

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

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**BIOSUPRAFEȚE NANOSTRUCTURATE PENTRU DETECȚIA DE
MICROORGANISME PATOGENE ȘI BIOMARKERI IMPORTANȚI ÎN
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR**

**Doctorand
MIHĂILESCU CARMEN-MARINELA**

Conducător științific

Prof. univ. dr. BACIU ION

**Comisia de referenți: Conf. univ. dr. Mihailciuc Constantin (Universitatea din București)
CSI. dr. Spătaru Nicolae (Institutul de Chimie-Fizică “Ilie Murgulescu”)
Prof.univ.dr. Ion Alina Catrinel (Universitatea Politehnica din București)**

**BUCUREȘTI
2015**

CUPRINS

Cuprins¹	3
Listă abrevieri	7
Introducere	9
1. Baze teoretice pentru dezvoltarea de dispozitive analitice din categoria imunosenzorilor și a microsuprafețelor de tip <i>microarray</i> cu aplicații în diagnosticul de laborator	13
2. Biosuprafețe nanostructurate pentru detecția electrochimică directă a proteinei de legare a acizilor grași, fracția cardiacă (hFABP)	55
2.3 Partea experimentală	63
2.3.2.3 Rezultate și discuții	110
2.3.2.4 Concluzii	115
3. Strategii de biofuncționalizare pentru detecția electrochimică directă a bacteriei patogene <i>E.coli</i> O157:H7	116
3.3 Partea experimentală	129
3.4 Concluzii	174
4. Strategie pentru dezvoltarea unui <i>microarray</i> de anticorpi pentru detecția proteinei hFABP pe biosuprafețe nanostructurate	176
4.2 Partea experimentală	179
4.2.1 Protocol imobilizare prin <i>microarray</i> a anticorpului anti-hFABP marcat cu fluoresceină (FITC) pe suprafețe SAMs	179
4.2.2 Protocol detecție prin metoda <i>microarray</i> a proteinei hFABP pe suprafețe de aur funcționalizate cu SAMs	184
4.2.3 Studiul fluorimetric al interacției HNBID cu anticorpii anti-hFABP (izotip IgG1)	185
5. Concluzii generale	192
Lista publicațiilor din domeniul tezei	196
Bibliografie	199

¹ Numerotarea tabelor, figurilor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat

Introducere

Domeniul nanomedicinei aplicat pe dispozitive pentru diagnostic *in vitro* (IVD) prezintă un mare interes la nivel mondial datorită avantajelor evidente pe care le prezintă: raport calitate/preț excelent, răspuns rapid, sensibilitate și specificitate și, bineînțeles, un impact asupra mediului foarte scăzut. Aceste dispozitive analitice miniaturizate au început deja să fie utilizate în laboratoarele medicale din afara țării (și câteva din țară, în mod special dispozitivele utilizate în genomică), datele statistice indicând pentru viitorii 10-15 ani o adevărată explozie în domeniu.

Acest domeniu al nanotehnologiei implică utilizarea simultană a cunoștințelor din mai multe domenii și discipline științifice: medicină, fizică, chimie, biologie, matematică, științe ingineresti etc. Miniaturizarea, paralelismul și integrarea mai multor funcții într-un singur dispozitiv, bazate pe tehnici provenite din industria electronică, au condus la o nouă generație de dispozitive de dimensiuni mici, rapide, sensibile, specifice și ieftine, cum ar fi **biosenzorii**. Treptat, aceștia vor înlocui multe dintre metodele actuale învechite și laborioase sau se vor impune ca noi metode de analiză în laboratoarele clinice. Nu foarte mulți cercetători înțeleg că atunci când se referă la fabricarea unui biosensor (imunosenzor) trebuie să se refere la tot ceea ce conține acesta în întregime, nu separat numai la strategiile de funcționalizare, conexiuni, traductoare etc. Definiția biosenzorului conform IUPAC, spune că: biosenzorii sunt dispozitive analitice compacte ai căror bioreceptori (anticorpi, enzime, microorganism patogene etc.) sunt integrați sau se află în contact direct cu un traductor fizico-chimic (electrochimic, optic, termic, piezoelectric etc.) care transformă semnalul biologic într-un semnal analitic măsurabil [1, 2]. Aceasta este definiția de la care s-a plecat atunci când s-au început studiile din această teză. Atunci când elementele de recunoaștere biologice sunt anticorpii specifici unui anumit analit din proba analizată, biosenzorii se numesc imunosenzori de afinitate, deoarece se poate obține un răspuns specific utilizând reacția imună bazată pe afinitatea dintre antigen și anticorp.

Obiectivele tezei

Scopul tezei de doctorat a fost realizarea și testarea unor biosuprafețe din categoria imunosenzorilor și a cipurilor de tip *microarray* cu sensibilități și specificitate mărită, care să înlocuiască multe dintre metodele actuale învechite și laborioase. Acestea se vor impune ca dispozitive analitice noi cu grad de aplicabilitate în diagnosticul de laborator.

Obiectivul principal al acestei teze constă în ***experimentarea unor strategii de realizare a unor biosuprafețe nanostructurate pentru dezvoltarea de biosenzori electrochimici și biocipuri de tip „microarray” cu aplicații viabile în diagnosticul de laborator.***

Strategiile propuse au prezentat un grad de complexitate ridicat datorită mai ales interdisciplinarității metodelor aplicate, tehnologiei specifice de realizare, cu depunerea anticorpilor și antigenelor, cu prepararea de reactivi și cu utilizarea unei tehnici de funcționalizare bazate pe formarea de monostraturi autoasamblate (SAMs) specifice pentru detecția electrochimică/optică a unui important marker cardiac a infarctului de miocard acut, proteina de legare a acizilor grași, fracția cardiacă și o bacterie deosebit de periculoasă pentru sănătatea publică, bacteria *Escherichia coli* O157:H7.

