM. Modificarea electrodului de aur necesită mai multe etape, prezentate schematic în Fig. 5-3. Pe un electrod de aur curățat în prealabil, se depune un strat tiolic peste care se adaugă glutaraldehidă și apoi BSA. La final se obține un electrod de aur modificat cu un strat de BSA. Pe suprafața acestuia se fixează Ac-PM obținându-se imunosenzorul pentru OTA.

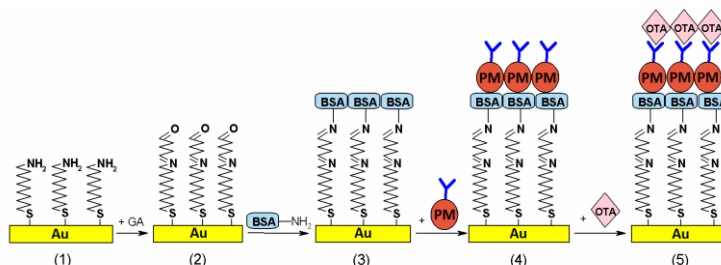


Fig. 5-3. Etapele de realizare a imunosenzorului EIS: (1) Au/TA; (2) Au/TA/GA; (3) Au/TA/GA/BSA; (4) imunosenzor OTA Au/TA/GA/BSA/Ac-PM; (5) detecția OTA.

Fiecare etapele de preparare a imunosenzorului a fost studiată prin voltametria ciclică pe un domeniu de potențial cuprins între $-700 \div +700$ mV (vs SCE), cu o viteză de scanare de 100 mV/s, într-o soluție de 2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1).

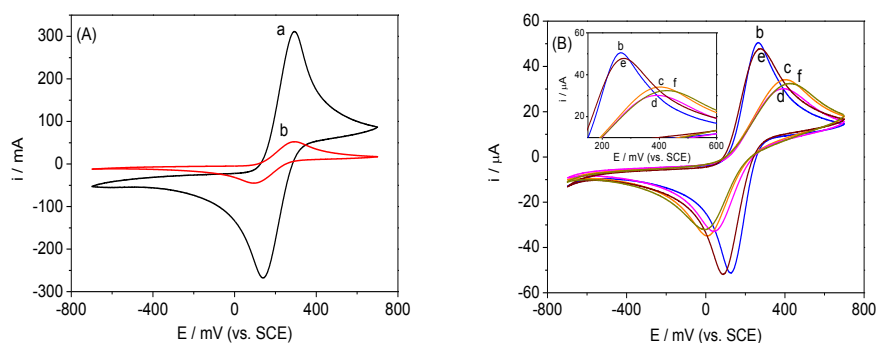


Fig. 5-4. Măsurători de voltametrie ciclică în prezența a 2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pentru electrozii: (A) Au (a) Au; (b) Au/TA; (B). (c) Au/TA/GA; (d) Au/TA/GA/BSA; (e) Au/TA/GA/BSA/Ac-PM - imunosenzorul; (f) imunosenzor + 0.1 ng/mL OTA. ($v_s = 100$ mV/s)

Voltamograma înregistrată pentru electrodul de aur prezintă două picuri reversibile, ceea ce indică absența de impurități de pe electrod (Fig. 5-4.A., curba a), iar cele înregistrate pentru suprafața de aur modificată cu SAM indică faptul că stratul de SAM blochează transferului de electroni la suprafața electrodului. Interacția dintre o soluție de 0.1 ng/mL OTA și stratul de Ac-PM a fost urmată de o scădere a răspunsului faradaic și o creștere a separării între valoarea de potențial a picului catodic și a celui anodic (Fig. 5-4., curba f), ceea ce ne indică faptul că transferul de electroni între $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$ și suprafața electrodului este inhibat.

În studiile de spectroscopie electrochimică de impedanță s-a urmărit variația rezistenței la transferul de electroni de la suprafața electrodului. Fig. 5-5. prezintă curbele Nyquist pentru electrodului de aur nemodificat și pentru cei modificați după fiecare etapă de imobilizare.

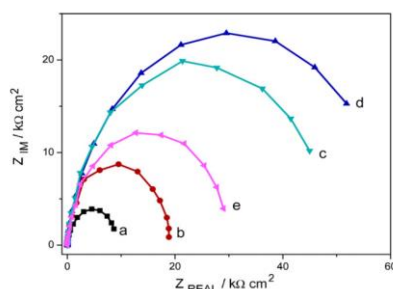


Fig. 5-5. Diagrame Nyquist (Z_{REAL} vs. Z_{IM}) pentru măsurătorile de impedanță corespunzătoare electrozilor: (a) Au; (b) Au/TA; (c) Au/TA/GA; (d) Au/TA/GA/BSA; (e) Au/TA/GA/BSA/Ac-PM: soluție de 2.5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1)

După depunerea BSA, valoarea rezistenței a crescut semnificativ ca urmare a formării unui strat încărcat negativ care acționează ca o barieră electrostatică între suprafața electrodului și anionii $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ din soluție. Nu a fost observată nicio modificare a semnalului după adăugarea soluției de OTA de concentrații diferite, pentru electrodul Au/TA/GA/BSA, ceea ce dovedește că între OTA și suprafața electrodului nu au loc fenomene de adsorbție sau alte interacții nespecifice.

Interacțiile de afinitate dintre Ac și antigen conduc la o creștere a rezistenței corelată cu creșterea a diametrului semicercurilor înregistrate în EIS pentru concentrațiile testate. Creșterea rezistenței la transferul de sarcină, direct proporțională cu logaritmul zecimal al concentrației de OTA, se explică prin faptul că moleculele de OTA legate de anticorpi imobilizați pe suprafața oferă un surplus de sarcini negative. Molecula de OTA are o grupare carboxil și o grupare fenolică ce conferă moleculei de OTA două forme anionice: un monoanion (OTA^-) și un dianion (OTA^{2-}). Diagramele Nyquist corespunzătoare sunt prezentate în Fig. 5-7.A, iar curba de calibrare prezentată în Fig. 5-7.B arată o dependență neliniară a rezistenței la transferul de sarcină (ΔR_2) față de logaritmul concentrației de OTA. Domeniul liniar al imunosenzorului impedimetric este situat între 0.01 - 5 ng/mL OTA. Imunosenzorul impedimetric prezintă o sensibilitate de 26.83 kΩ pe o decadă de concentrație, cu un coeficient de corelare de $R^2 = 0.9676$ și o limită de detecție de 0.01 ng/mL OTA. Pentru 5 măsurători repetate, realizate cu o soluție de OTA de aceeași concentrație, s-a calculat o deviație standard de 4.7%.

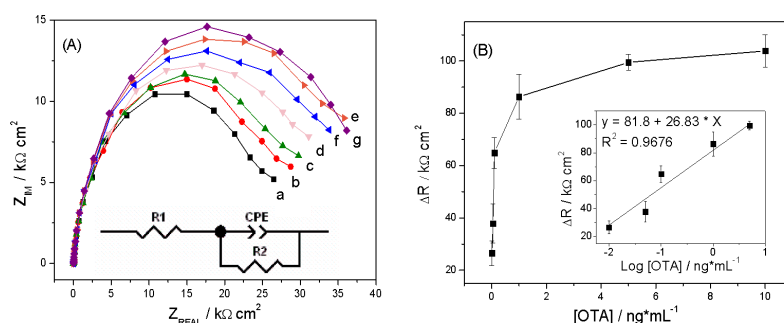


Fig. 5-7. (A) Diagrame Nyquist obținute după incubarea imunosenzorului cu diferite concentrații de OTA: (a) 0 ng/mL; (b) 0.01 ng/mL; (c) 0.05 ng/mL; (d) 0.1 ng/mL; (e) 1 ng/mL; (f) 5 ng/mL; (g) 10 ng/mL (2.5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $E = -400$ mV vs. SCE, $\nu = 100$ mHz - 100 kHz). (B) Curba de calibrare a imunosenzorului (ΔR_2) pentru concentrații de OTA între 0.01 și 10 ng/mL ($n = 5$); figură inserată: dreapta de calibrare pentru imunosenzorul EIS.