Conținutul tezei de doctorat

Datorită strategiilor diferite de abordare a temei și anume, cele specifice pentru dezvoltarea de biosuprafețe pentru imunosenzori cu detecție electrochimică și cele pentru dezvoltarea de biosuprafețe de tip *microarray* cu detecție optică în fluorescență, structura tezei este diferită de structura obișnuită. Deoarece atât bacteria patogenă, *E.coli* O157:H7 cât și proteina marker cardiac de legare a acizilor grași, fracția cardiacă (hFABP) sunt diferite ca structură și funcție biologică, acestea necesită două abordări diferite de realizare biosuprafețelor cu scopul de a crea toate condițiile teoretice și experimentale mediului lor caracteristic, pentru a nu interveni foarte mult în schimbarea structurii tridimensionale a analiților.

Astfel primul capitol de teorie, cu date de literatură, descrie construcția unor astfel de dispozitive de la probă biologică până la momentul detecției. Pe lângă această parte generală (**capitolul 1**) cu date de literatură, celelalte capitole conțin câte o parte introductivă referitoare la problematica tratată și rezultatele originale obținute în cadrul fiecărui obiectiv propus.

Capitolul 2, secțiunea „Parte experimentală” prezintă optimizarea biofuncționalizării interfețelor pornind de la structura specifică proteinei marker cardiac hFABP și de la dimensiunea acesteia. Alegerea acestui biomarker a fost justificată de importanța deosebită pe care o are în diagnosticul infarctului miocardic acut (IMA) unde concentrația sangvină a lui crește înaintea concentrației celorlalți biomarkeri cardiaci. Dar pentru detecția acestui biomarker e nevoie de o metodă foarte sensibilă deoarece are o masă moleculară foarte mică în comparație cu ceilalți biomarkeri. **Tehnica formării monostraturilor autoasamblate simple, omogene (sSAMs) și a monostraturilor mixte (mSAMs)** pot constitui tehnicile care, pe lângă faptul că sunt ușor de realizat (o caracteristică importantă mai ales atunci când se urmărește comercializarea dispozitivului), pot fi realizate și adaptate în funcție de caracteristicile biomarker-ului ales. Pentru determinarea unui anumit tip de SAM, format prin adsorbția de molecule mixte (mSAM) sau a unei singure molecule cu formarea de monostrat omogen, simplu (sSAM), potrivit detecției electrochimice directe eficiente a proteinei hFABP, suprafețele de aur nanostructurate au fost funcționalizate cu un amestec mixt de tioli și un amestec omogen format dintr-un singur tiol. Amestecul mixt de tioli este format din acidul 11-mercaptoundecanoic (11MUA) și alcoolul 3-mercaptopropanol (3MPOH) în raportul molar de 9:1 (3MPOH:11MUA) iar monostratul care s-a format a fost denumit **mSAM₂**. Suprafețele funcționalizate cu 11MUA au fost denumite **sSAM**. Timpul de imersie în soluția de tioli a fost de asemenea un parametru important în acest studiu. **Eficiența formării monostraturilor SAMs pe electrozii de aur** (suprafețele plane de aur) poate fi dovedită prin capacitatea acestor monostraturi de a bloca reacția redox și poate fi exprimată prin compararea separării picurilor anodice și catodice exprimată prin ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$) din voltamogramele obținute după timpul de imersie.

În Fig. 2.20 (a, b) s-au prezentat voltamogramele ciclice corespunzătoare formării fiecărui lot de SAMs după 1 minut, 10 minute, 30 de minute și 16 ore. După doar 1 minut se observă o scădere rapidă a curentului anodic și catodic pentru sSAM. După 10 minute deja nu se mai observă nicio reacție a cuplului redox, monostratul devenind neconductiv. Prin comparație, în cazul monostratului mSAM₂, blocarea curentului nu se realizează total nici după un timp mai mare de imersie. Întodeauna va exista transfer de sarcină către suprafața electrodului ceea ce face ca acest monostrat să nu poată fi folosit pentru dezvoltarea de imunosenzori capacitive pentru detecția

proteinei hFABP deoarece defectele din monostrat permit transferul de electroni către și dinspre suprafață măbind legăturile nespecifice și prezentând o instabilitate a capacității la suprafață.

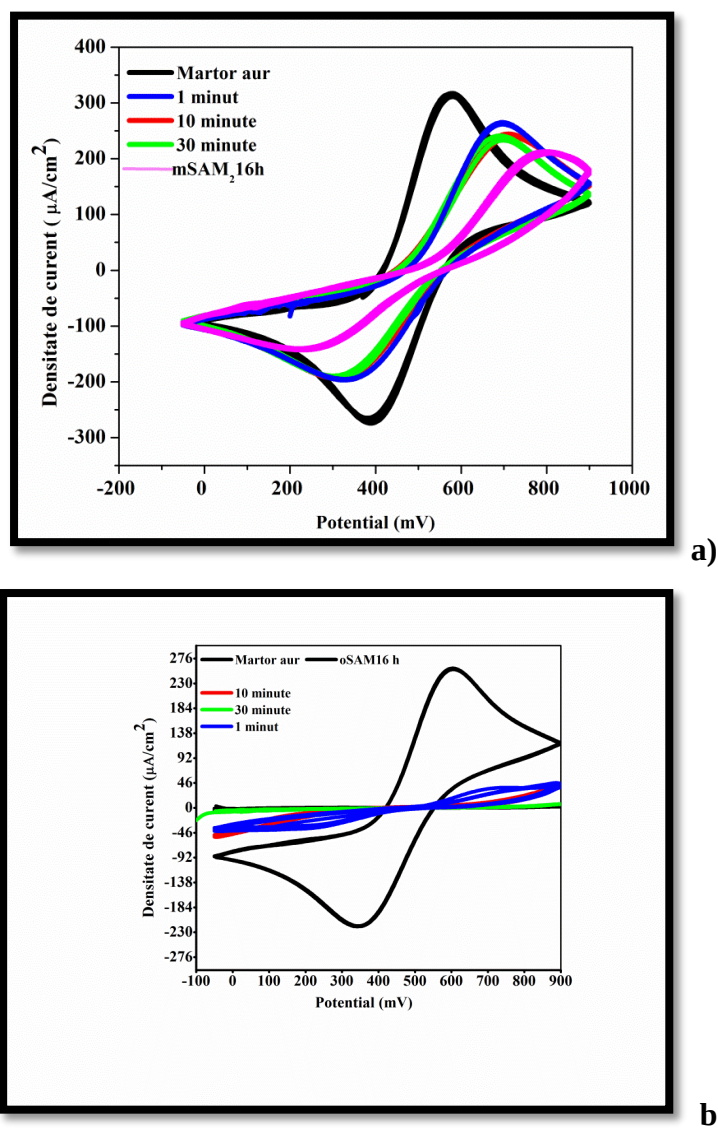


Fig. 2.20 Voltamograme ciclice pentru formarea de (a) mSAM₂ și (b) sSAM după diferiți timpi de imobilizare. Soluția electrolit este PBS (pH=7,4) și conține cuplul redox Fe(CN)^{3-/4-}, viteza de scanare 100mV/s [145]

Pentru fiecare lot SAM s-au înregistrat spectrele de impedanță Nyquist (-Z vs Z) prezentate în Fig. 2.21 corespunzătoare celor 4 timpi de imersie în soluțiile de tioli iar după fitare s-au calculat parametrii circuitului echivalent corespunzător [145]. Valorile obținute sunt în concordanță cu observațiile făcute după înregistrarea voltamogramelor prezentate în Fig.2.20.

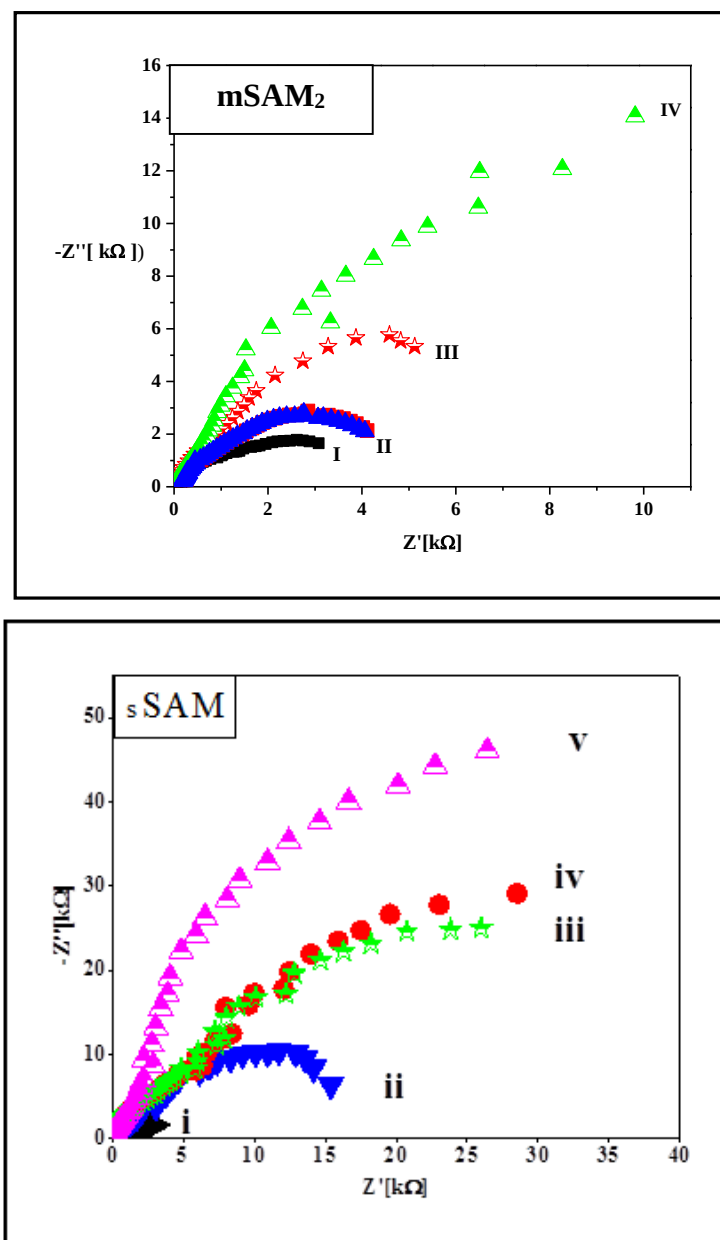


Fig. 2.21 Reprezentări Nyquist ($-Z''$ vs Z') pentru loturile SAM (mSAM₂ și oSAM) după diferiți timpi de imersie: i) martor, ii) 1 min, ii) 10 min, iii) 30 min, iv) 16 h pentru cele două loturi: mSAM₂ și sSAM [145].

Gradul de acoperire al suprafețelor cu tioli pentru cele două loturi SAMs poate fi evaluat procentual după formula:

$$\theta = \left(1 - \frac{R_{ct} \text{ înainte de depunere tioli}}{R_{ct} \text{ după depunere tioli}}\right) \times 100 \quad (3)$$

Valorile gradului de acoperire sunt în concordanță cu observațiile făcute după înregistrarea voltamogramelor. Astfel, se observă creșterea rapidă a gradului de acoperire după primul minut pentru sSAM, după care urmează o staționare atribuită ordonării monostratului, acesta atingând valoarea maximă a gradului de acoperire abia după 16 h, cu un procent de acoperire de 95,8 % pentru hSAM. Spre deosebire de hSAM, valorile rezistenței la transferul electronic crește ușor până la 30 de minute și abia atinge valoarea de 61,7% după 16 ore de imersie, conform Tabelului 2.8.

Tabel 2.8 Valori grad de acoperire la diferiți timpi de imersie în tioli [147]

Timpi de imersie	sSAMs θ (%)	mSAM ₂ θ (%)
0	-	-
1 min	76,0	8,5
10 min	90,6	8,4
30 min	92,0	31,3
16 h	95,8	61,7

După activare cu EDC și Sulfo-NHS, majoritatea grupelor carboxil se transformă în esteri N-hidroxisuccinimidă, proces ce va determina încetarea interacțiilor repulsive la interfața electrozilor cu probe anionice ale cuplului redox și prin urmare astfel se vor favoriza reacțiile de tranfer de electroni către suprafețele electrozilor. Se observă în figura 2.27 că monostraturile devin mai puțin izolatoare după reacția de activare cu EDC/NHS cu creșterea curenților de pic pentru monostratul sSAM în concordanță cu o scăderea rezistenței de transfer electronic la suprafață cu sSAM înregistrată după activare așa cum se poate vedea în Fig. 2.26 din spectrul de impedanță [145].