Determinările cu imunosenzorul SPR au fost efectuate pe un domeniu de concentrație cuprins între 0.1 și 100 ng/mL OTA. În urma interacțiilor de afinitate dintre OTA și anticorpii imobilizați se observă o creștere a unghiului de rezonanță care este direct proporțională cu concentrația de OTA.

Pentru soluțiile cu concentrație de OTA cuprinse între 1 și 50 ng/mL OTA s-a obținut o dependență liniară $\Delta\theta = f([OTA])$ cu $R^2 = 0.9899$.

Imunosenzorii EIS au fost testați pe probe de vin alb contaminate cu 0.1, 0.5, 1, 2 și 5 ng/mL de OTA, în timp ce biosenzorul SPR a fost testat folosind doar 1, 2, și 5 ng/mL OTA. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute cu kituri ELISA (test cu kit Ridascreen pentru OTA), ca metodă de referință.

Strategia abordată în vederea realizării unui imunosenzor pentru OTA a avut în vedere regenerarea suprafeței imunosenzorului și astfel s-a ales imobilizarea anticorpi specifici pentru OTA pe PM. Imobilizarea Ac-PM are loc ajutorul unui magnetic suprafața electrodului de Au. Interacțiunile nespecifice dintre OTA și suprafața de aur au fost eliminate prin depunerea unui strat de BSA pe electrodul de aur, crescând astfel specificitatea biosenzor. Utilizarea PM pentru imobilizarea Ac permite o imobilizare facilă a OTA, iar detecția nu necesită utilizarea unui marker.

Bibliografie selectivă

- [3] J.J. Monagle, Carbodiimides. III. Conversion of Isocyanates to Carbodiimides. Catalyst Studies, The Journal of Organic Chemistry, 27 (1962) 3851-3855.
- [5] P.R. Perrotta, N.R. Vettorazzi, F.J. Arévalo, A.M. Granero, S.N. Chulze, M.A. Zón, H. Fernández, Electrochemical studies of ochratoxin a mycotoxin at gold electrodes modified with cysteamine self-assembled monolayers. Its ultrasensitive quantification in red wine samples, Electroanalysis, 23 (2011) 1585-1592.
- [14] J. Wu, H. Chu, Z. Mei, Y. Deng, F. Xue, L. Zheng, W. Chen, Ultrasensitive one-step rapid detection of ochratoxin A by the folding-based electrochemical aptasensor, Analytica Chimica Acta, 753 (2012) 27-31.
- [15] X.H. Fu, Surface plasmon resonance immunoassay for ochratoxin a based on nanogold hollow balls with dendritic surface, Analytical Letters, 40 (2007) 2641-2652.

6. BIOSENZORI CU ACETILCOLINESTERAZĂ MODIFICAȚI CU MATERIALE COMPOZITE

Inhibiția AChE de către diferite specii chimice stă la baza dezvoltării de biosenzori pentru detecția de inhibitori. În urma interacției dintre un compus inhibitor și AChE are loc o scădere a activității enzimatică. Gradul de inhibiție al AChE este calculat prin măsurarea activității enzimatică a AChE înainte și după incubarea într-o soluție ce conține compusul inhibitor și se calculează cu formula 1-5.

$$I\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

1-5. Formula de calcul a gradului de inhibiție al unei enzime.

unde: A_0 = activitatea enzimatică inițială, A_1 = activitatea enzimatică după incubare cu inhibitorul și $I\%$ = gradul de inhibiție.

În cazul biosenzorilor bazați pe inhibiție enzimatică, domeniul liniar corespunde unui interval cuprins între 20% și 80% grad de inhibiție, iar limita de detecție este definită drept cantitatea de compus inhibitor ce duce la înregistrarea unui procent de inhibiție de 10%.

Deoarece substratul natural al AChE, acetilcolina, nu generează prin hidroliză un compus electroactiv, biosenzorii amperometrici bazați pe AChE utilizează un substrat sintetic, acetiltiocolina (ATCh). Din reacția de hidroliză enzimatică a ATCh se formează TCh, compus cu o

grupare tiol ce poate fi oxidat electrochimic la ditio-bis-tiocolină. Acțiunea unui compus inhibitor asupra AChE duce la scăderea activității enzimatice, și deci la scăderea concentrației de TCh din soluție. Biosenzorul amperometric bazat pe AChE este imersat într-o soluție de tampon și se măsoară semnalul corespunzător ATCh. Principiul funcționării biosenzorului este prezentat schematic în Fig. 6-1.

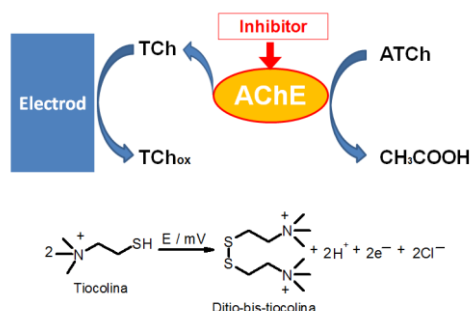


Fig. 6-1. Principiul funcționării biosenzorului monoenzimatic.

Diferența dintre valorile intensității curentului pentru TCh generată enzimatic, înregistrate înainte și după incubarea cu pesticid, este utilizată pentru a calcula gradul de inhibiție corespunzătoare concentrației de inhibitor utilizat.

Metoda de imobilizare a AChE utilizată în toate experimentele constă în înglobarea AChE într-o matrice de tip sol-gel. Porozitatea matricei sol-gel asigură difuzia moleculelor de substrat către situsul catalitic al enzimei.

6.4 Senzori pastă de cărbune modificați cu geluri de IL-MWCNT pentru tiocolină

În această parte experimentală sunt prezentate studiile asupra proprietăților electrochimice ale unor geluri compozite noi bazate pe MWCNT și IL cu cation imidazolic. Senzorii electrochimici pentru TCh dezvoltati în această parte experimentală au la bază un electrod pastă de cărbune care a fost modificați cu geluri compozite IL-MWCNT. Lichidele ionice prezintă conductivitate ionică ridicată și capacitatea de a dispersa CNT. Între cele două componente au loc interacții de tip π - π și π -cation, ce conduc la formarea unui compozit stabil IL-CNT [16].

Geluri noi, pe bază de IL și MWCNT s-au realizat prin amestecarea directă și utilizarea ultrasunetelor pentru a facilita dispersia MWCNT în IL. Lichidele ionice utilizate în experimente electrochimice prezintă un cation imidazolic și diferiți anioni organici sau anorganici. În alegerea acestora s-a avut în vedere studiarea influenței structurii lichidelor ionice asupra proprietăților electrochimice. Designul rațional constă în selectarea de precursori ai materiale compozite care prin efectul sinergic generat să conducă la obținerea de caracteristici superioare celor ale componentelor separate. S-a urmărit combinarea caracteristicilor MWCNT, cum ar fi rezistența mecanică și conductivitatea electrică, cu cele ale IL, cum ar fi conductivitate ionică și capacitate de dispersie a MWCNT. Acestea sunt primele experimente raportate în literatură cu privire la utilizarea de IL-MWCNT pentru detecția TCh.