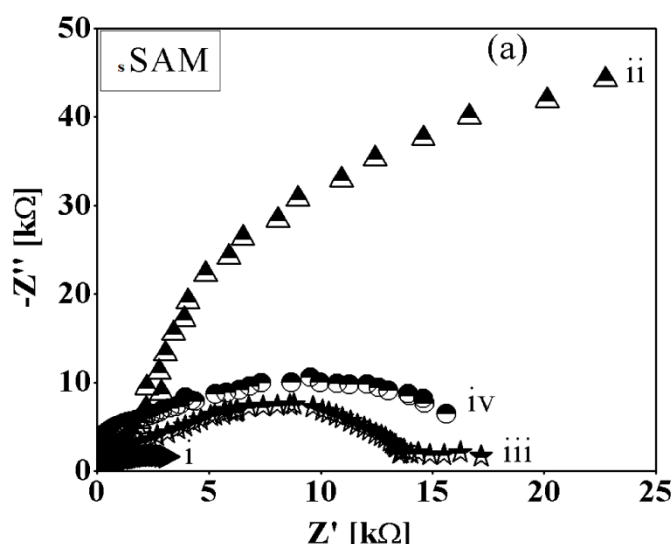


Fig. 2.26 Reprezentare Nyquist (Z' vs Z'') pentru sSAM pentru i) Martor aur, ii) Martor aur+sSAM, iii) Martor aur+sSAM+EDC/NHS, iv) Martor aur+sSAM+EDC/NHS+anti-hFABP+BSA [145]

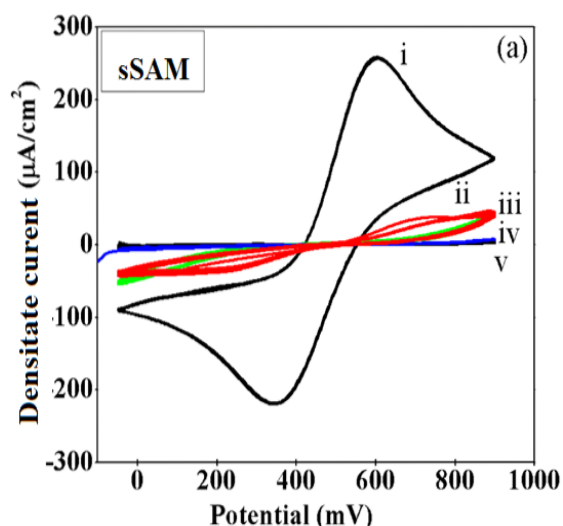


Fig. 2.27 Voltamograme ciclice pentru etapele bio-funcționalizării sSAM (d) voltamograme ciclice pentru etapele bio-funcționalizării electrozilor modificați cu sSAM (Soluția electrolit este PBS (pH=7,4) ce conține cuplul redox $\text{Fe}(\text{CN})^{3-/4-}$, viteza de scanare 100mV/s) [145]

Rezultatele măsurărilor de impedanță au arătat că diametrul semicercului reprezentării Nyquist (Z'' vs Z') crește proporțional cu creșterea concentrației de hFABP adăugată, ceea ce demonstrează că reacția cu protein hFABP a avut loc.

Pentru evaluarea interacției dintre hFABP și biosuprafața construită, datele au fost normalizate utilizând raportul $\frac{(R_{ct})_{ci}}{(R_{ct})_{c0}}$ unde $(R_{ct})_{ci}$ reprezintă rezistența de transfer electronic înregistrată după incubarea electrozilor de lucru biofuncționalizați (sSAMs/EDC/NHS/anti-

hFABP/BSA cu diferite concentrații de hFABP și $(R_{ct})_{C_0}$ este rezistența la transferul electronic înainte de incubarea cu hFABP (probe blank fără proteină). S-a constatat că există o dependență liniară între acest raport și logaritmul concentrației de hFABP. A fost observată o liniaritate bună pe domeniul concentrațiilor de hFABP cuprins între 0.098 ng/mL-100 ng/mL. Ecuația liniară, coeficientul de regresie liniară, limita de detecție și sensibilitatea biosuprafeței construite pentru detecția acestui biomarker au fost trecute în Tabelul 2.11 [145].

Tabel 2.11. Parametri dreptei de calibrare în PBS

Parametri dreptelor de calibrare	Electrod sSAMs/EDC/NHS/ anti hFABP/BSA
Ecuația liniară	$R_{ct}C_i/R_{ct}C_0=0.891+0.954 \log C_{hFABP}$
Coeficient de corelare	$R^2= 0.978$
Limita de detecție	524 pg.ml^{-1}
Sensibilitatea	0.954 ml.pg^{-1}

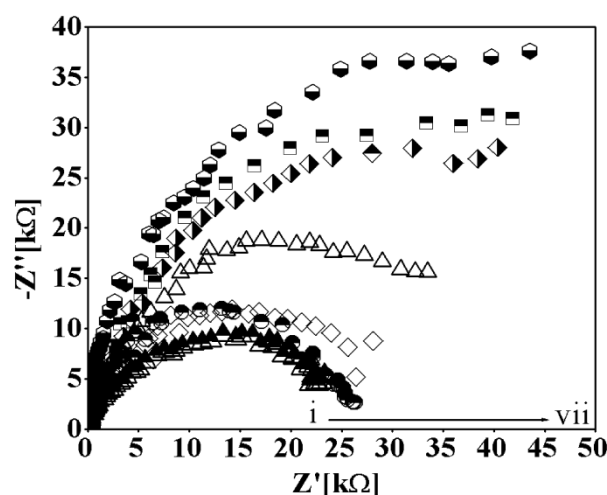


Fig. 2.32 Reprezentarea Nyquist (Z'' vs Z') și graficul curbelor de calibrare (stânga sus) pentru biosuprafețele funcționalizate cu sSAM după reacția cu hFABP în soluția de tampon PBS; concentrații hFABP (i) 0 ng/mL, (ii) 0,098 ng/mL, (iii) 1,56 ng/mL, (iv) 3,125 ng/mL, (v) 6,25 ng/mL (vi) 50 ng/mL, (vii) 100 ng/mL [145]