Senzorii CP, MWCNT/CP, IL-MWCNT/CP și IL/CP au fost caracterizați prin CV, în soluții de TCh de diferite concentrații, măsurătorile efectuându-se în domeniul de potențial -400÷800 mV, cu o viteză de baleiere de 100 mV/s. Rezultate obținute cu IL-MWCNT/CP au fost comparate cu cele obținute cu senzorii modificați cu precursorii gelurilor pentru a pune în evidență efectul sinergic al IL și MWCNT. Pentru determinările de CV a TCh, unul dintre obiectivele modificării senzorilor cu diferite materiale constă în creșterea selectivității, prin atingerea de valori ale

potențialului de oxidare a TCh cât mai scăzute, și creșterea sensibilității prin atingerea unor valori cât mai mari a intensității corespunzătoare picului de oxidare a TCh. Pentru electrozii nemodificați CP, picului de oxidare corespunzător TCh i se atribuie o valoare de potențial de aproximativ +650 mV, iar pentru electrodul modificat cu MWCNT potențialul de oxidare este deplasat spre valori mai mici, de +350 mV. Această scădere a potențialului de oxidare, înregistrată în cazul senzorilor MWCNT/CP (Fig. 6-6.A.) poate fi atribuită proprietăților electrocatalitice și a suprafeței electroactive mari a MWCNT.

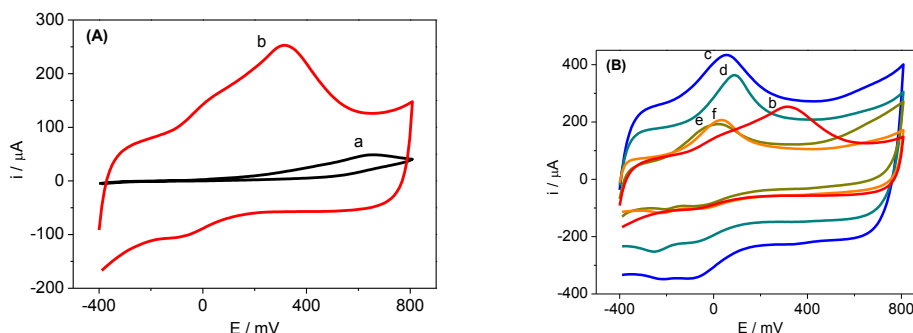


Fig. 6-6. Voltamograme ciclice înregistrate în prezența a 5 mM TCh pentru senzorii: A) CP (a); MWCNT/CP (b); B) [BMIM][BF₄]-MWCNT/CP (c); [EMIM][NTF₂]-MWCNT/CP (d); [EMIM][OTF]-MWCNT/CP (e) și [EMIM][TCB]-MWCNT/CP (f). ($v_s = 100$ mV/s)

În cazul senzorilor modificați cu IL-MWCNT potențialul de oxidare al TCh se află la o valoare și mai scăzută și intensitatea curentului de pic este mai mare. Voltamogramele înregistrate pentru electrozii CP modificați cu geluri cu [BMIM][BF₄], [EMIM][NTF₂], [EMIM][OTF] și [EMIM][TCB] sunt prezentate în Fig. 6-6.B. S-a observat că majoritatea valorilor de potențial pentru senzorii IL-MWCNT/CP se situează sub +100 mV. Valorile scăzute ale potențialului de oxidare a TCh înregistrate cu senzorii IL-MWCNT/CP sunt datorate faptul că gelul poate accelera transferul de electroni datorită interacției electrostatice dintre moleculele de TCh, încărcate negativ la pH = 8 și cationi imidazolici din lichidul ionic. S-a observat că pentru patru tipuri de geluri s-au obținut valori ale sensibilității mai ridicate decât pentru MWCNT/CP, cea mai mare înregistrându-se pentru [BMIM][BF₄]-MWCNT.

Deși MWCNT a arătat o creștere de aproape două ori a sensibilității față de CP, gelurile compozite au prezentat valori mai mari ale sensibilității, remarcându-se electrodul [BMIM][BF₄]-MWCNT/CP. Senzorii modificați cu geluri pe bază de [HMIM][PF₆], [EMIM][NTF₂], [EMIM][PF₆] și [EMIM][FAP] au prezentat sensibilitate scăzută față de TCh. Deoarece gelul [BMIM][BF₄]-MWCNT s-a remarcat prin valoarea cea mai mare a curentului de oxidare a TCh și un potențial scăzut, acesta fost ales pentru efectuarea următoarelor determinări experimentale.

6.5 Biosenzori pastă de cărbune modificați cu geluri de IL-MWCNT

Pentru determinările amperometrice de ATCh calibrările s-au realizat prin metoda adaosurilor succesive pe un domeniu cuprins între 0.1-10 mM ATCh. Detecția ATCh s-a realizat în amperometrie la o valoare de potențial de +50 mV, prin adaosuri succesive de ATCh într-o soluție de PBS ce conține 1 UI de AChE.

S-au efectuat determinări amperometrice pentru biosenzori cu valori diferite ale activității enzimei imobilizate în 5 mM ATCh, înainte și după contactul cu pesticidul clorpirifos. Cantitatea optimă de AChE s-a determinat efectuând determinări ale procentului de inhibiție prin incubare în

soluții de clorpirifos cu concentrații între 10^{-8} și 10^{-6} M. Pentru fiecare valoare de concentrație s-a calculat procentul de inhibiție a activității AChE și valorile sunt reprezentate în Fig. 6-17.

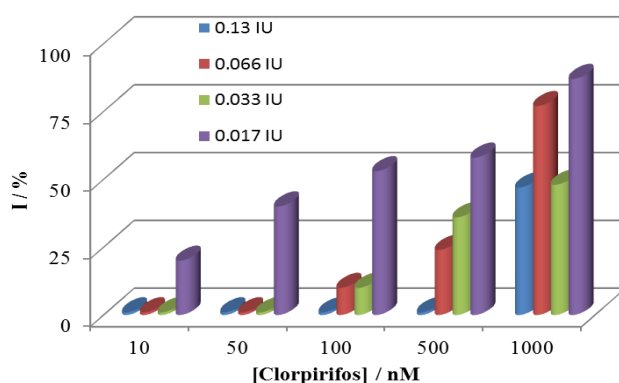


Fig. 6-17. Efectul cantității de enzimă asupra gradului de inhibiție a biosenzorului AChE/[BMIM][BF₄]-MWCNT/CP (AChE 17-130 mUI, E = +50 mV, [ATCh] = 5 mM, pH = 8, T_{incubare} = 15 min.).

Rezultatele obținute arată faptul că o activitate enzimatică de 17 mIU reprezintă o valoare optimă pentru realizarea de determinări de clorpirifos pe baza inhibiției AChE deoarece este valoarea pentru care s-a înregistrat inhibiție pentru 10^{-8} M și 5×10^{-8} M clorpirifos. S-au efectuat determinări de clorpirifos utilizând biosenzorul AChE/[BMIM][BF₄]-MWCNT/CP, pe un domeniu de concentrație de $10^{-8} \div 10^{-6}$ M. Semnalul amperometric s-a înregistrat la un potențial de +50 mV, în prezența a 5 mM ATCh. S-au efectuat determinări pentru optimizarea timpului de incubare pentru o concentrație de 10^{-8} M clorpirifos între 5 și 30 de minute, iar timpul de incubare optim este de 15 minute, valoare raportată și de alți autori [57].

Dreapta de calibrare prezentată în Fig. 6-19. este o reprezentare semi-logaritmică $I\% = \text{Log}[\text{Clorpirifos}]$. Limita de detecție calculată pentru un grad de inhibiție de 10 % este de 4 nM clorpirifos (1.4 ppb).

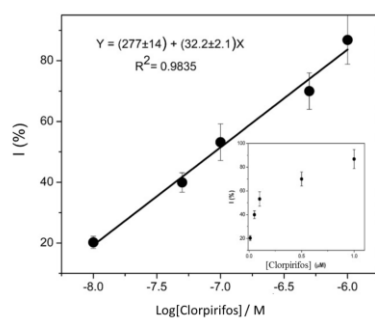


Fig. 6-19. Dreapta de calibrare $I\% = \text{Log}[\text{Clorpirifos}]$ pentru clorpirifos (figură inserată: $I\% = [\text{Clorpirifos}]$). (AChE 17 mIU, E = +50 mV, [ATCh] = 5 mM, pH = 8, n = 5).

Un alt obiectiv l-a reprezentat regenerarea suprafeței biosenzorului. Pesticidele organofosforice inhibă reversibil AChE, aceasta putând fi regenerată cu agenți de reactivare de tip oxima, cum ar fi PAM sau obidoxima. Agenții de reactivare reacționează cu inhibitorul legat covalent de enzimă și-l îndepărtează din situsul activ. Mecanismul de acțiune al obidoximei asupra AChE inhibitate de clorpirifos este prezentat în Fig. 6-21.

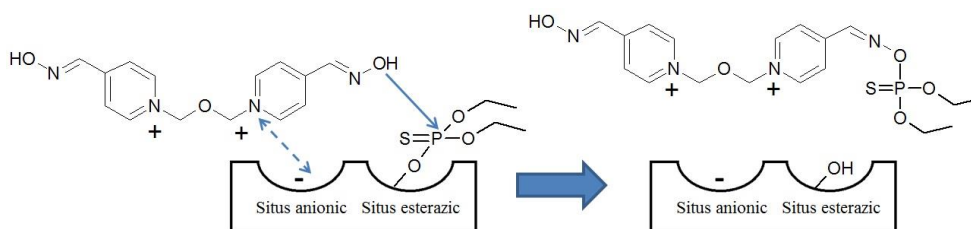


Fig. 6-21. Mecanismul de acțiune al obidoximei asupra AChE inhibitate de clorpirifos.

Capacitatea obidoximei de a regenerare AChE a fost studiată pentru o concentrație de 10 nM clorpirifos. Procentul de inhibiție înregistrat inițial este de 20%. Biosenzorul a fost imersat într-o soluție agitată de obidoximă. S-a observat că un timp de 5 minute este suficient pentru regenerarea totală a activității enzimatică. Pentru obidoximă o concentrația de 0.1 mM este considerată a fi optimă pentru regenerarea enzimei.

Studiile de regenerare efectuate cu obidoximă și PAM pe biosenzori identici incubați în aceeași soluție de clorpirifos au arătat că obidoxima este un agent de reactivare mai eficient decât PAM. Pentru toate experimentele ulterioare implicând inhibitori ai AChE s-a utilizat obidoxima ca agent de reactivare.

În acest capitol s-au realizat și caracterizat senzori pentru detecția TCh bazați pe geluri compozite IL-MWCNT. Senzorul [BMIM][BF₄]-MWCNT/CP, caracterizat printr-o sensibilitate crescută și un potențial relativ scăzut pentru oxidarea TCh, a fost utilizat în dezvoltarea unui biosenzor pentru compuși organofosforici bazat pe AChE. Cantitatea de enzimă imobilizată pe senzorii [BMIM][BF₄]-MWCNT/CP a fost optimizată pentru a se putea înregistra un procent de inhibiție cât mai mare pentru o concentrație mică de clorpirifos. S-a calculat o limită de detecție de 4 nM pentru clorpirifos, obținută cu un biosenzor cu 17 mIU AChE. În această teză de doctorat s-a raportat pentru prima dată utilizarea obidoximei ca agent de reactivare a AChE imobilizate pe un biosenzor.

Bibliografie selectivă

- [14] S. Andreescu, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides, *Analytica Chimica Acta*, 464 (2002) 171-180.
- [16] T. Fukushima, A. Kosaka, Y. Ishimura, T. Yamamoto, T. Takigawa, N. Ishii, T. Aida, Molecular ordering of organic molten salts triggered by single-walled carbon nanotubes, *Science*, 300 (2003) 2072-2074.
- [27] R.T. Kachosangi, M.M. Musameh, I. Abu-Yousef, J.M. Yousef, S.M. Kanan, L. Xiao, S.G. Davies, A. Russell, R.G. Compton, Carbon nanotube-ionic liquid composite sensors and biosensors, *Anal Chem*, 81 (2009) 435-442.
- [29] B.G. Choi, H. Park, T.J. Park, D.H. Kim, S.Y. Lee, W.H. Hong, Development of the electrochemical biosensor for organophosphate chemicals using CNT/ionic liquid bucky gel electrode, *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 672-675.
- [57] D. Du, X. Ye, J. Cai, J. Liu, A. Zhang, Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 2503-2508.

6.5 Biosenzori serigrafiați modificați cu amestecuri compozite de TCNQ-MWCNT

Unul dintre cei mai utilizați mediatori în dezvoltarea de senzori și biosenzori este 7,7,8,8-tetracianochinodimetanul, o moleculă organică acceptoare de electroni, cu proprietăți

electrocatalitice [1]. Până în prezent nu s-a raportat în literatura de specialitate utilizarea de amestecuri de MWCNT și TCNQ pentru modificarea de senzori pentru detecția TCh. S-au preparat trei tipuri de senzori serigrafiați, fiecare modificat cu un material diferit: electrozi modificați cu MWCNT (MWCNT/SPE), cu TCNQ (TCNQ/SPE) și cei modificați cu un compozit MWCNT-TCNQ (MWCNT-TCNQ/SPE).

Compozitului MWCNT-TCNQ a fost caracterizat prin spectroscopie DR-UV-Vis și Raman. Proprietățile acestui compozit au fost comparate cu cele ale precursorilor, MWCNT și TCNQ (Fig. 6-28.A).