Specificitatea biosuprafeței sSAMs/EDC/NHS/anti-hFABP/BSA a fost testată prin adăugarea de 5 concentrații de proteină hFABP *în serul uman de control* care conține o multitudine de alți analiți (enzime, proteine, electroliți etc). Studiului specificității biosuprafețelor este foarte important deoarece interacțiile nespecifice dintre suprafețele electrozilor și alți analiți din probele reale de ser ar putea să ducă la reacții fals pozitive sau fals negative. Prin urmare, alte 5 suprafețe din fiecare lot au fost incubate cu ser uman de control în care s-au introdus 5 concentrații de hFABP: 98 pg/mL; 3.125 ng/mL; 12.5 ng/mL; 50 ng/mL și

100 ng/mL pentru 30 min la 37°C, apoi s-au spălat cu PBS și s-au înregistrat spectrele de impedanță. Rezultatele sunt prezentate în Fig. 2.33 (a și b) [145].

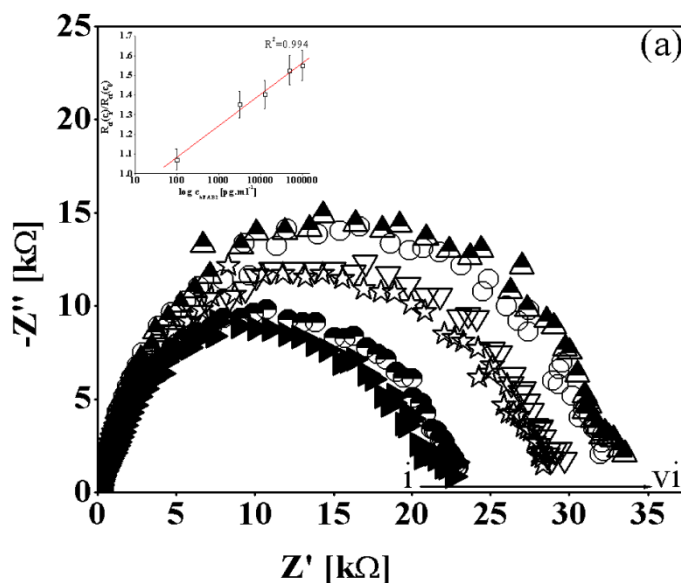


Fig. 2.33 Reprezentarea Nyquist (Z'' vs Z') și dreapta de calibrare (stânga sus) pentru suprafețele sSAMs/EDC/NHS/ anti hFABP/BSA după imunoreacția cu hFABP în ser uman:PBS (1:1); concentrații de hFABP i) 0 ng/mL ii) 0,098ng/mL; iii) 3.125 ng/mL; iv)12.5 ng/mL; v) 50 ng/mL și vi)100 ng/mL[145]

S-a demonstrat că aceste biosuprafețe nu pot fi utilizate pentru detecția directă, prin EIS, a biomarkerului cardiac hFABP utilizând probe reale deoarece nu prezintă specificitate. În concluzie, raportul mare între 11MUA și 3MPOH nu este o alegere bună pentru detecția proteinei biomarker hFABP deoarece au loc adsorbții nespecifice dar nici un raport maxim între cei doi compuși nu este o variantă bună. De aceea optimizările au continuat dar pe biosuprafețe nanostructurate interdigitate de aur integrate de tip imunosenzor deoarece s-a dorit obținerea unui timp mai bun de reacție.

Etapele de funcționalizare cu SAMs și biofuncționalizarea cu anticorpii anti-hFABP (formarea biosuprafețelor) au fost verificate morfologic cu tehnica AFM. De asemenea cele mai importante vibrații de legătură după formarea monostraturilor autoasamblate și după imobilizarea anticorpilor anti-hFABP au fost determinate cu spectrometria în infraroșu cu transformată Fourier FTIR-ATR. Determinarea constantelor de afinitate a reacției imune a fost determinate cu tehnica actuală ELISA.

Demonstrarea funcționalității finale a biosuprafețelor nanostructurate, pentru detecția proteinei marker cardiac hFABP, a fost realizată și prin folosirea lor ca parte integrantă a unor imunosenzori capacitivi interdigați, reacția cu proteina hFABP având loc cu ajutorul unei platforme microfluidice a cărei schemă bloc este prezentată în Fig. 2.36.

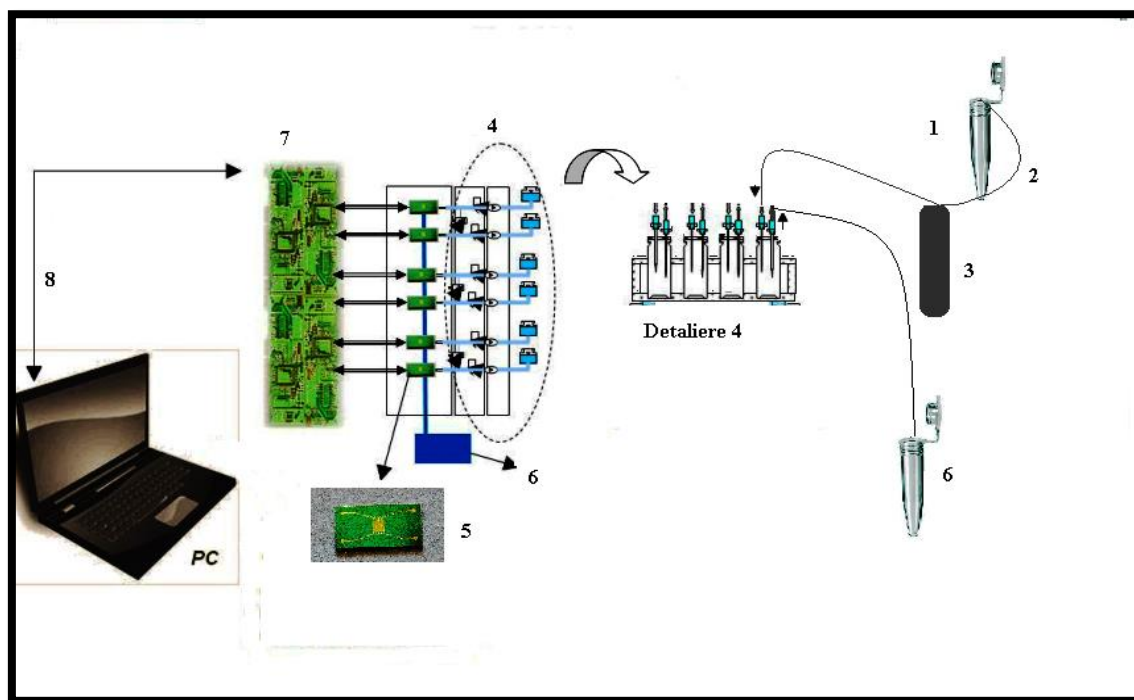


Fig. 2.35 Schema bloc platformă imunosenzori [147]