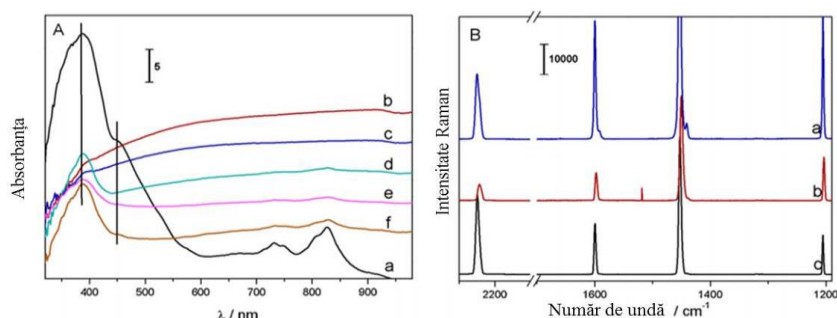


Fig. 6-28. A) Spectrele de absorbție moleculară DR-UV-Vis pentru TCNQ (a), MWCNT (b), MWCNT-TCNQ 1 mM (c), MWCNT-TCNQ 10 mM (d), MWCNT-TCNQ 100 mM (e), și MWCNT-TCNQ 200 mM (f). B) Spectrul Raman pentru TCNQ (a), MWCNT-TCNQ 100 mM (b) și MWCNT-TCNQ 200 mM (c).

Pentru spectrul DR-UV-Vis al MWCNT-TCNQ 1 mM, nu se mai observă banda de la 454 nm din spectrul moleculei neutre de TCNQ atribuită radicalului anionic ($\text{TCNQ}^{\cdot-}$), fapt ce poate fi explicat prin apariția unei interacții între grupările CN ale TCNQ și nucleele aromatice din CNT-uri. În cazul spectrelor Raman (Fig. 6-28.B) pentru amestecul MWCNT-TCNQ 100 mM se observă o deplasare a benzii de vibrație corespunzătoare CN poate fi explicată printr-o interacție a grupărilor CN cu MWCNT. Această deplasare nu mai apare pentru MWCNT-TCNQ 200 mM, dar se observă deplasări pentru benzile corespunzătoare C=C, explicate prin apariția unui proces de transfer de electroni între MWCNT și moleculele TCNQ în stare anionică [8]. Datele obținute în analizele spectrale sugerează două tipuri de organizări supramoleculare în funcție de concentrația de TCNQ, structuri prezentate în Fig. 6-29: concentrații mici de TCNQ (Fig. 6-29.A) și la concentrații mari de TCNQ (Fig. 6-29.B).

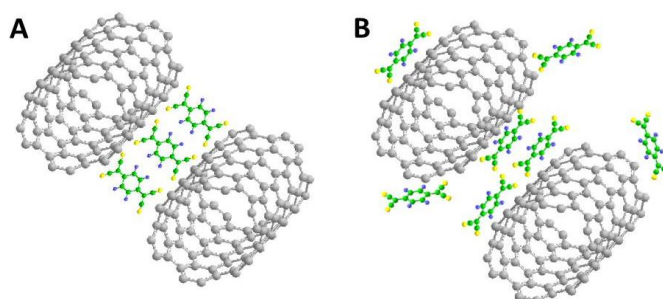


Fig. 6-29. Organizarea supramoleculară a MWCNT-TCNQ la (A) concentrații mici de TCNQ (<1 mM) și (B) la concentrații mari de TCNQ (>10 mM).

Pentru concentrații de TCNQ de 1 până la 10 mM, moleculele de TCNQ se aranjează au grupările CN orientate spre suprafața MWCNT, datorită interacțiilor electrostatice. Pentru

amestecurile MWCNT-TCNQ cu concentrații mici de mediator, moleculele de TCNQ îndeplinesc două funcții: cea de punți între nanotuburile apropiate cu rol în stabilizarea amestecului compozit și asigurarea transferul de electroni între nanotuburi, și cea de acceptori de electroni pentru oxidarea TCh.

Studiile de CV au fost realizate cu următorii senzori: MWCNT/SPE, TCNQ/SPE și MWCNT-TCNQ/SPE. În Fig. 6-31. sunt prezentate voltamogramele ciclice înregistrate în soluție de TCh 5 mM, în tampon fosfat. Se poate observa că potențialul de oxidare al TCh are valori diferite în funcție de senzorul folosit: +450 mV în cazul MWCNT/SPE, +300 mV pentru TCNQ/SPE și +150 mV pentru MWCNT-TCNQ/SPE. O creștere semnificativă a intensității curentului de oxidare a fost observată pentru electrodul modificat cu MWCNT-TCNQ comparativ cu ceilalți electrozii serigrafiați modificați cu TCNQ sau MWCNT. Intensitatea curentului de pic corespunzător oxidării TCh pe MWCNT-TCNQ/SPE este de 60 μA , o valoare de aproape două ori mai mare decât cea înregistrată pentru MWCNT/SPE, și de șase ori mai mare decât cea pentru TCNQ/SPE. Acest fenomen este atribuit efectului sinergic al celor două componente, MWCNT și TCNQ.

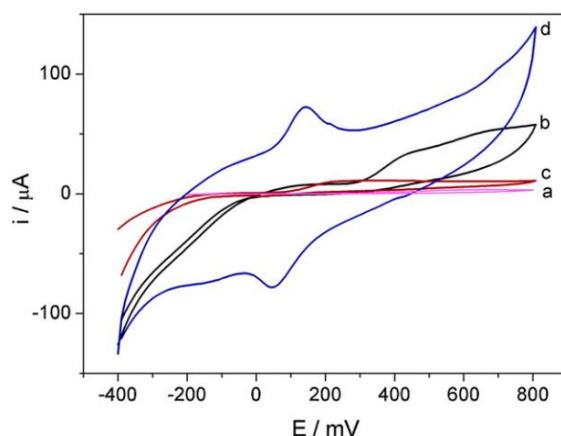


Fig. 6-31. Voltamograme ciclice înregistrate pentru TCh 5 mM cu senzorii SPE (a), MWCNT/SPE (b), cu TCNQ/SPE (c) și MWCNT-TCNQ/SPE (d) ($v_s = 100 \text{ mV/s}$, $[\text{TCNQ}] = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$).

Determinări amperometrice ale ATCh s-au efectuat utilizând electrozi MWCNT-TCNQ/SPE și TCNQ/SPE, într-o celulă de 10 mL prevăzută cu agitator magnetic. Calibrarea s-a realizat prin metoda adaosurilor succesive, pe un domeniu cuprins între 0.1-5 mM ATCh. S-a înregistrat intensitatea curentului pentru linia de bază, și intensitatea semnalului dat de TCh generată enzimatic după adăugarea de ATCh. Între măsurători senzorul a fost spălat cu apă distilată și tampon fosfat. Un răspuns liniar a fost înregistrat pe domeniul de concentrație 0.05-0.6 mM cu o sensibilitate de 45 $\mu\text{A}/\text{mM} \times \text{cm}^2$ și o limită de detecție de 30 μM (Tabel 6-10.). Pentru electrodul modificat cu TCNQ s-a determinat o sensibilitate mai mică, de 32 $\mu\text{A}/\text{mM} \times \text{cm}^2$.

Tabel 6-10. Parametrii de răspuns în amperometrie pentru senzorii TCNQ/SPE și MWCNT-TCNQ/SPE ($E = +150 \text{ mV}$, $\text{pH} = 8$).

Tip senzor	Domeniu liniar mM	Panta $\mu\text{A} / \text{mM}$	Sensibilitate $\mu\text{A} / \text{mM} \times \text{cm}^2$	R^2	L_D μM
MWCNT-TCNQ	0.05-0.6	5.78	45.05	0.9785	28.5
TCNQ	0.05-0.4	4.02	32	0.9984	37.3

Biosenzorul AChE/MWCNT-TCNQ/SPE a fost utilizat pentru determinarea ATCh. Răspunsul amperometric a fost înregistrat pentru adaosuri succesive de ATCh într-o soluție agitată

de tampon fosfat la un potențial de lucru de +150 mV. Reproducibilitatea semnalului analitic înregistrat în prezența ATCh de 5 mM a fost testată cu 5 biosenzori diferiți, % RSD fiind egală cu 6%. Răspunsul amperometric pentru ATCh ajunge la 96% din valoarea inițială după 1 săptămână, indicând o bună stabilitate a biosenzorului.

Pentru determinările de inhibiție, s-au utilizat două pesticide organofosforice, clorpirifosul și metil-paraoxonul. Curbele de calibrare pentru metil-paraoxon și clorpirifos au fost obținute pentru un timp de incubare de 30 de minute pentru fiecare probă de pesticid. Clorpirifosul a fost determinat în domeniul de concentrație 10^{-8} - 10^{-7} M, iar metil-paraoxonul pe un domeniu de concentrație de $10^{-5} \times 10^{-8}$ M pesticid, cu o reproducibilitate similară. Limitele de detecție calculate pentru un grad de inhibiție de 10% sunt de 30 pM (7 ppt) pentru metil-paraoxon și de 0.4 nM (0.1 ppb) pentru clorpirifos (Tabel 6-11.).

Tabel 6-11. Caracteristicile de răspuns pentru biosenzorului AChE/MWCNT-TCNQ/SPE; ecuația dreptei $I\% = a + b \times \log [\text{Pesticid}] \text{ (M)}$. ($T_{\text{incubare}} = 30 \text{ min.}$)

Pesticid	a	b	R^2	Domeniu de concentrație	Limită de detecție	
					pM	ppt
metil-paraoxon	195 ± 12	17.6 ± 1.3	0.9722	0.1-500	30	7
clorpirifos	258.2 ± 5.6	26.50 ± 0.70	0.9958	1-100	430	100

Biosenzorul a fost utilizat în detecția de pesticide în probe de apă de robinet. Gradul de inhibiție înregistrat în apă (3.4 %) este mai mic decât limita de detecție, ceea ce dovedește că biosenzorul poate fi utilizat în probe de apă fără interferențe semnificative. S-au efectuat determinările ale gradului de inhibiție atât în soluții standard cât și în soluții de apă de robinet contaminate cu diferite cantități de metil-paraoxon și clorpirifos. S-au testat soluții de 1, 10 și 50 mM metil-paraoxon și 5, 10 și 50 mM clorpirifos.

Rezultatele experimentale obținute pentru probele reale sunt prezentate în tabelul 6-12 sub formă de procente de inhibiție. Gradul de recuperare a fost calculat ca fiind raportul dintre procentul de inhibiție înregistrat în proba îmbogățită și cel din probele standard corespunzătoare, și în toate cazurile a avut o valoare de sub 100 %.

Tabel 6-12. Determinarea pesticidelor din probe de apă.

Pesticid	Concentrație pesticid (nM)	Grad de inhibiție		Procent recuperare %
		Soluție standard	Probă de apă	
metil-paraoxon	1	37	36 ± 4	97.3
	10	55	52 ± 5	94.5
	50	67	64 ± 2	95.5
clorpirifos	5	38	33 ± 2	86.8
	10	46	42 ± 4	91.3
	50	65	61 ± 3	93.8

Formarea amestecului compozit bazat pe MWCNT și mediatorul electrochimic TCNQ. compozitului MWCNT-TCNQ a fost confirmată prin determinări de spectrometrie DR-UV-Vis și Raman. Electrozi serigrafiați modificați cu TCNQ, MWCNT și MWCNT-TCNQ au fost testați ca senzori pentru TCh. Utilizarea electrozilor modificați cu MWCNT-TCNQ în experimentele de voltametrie ciclică a permis scăderea potențialului de oxidare a TCh de la +450 mV pentru MWCNT/SPE la +150 mV pentru MWCNT-TCNQ/SPE. Sensibilitatea pentru TCh este de aproape

șase ori mai mare pentru MWCNT-TCNQ/SPE decât cea pentru TCNQ/SPE. Utilizând acest compozit, a fost realizat un nou tip de biosenzor amperometric pentru detecția pesticidelor metil-paraoxon și clorpirifos bazat pe un electrod MWCNT-TCNQ/SPE și AChE imobilizată prin metoda sol-gel.

Bibliografie selectivă

- [1] A. Ivanov, G. Evtugyn, H. Budnikov, F. Ricci, D. Moscone, G. Palleschi, Cholinesterase sensors based on screen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 624-631.
- [6] J.P. McNamara, R. Sharma, M.A. Vincent, I.H. Hillier, C.A. Morgado, The non-covalent functionalisation of carbon nanotubes studied by density functional and semi-empirical molecular orbital methods including dispersion corrections, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10 (2008) 128-135.

6.7 Biosenzori pastă de cărbune modificali cu geluri TTF-TCNQ-IL

În această parte experimentală este descrisă prepararea unui nou material format din IL cu cation imidazolic și complexul cu transfer de sarcină TTF-TCNQ. În cadrul complexului cu transfer de sarcină, TTF are rolul de donor datorită electronilor π conjugați, iar TCNQ este un acceptor de electroni datorită prezenței a patru grupări ciano. Amestecarea celor doi compuși are ca rezultat formarea de cristale TTF-TCNQ ce sunt caracterizate prin conductivitate ridicată [1]. În literatură s-a descris prepararea și caracterizarea unor geluri formate din TTF, TCNQ și IL cu cationi imidazolici [7]. Materialele obținute se prezintă sub forma unor geluri similare IL-CNT [8]. S-a constatat existența unui efect sinergic datorit combinării proprietăților fizice ale complexului TTF-TCNQ și a IL, obținându-se gelurile TTF-TCNQ-IL ce prezintă conductivitate electrică și ionică. Formarea gelului a fost explicată prin stabilirea de interacții electrostatice și π - π între complexul TTF-TCNQ și IL. Până acum în literatură nu s-a descris aplicarea TTF-TCNQ-IL pentru dezvoltarea de senzori sau biosenzori.

Formarea complexului TTF-TCNQ în cadrul amestecurilor compozite cu IL a fost studiată în spectroscopia FT-IR. În Fig. 6-43 sunt prezentate spectrele corespunzătoare TTF, TCNQ, [EMIM][TCB] și ale gelului TTF-TCNQ-[EMIM][TCB]. Deplasările benzilor de vibrație corespunzătoare formelor neutre ale TCNQ și TTF la valori ce indică prezența formelor ionice pentru amestecurile TTF-TCNQ și TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] pot fi explicate prin formarea complex cu transfer de sarcină.

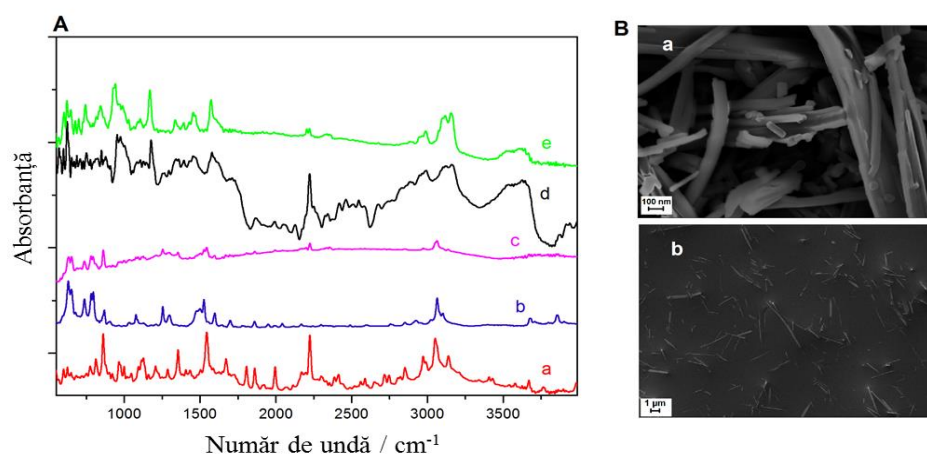


Fig. 6-43. A) Spectrele FT-IR ale: (a) TCNQ, (b) TTF, (c) TTF-TCNQ, (d) [EMIM][TCB], (e) TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] gel. B) Imagini SEM ale (a) TTF-TCNQ, (b) TTF-TCNQ-[EMIM][TCB].