În schema bloc a platformei de imunosenzori din Fig.2.35 s-au făcut notațiile: **1-** recipient cu calibrator/ probă biologică sau soluții de spălare; **2-** tub capilar transport probe/soluții de spălare; **3-** micropompe peristaltice; **4-** sistem de microvalve, canale și rezervoare; **5-** imunosenzor cu aria activă reprezentată de electrozii de aur interdigitati (EIDA); **6-** sistem de evacuare calibrator/probă biologică/lichid de spălare; **7-** bloc electronic de măsurare și amplificare semnal Agilent; **8-** sistem PC de înregistrare date.

În experimentele de EIS s-a urmărit comportarea capacitivă (neconductivă) a celor trei tipuri de suprafețe funcționalizate SAMs: mSAM₁, mSAM₂ și sSAM. Se cunoaște din literatură că stratul SAM este văzut ca un strat cu comportare capacitivă ideală atunci când unghiul de fază ϕ este $\geq 88^\circ$ și este considerat un capacitor slab când $\phi < 87^\circ$ pe domeniul de frecvențe 1kHz-50Hz [101,146, 152]. Această comportare capacitivă s-a determinat din diagrama Bode (ϕ vs frecvență) realizată după 24 h de imersie în tioli care ne arată care dintre cele 3 suprafețe se apropie de o comportare capacitivă ideală la un unghi de fază de 90° . În Fig. 2.38 s-a prezentat diagrama Bode (ϕ în funcție de frecvență) pentru experimentele cu cele 3 suprafețe în domeniul de frecvențe 1 Hz- 10^5 Hz după imersia timp de 24 h în soluțiile de tioli [147].

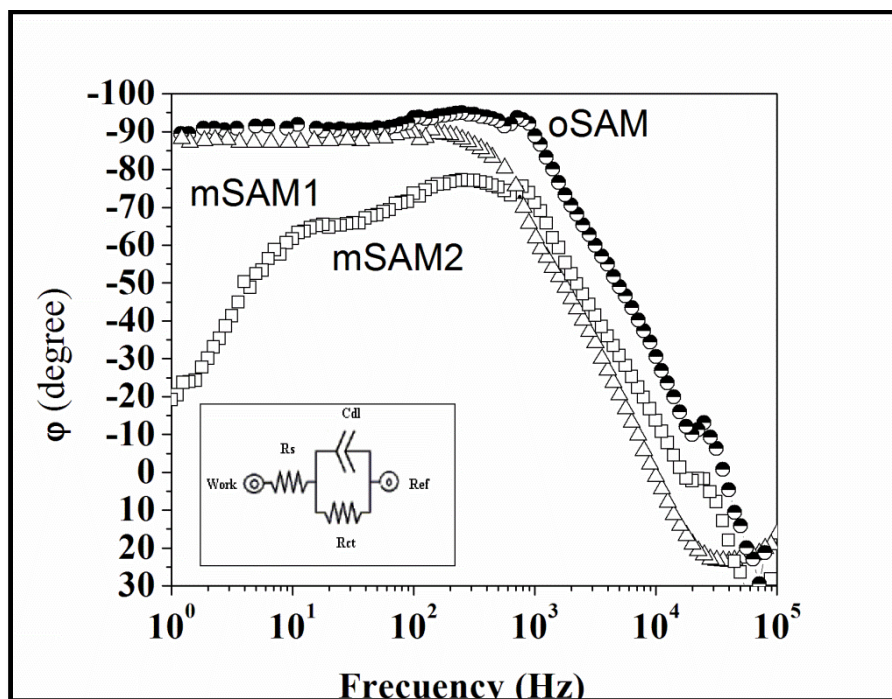


Fig. 2.38 Diagrama de fază Bode Plot (ϕ vs frecvență) pentru mSAM₁, mSAM₂ și sSAM; în circuitul echivalent din figură R_s este rezistența soluției, C_{dl} capacitatea stratului dublu electric, R_{ct} rezistența de transfer electronic la suprafața electrodului [147]

Voltamogramele ciclice pentru electrozii de aur funcționalizați cu mSAM₁, mSAM₂ și sSAM pentru diferite perioade de timp au arătat că după 24 h blocarea curenților (anodic și catodic) s-a realizat total pentru sSAM și pentru mSAM₁, dar pentru mSAM₂ nu s-a obținut această blocare nici pentru perioade mari de timp (24 h). mSAM₂ prezintă defecte în monostrat pe unde electronii pot pătrunde și ajunge la suprafață, cauzând astfel o creștere a capacității monostratului mult mai pronunțată decât cea în cazul mSAM₁ și sSAM. Procentul mic de MUA în amestec cauzează formarea de defecte în substrat ce favorizează transferul ionilor negativi $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ către suprafața electrodului de aur/mSAM₂ și, prin urmare, proprietățile de izolare ale acestui monostrat scad iar comportarea capacitivă a acestuia este mult diminuată, așa cum se poate vedea și în reprezentarea Bode