Imaginile obținute în microscopia electronică cu baleiaj (SEM) sunt prezentate în Fig. 6-43.B, imaginea **a**, se poate observa structura TTF-TCNQ, alcătuită din cristale dispuse sub formă unor agregate, iar în imaginea **b**, corespunzătoare gelului TTF-TCNQ-[EMIM][TCB], se observă dispersia acestor structuri sub forma unor cristale aciculare, ceea ce indică faptul că [EMIM][TCB] se comportă ca un electrolit față de ionii de TTF⁺ și TCNQ⁻ în gelul TTF-TCNQ-[EMIM][TCB].

Studiile de voltametrie ciclică cu senzori bazați pe electrozi CP au permis compararea a caracterului electrochimic al amestecurilor compozite cu cele ale componentelor precursore. S-au testat șase tipuri de senzori: TCNQ/CP, TTF/CP, TTF-TCNQ/CP, IL/CP și TTF-TCNQ-IL/CP. Voltamogramele înregistrate în 5 mM TCh sunt prezentate în Fig. 6-44. Studiile electrochimice au arătat un potențial de oxidare mai scăzut pentru electrozii TTF-TCNQ-[EMIM][TCB]/CP comparativ cu cel înregistrat pe TTF-TCNQ/CP. Potențialul de oxidare scade de la +600 mV pentru TTF-TCNQ/CP la +395 mV pentru TTF-TCNQ-[EMIM][TCB]/CP, iar potențialul de reducere scade de la -259 mV pentru TTF-TCNQ/CP la -143 mV pentru electrodul modificat cu gel. Efectul electrocatalitic sporit al gelurilor TTF-TCNQ-IL poate fi explicată de comportarea IL ca o matrice conductivă ce permite difuzia de ioni generați în interiorul gelului. Mobilitatea crescută a TTF⁺ în interiorul gelului TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] este datorată volumului mic al anionului TCB⁻.

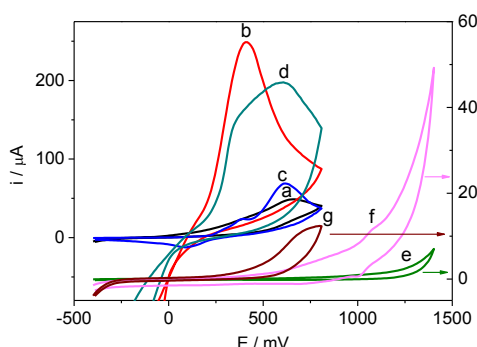


Fig. 6-44. Voltamograme ciclice pentru : CP (a), TCNQ/CP (b), TTF/CP (c), TTF-TCNQ/CP (d), [EMIM][TCB]/CP (e)*, [EMIM][NTF₂]/CP (f)* și [EMIM][OTF]/CP (g), (*Curentul este prezentat pe axa din dreapta)

Proprietățile electrocatalitice ale acestui gel pot fi explicate printr-o conductivitate înaltă a [EMIM][TCB] comparativ cu celelalte lichide ionice. Pentru senzorul modificat cu [EMIM][TCB] s-a înregistrat un curent de oxidare al TCh mai crescut comparativ cu ceilalți senzori modificați, fapt pentru care a fost utilizat în continuare în dezvoltarea biosenzorului enzimatic.

S-au efectuat măsurători cronoamperometrice cu senzorii modificați cu TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] în soluții de TCh de diferite concentrații, la un potențial aplicat este cel de +400 mV vs. Ag/AgCl. A fost calculată o valoare a k_{cat} de 32.3 L/mol×s, ceea ce indică un caracter electrocatalitic sporit al gelului TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] față de oxidarea TCh. Această valoare este mai mare decât cea raportată în literatură pentru un electrod modificat cu hexacianoferat de cobalt [13], dar mai scăzută comparativ cu cele raportate pentru electrozii modificați cu IL-MWCNT sau cu TCNQ-MWCNT.

Determinările amperometrice cu biosenzorii AChE/TTF-TCNQ-IL/CP au fost efectuate la un potențial de lucru de +400 mV prin adaosuri succesive de ATCh în PBS, pe un domeniu de concentrație de 0.1-5 mM ATCh. Pentru experimentele realizate cu același biosenzor valoarea RSD

este de 3.6% pentru 5 determinări succesive cu ATCh 5 mM. Stabilitatea operațională a fost determinată prin efectuarea a 5 măsurători cu ATCh 5 mM pentru același biosenzor. Biosenzorul este stocat la 4 °C. Semnalul își păstrează 92% din intensitatea inițială după două săptămâni.

Compușii terapeutici carbamați determinați sunt eserina și neostigmina. S-au efectuat măsurători de inhibiție pentru 10^{-6} M eserină pentru optimizarea timpului de incubare. Acesta a fost variat între 5 și 30 minute iar gradul de inhibiție crește cu timpul de incubare de la 5% la 100% pentru eserină. Astfel curbele de calibrare pentru eserină și neostigmină au fost obținute pentru un timp de incubare de 30 de minute. Caracteristicile de răspuns ale biosenzorului sunt prezentate în tabelul 6-13. Limitele de detecție obținute sunt 26 pM (7 ppt) pentru eserină și 0.3 nM (57 ppt) pentru neostigmină, calculate pentru un nivel de inhibiție de 10%. Aceste valori reprezintă unele din cele mai scăzute valori raportate în literatură.

Tabel 6-13. Caracteristicile de răspuns pentru biosenzorului AChE/TTF-TCNQ-IL/CP; ecuația dreptei $I\% = a + b \times \log [\text{Compus}] \text{ (M)}$. ($T_{\text{incubare}} = 30 \text{ min.}$)

Compus	a	b	R^2	Domeniu de concentrație (nM)	Limită de detecție	
					nM	ppt
eserină	220.4 ± 13.6	19.9 ± 1.7	0.9645	0.1-1000	0.03	7
neostigmină	247.2 ± 21.9	24.8 ± 2.8	0.9504	1-500	0.3	57

Atingerea unor limite de detecție scăzute pentru cei doi compuși carbamați a permis utilizarea biosenzorilor bazați pe AChE în detecția de compuși în ape uzate. Determinările de probe reale au fost realizate prin adăugarea de cantități cunoscute în probe de apă de robinet. Concentrațiile de medicament utilizate au fost 10, 50 și 100 nM, iar rezultate experimentale sunt prezentate în tabelul 6-14. Eserina și neostigmina au fost detectate în domenii de concentrație între 0.1 nM și 1 nM, respectiv. Limitele de detecție de 0.03 nM pentru eserină și 0.3 nM pentru neostigmină, sunt printre cele mai scăzute raportate în literatură.

Tabel 6-14. Determinarea de compuși carbamați din probe de apă.

Compus	Concentrație (nM)	Grad de inhibiție (%)		Procent recuperare (%)
		Soluție standard	Probă de apă	
Eserină	10	61	54 ± 4	85.8
	50	75	70 ± 4	96.2
	100	81	94 ± 4	114.4
Neostigmină	10	49	38 ± 8	78
	50	66	65 ± 1	97.8
	100	74	76 ± 4	103.2

Procentele de inhibiție obținute sunt în concordanță cu cele obținute ceea ce sugerează o acuratețe bună a biosenzorului. Procentul de recuperare pentru cei doi compuși a fost exprimat ca raport între gradul de inhibiție în proba îmbogățită și cel din soluția standard.

În acest capitol s-a descris prepararea de geluri compozite TTF-TCNQ-IL utilizate pentru dezvoltarea de senzori electrochimici pentru TCh. Gelurile compozite TTF-TCNQ-IL combină proprietățile electrochimice ale mediatorilor TTF și TCNQ cu cele ale lichidelor ionice iar materialul rezultat are proprietăți fizice asemănătoare cu cele ale gelurilor IL-MWCNT. Studiile efectuate în spectroscopia FT-IR au indicat faptul că amestecarea mecanică a compușilor duce atât

la formarea complexului cu transfer de sarcină TTF-TCNQ cât și la stabilirea de interacții electrostatice între mediatori și cationul lichidului ionic, iar în SEM s-a observat fenomenul de dispersie a cristalelor de TTF-TCNQ în lichidul ionic. Determinările efectuate în CV utilizând trei tipuri de amestecuri cu lichide ionice și fiecare dintre precursori gelurilor au arătat că gelul TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] prezintă cea mai mare sensibilitate pentru TCh. Senzorul TTF-TCNQ-[EMIM][TCB]/CP a fost utilizat mai departe pentru dezvoltarea unui biosenzor bazat pe AChE pentru detecția compușilor terapeutici carbamați, eserină și neostigmină

Bibliografie selectivă

- [1] T.J. Kistenmacher, T.E. Phillips, D.O. Cowan, The crystal structure of the 1:1 radical cation-radical anion salt of 2,2'-bis-1,3-dithiole (TTF) and 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ), *Acta Crystallographica Section B*, 30 (1974) 763-768.
- [7] X. Mei, J. Ouyang, Electronically and ionically conductive gels of ionic liquids and charge-transfer tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane, *Langmuir*, 27 (2011) 10953-10961.
- [13] F. Arduini, A. Cassisi, A. Amine, F. Ricci, D. Moscone, G. Palleschi, Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 626 (2009) 66-74.

CONCLUZII GENERALE

În cadrul acestei teze s-au elaborat diferite metode pentru modificarea interfeței biomoleculă-traductor pentru a obține biosenzori cu caracteristici de performanță îmbunătățite. S-au utilizat PM ca suport pentru imobilizarea de Ac iar materialele compozite cu proprietăți conductoare IL-MWCNT, MWCNT-TCNQ și TTF-TCNQ-IL au fost utilizate drept materiale de electrod pentru biosenzori bazați pe AChE.

S-a dezvoltat un imunosenzor pentru OTA cu Ac imobilizați pe PM, utilizând monostraturi tiolice auto-asamblate cuplate cu albumină serică bovină pentru a reduce interacțiile nespecifice de pe suprafața electrodului. PM au permis imobilizarea facilă a anticorpilor pentru OTA și regenerarea ulterioară a suprafeței electrodului, realizându-se un imunosenzor impedimetric și unul SPR pentru detecția OTA.

În această teză s-au descris primii senzori pentru detecția TCh bazați pe geluri compozite IL-MWCNT. Senzorul [BMIM][BF₄]-MWCNT s-a caracterizat printr-o sensibilitate crescută pentru TCh comparativ cu alte geluri bazate pe IL sau doar cu MWCNT, și un potențial relativ scăzut de +50 mV pentru oxidarea TCh în voltametrie ciclică, și de aceea a fost utilizat în dezvoltarea unui biosenzor bazat pe AChE pentru detecția de clorpirifos. Pentru prima oară s-a raportat utilizarea obidoximei ca agent de reactivare a AChE imobilizată pe un biosenzor.

S-a elaborat o metodă de preparare a unui nou tip de material de electrod alcătuit din MWCNT și mediatorul electrochimic TCNQ. Formarea compozitului MWCNT-TCNQ a fost confirmată prin determinări de spectrometrie UV-VIS și Raman. În experimentele de voltametrie ciclică pentru senzorul modificat cu MWCNT-TCNQ s-a înregistrat un potențial de oxidare a TCh de +150 mV, iar sensibilitatea pentru TCh este de aproape șase ori mai mare pentru MWCNT-TCNQ/SPE decât cea pentru TCNQ/SPE. Biosenzorul AChE/MWCNT-TCNQ/SPE a fost utilizat pentru detecția de metil-paraoxon și clorpirifos.

Prima aplicație a gelurilor compozite TTF-TCNQ-IL în dezvoltarea de senzori și biosenzori a fost descrisă în această teză. S-au preparat geluri TTF-TCNQ-IL cu IL cu cation imidazolic și au

fost utilizate în dezvoltarea de senzori pentru TCh. Studiile de SEM și FT-IR au confirmat formarea gelurilor compozite. Studiile electrochimice au arătat că senzorul TTF-TCNQ-[EMIM][TCB] prezintă cea mai mare sensibilitate pentru TCh și acesta fost utilizat pentru realizarea unui biosenzor AChE/TTF-TCNQ-[EMIM][TCB]/CP cu AChE pentru detecția de compuși carbamați.

LISTA PUBLICAȚIILOR CU REZULTATELE DIN TEZĂ

1. Low potential thiocholine oxidation at carbon nanotube-ionic liquid gel sensor
Lucian Rotariu, Lucian-Gabriel Zamfir, Camelia Bala
Sensors & Actuators: B. Chemical, **2010**, 150, 73–79 (IF: 3.535).
2. A novel, sensitive, reusable and low potential acetylcholinesterase biosensor for chlorpyrifos based on 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/multiwalled carbon nanotubes gel
Lucian-Gabriel Zamfir, Lucian Rotariu, Camelia Bala
Biosensors and Bioelectronics, **2011**, 26, 3692–3695 (IF: 5.437).
3. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection
Lucian-Gabriel Zamfir, Irina Geana, Soudes Bourigua, Lucian Rotariu, Camelia Bala, Abdelahmid Errachid, Nicole Jaffrezic-Renault
Sensors and Actuators B: Chemical, **2011**, 159, 178–184 (IF: 3.535).
4. A rational design of the multiwalled carbon nanotube -7,7,8,8-tetra cyanoquinodimethane sensor for sensitive detection of acetylcholinesterase inhibitors
Lucian Rotariu, Lucian-Gabriel Zamfir, Camelia Bala
Analytica Chimica Acta, **2012**, 748, 81-88 (IF : 4.387).
5. Acetylcholinesterase biosensor for carbamate drugs based on tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/ionic liquid conductive gels
Lucian-Gabriel Zamfir, Lucian Rotariu, Camelia Bala
Biosensors and Bioelectronics, **2013**, 46 (15), 61-67 (IF: 5.437).