Principiul metodei de imunodetecție în cazul imunosenzorului capacitiv este următorul: imobilizarea proteinei hFABP pe biosuprafețele nanostructurate mSAM₁/anti-hFABP/BSA și respectiv pe sSAM/anti-hFABP /BSA produce o creștere a grosimii stratului, ceea ce determină modificarea capacității totale pentru fiecare biosuprafață conform ecuației:

$$1/C_t = 1/C_{SAM} + 1/C_{rec} + 1/C_{dl} \quad (2.3) \quad [159]$$

unde C_t este capacitatea totală la suprafață, C_{SAM} este capacitatea stratului SAM, C_{rec} capacitatea stratului biologic de recunoaștere depus și C_{dl} capacitatea stratului difuz. Deoarece C_{SAM} prezintă proprietăți izolatoare foarte bune (demonstrată pentru mSAM₁ și sSAM în diagrama Bode, Fig.2.39), aceasta împreună cu capacitatea stratului difuz (care este destul de subțire cu o rezistență a soluției mică) prezintă capacități mult mai mari decât capacitatea stratului biologic de recunoaștere format după depunerea anticorpilor și a proteinei BSA. Dacă folosim ecuația (2.3), deoarece capacitățile sunt subunitare, putem să spunem că valoarea capacității totale este dominată de modificările de capacitate apărute după reacția anticorpilor imobilizați cu proteina hFABP. **Metoda potențiostatică într-o singură etapă** a fost aleasă pentru măsurătorile de

capacitate pe imunosenzorii biofuncționalizați deoarece la aplicarea unui voltaj mic (maxim 100 mV) la frecvența mică de 1kHz experimentele pot fi descrise ca un circuit simplu RC din Fig.2.42 [147]. Rezistența R_f este rezistența stratului $mSAM_1$ care este mult mai mare decât rezistența datorată soluției ($99,97 \Omega/cm^2$ față de $87,60 K\Omega/cm^2$). Prin urmare circuitul folosit la detecția prin EIS se transformă în circuitul deschis RC serie din Fig.2.41 (b). iar modificările de capacitate totală apărute la suprafețele electrozilor biofuncționalizați după adăugarea a diferitelor concentrații de proteină hFABP pot fi corelate cu reacția dintre proteină hFABP și electrozii biofuncționalizați $mSAM_1$ sau sSAM.

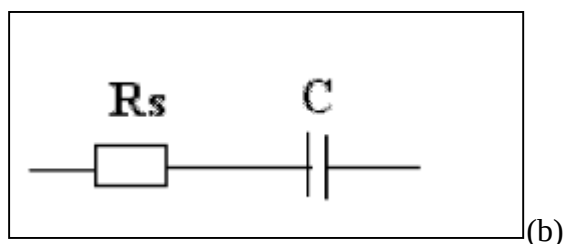


Fig. 2.41 Circuit echivalent RC ($R_{soluție}$ și C =capacitatea totală a straturilor de pe electrozi).

După imobilizarea proteinei hFABP pe suprafețele biofuncționalizate, capacitatea scade cu timpul de incubare devenind constantă după 30 min. În Fig. 2.41 s-a prezentat variația capacității timp de 30 min pentru fiecare concentrație de proteină adăugată pe cele două biosuprafețe. După 30 min capacitatea devine constantă, ceea ce arată saturarea suprafeței cu acoperirea totală a situsurilor anticorpilor de către proteină. Grosimea straturilor este foarte importantă atunci când semnalul capacității datorată reacției imune va crește comparabil ca mărime cu stratul rezultat în urma interacției SAM cu anticorpul. În cazul biosuprafețelor sSAM, cum se poate vedea și în figurile 2.42(a) și 2.42(b), scăderea capacității se obține într-un domeniu de valori mai îngust decât cel obținut pentru $mSAM_1$. Prin urmare, deși lanțurile lungi de alchiltioli sunt mai greu de distrus, se preferă straturi mai subțiri pentru detecția directă de cantități mici de proteină. Pentru $mSAM_1$, cu un lanț scurt și un lanț lung de alcantioli, se obține o modificare mare a capacității relative comparativ cu sSAM. În condiții optime, pentru biosuprafețele EIDA/sSAM/anti-hFABP/BSA și EIDA/ $mSAM_1$ /anti-hFABP/BSA, după adăugarea proteinei hFABP, s-au obținut modificări de capacitate (ΔC) direct proporționale cu logaritmul concentrației de hFABP în domeniul 98 pg.mL^{-1} - 100 ng.mL^{-1} în tampon PBS, așa cum putem constata în Fig. 2.43 (a) și (b) și ecuația de regresie, coeficientul de liniaritate și limita de detecție pentru ambii electrozi sunt prezentați în Tabelul 2.13 [147]. Limita de detecție pentru $mSAM_1$ și pentru sSAM au fost de 0.836 ng.mL^{-1} pentru $mSAM_1$ și respectiv 0.968 ng.mL^{-1} pentru sSAM.

Tabel 2.13. Parametri dreaptă de calibrare în PBS pentru imunosenzorii capacitivi interdigitați pentru detecția proteinei hFABP [147]

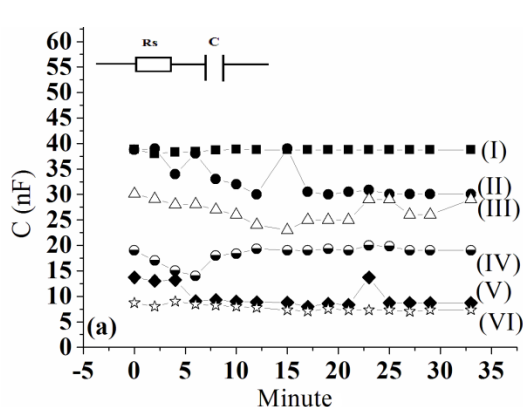
Parametri curbă	EIDA/sSAM/EDC/NHS/anti-hFABP/BSA	EIDA/mSAM ₁ /EDC/NHS/anti-hFABP/BSA
Ecuatie	$DC \text{ (nF)} = -17,98 - 7,40 \log C_{hFABP}$	$DC \text{ (nF)} = -39,29 - 6,71 \log C_{hFABP}$
Coeficient de regresie	$R^2 = 0,975$	$R^2 = 0,981$
Limită de detecție	968 pg.mL ⁻¹	836 pg.mL ⁻¹

Specificitatea imunosenzorului

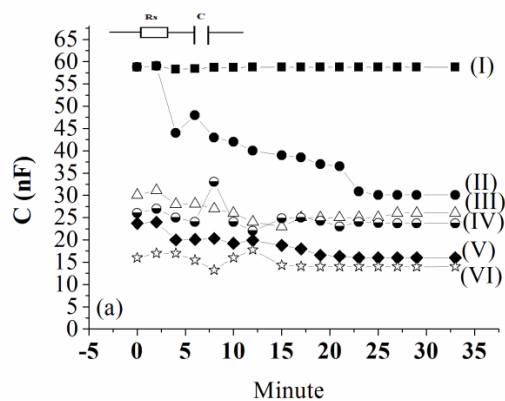
S-au testat posibilele interferențe atunci când s-au introdus volume cunoscute de antigen hFABP în serul de control uman. Electrozii interdigitați bio-funcționalizați cu mSAM₁ și sSAM au fost introduși în sistemul microfluidic unde au fost expuși și incubați cu ser de control BioRad în care s-au introdus 5 concentrații de hFABP: 98 pg.mL⁻¹, 1,56 ng.mL⁻¹, 3,125 ng.mL⁻¹ și 25 ng.mL⁻¹. Ecuația de regresie și coeficientul de regresie liniară pentru ambii electrozi sunt prezentate în Fig 2.44 (a) și (b). Așa cum se poate vedea domeniul de valori modificate ΔC este mult mai lărgit pentru electrodul EIDA/mSAM₁/EDC/NHS/anti-hFABP/BSA în cazul EIDA/sSAM/EDC/NHS/anti-hFABP/BSA atunci când folosim concentrații cunoscute de hFABP în serul uman de control. Probabil că densitatea mare de lanțuri alchil și omogenitatea stratului omogen sSAM nu este o caracteristică esențială pentru eficiența acestui imunosenzor. Împiedicările sterice care apar între antigeni și anticorpi, precum și prezența altor analiți în proba de ser, în cazul electrozilor funcționalizați omogen, au dus la o capacitate de legare mai mică decât în cazul electrozilor mSAM₁ bio-funcționalizați.

Repetabilitatea pe același electrod a dus la obținerea unei abateri relative standard ≤3% iar reproductibilitatea între electrozi a fost determinată ca fiind ≤ 8% [147].

Pentru testul de regăsire s-au utilizat diferite concentrații de hFABP în PBS și experimentele au fost realizate de trei ori. Media gradului de regăsire a fost de 99.3% cu o deviație relativă standard de 0.5-2% [147].



(a)



(b)

Fig.2.42 (a) Răspunsul capacitiv pentru biosuprafețele EIDA/sSAM/anti-hFABP și (b) EIDA/mSAM₁/anti-hFABP după (I) aspirarea a 100 μ L de hFABP de (I) 0 ng/mL, (II) 0,098 ng/mL, (III) 1,56 ng/mL, (IV) 3,125 ng/mL, (V) 50 ng/mL, (VI) 100 ng/mL. Modelul circuitului electric este RC cu R_s , rezistența stratului SAM și C, capacitatea totală a straturilor formate pe suprafața electrozilor.

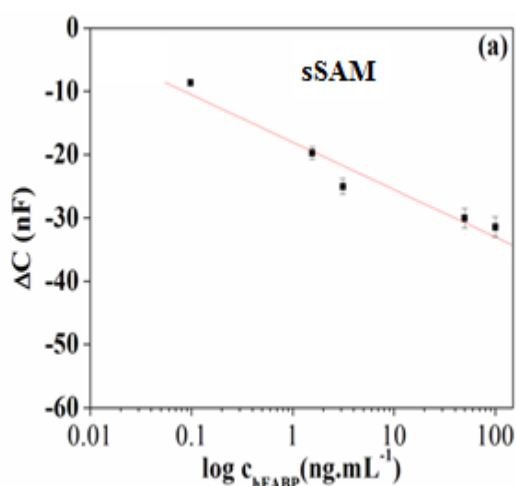


Fig.2.43 (a) Dreaptă calibrare dintre modificările (ΔC) după adăugarea diferitelor concentrații de hFABP în PBS pe electrozii interdigitați modificați cu sSAM.

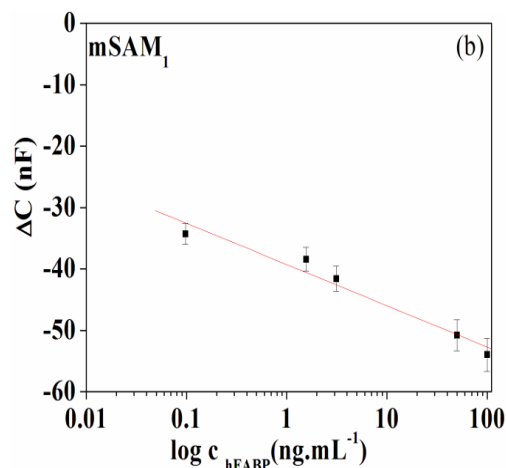
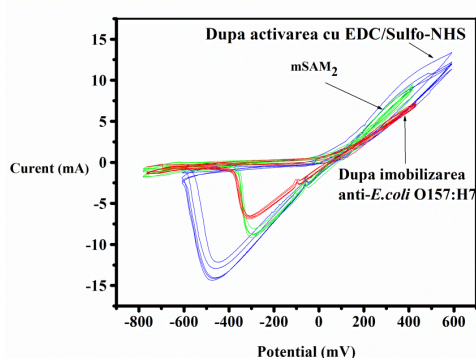


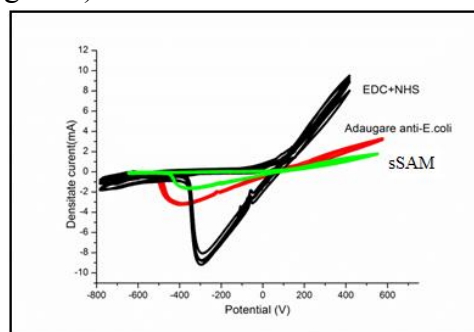
Fig.2.43 (b) Dreaptă calibrare dintre modificările (ΔC) după adăugarea diferitelor concentrații de hFABP în PBS pe electrozii interdigitați modificați cu mSAM₁.

În capitolul 3 (în secțiunea „Parte experimentală”), în contrast cu biomolecula utilizată în capitolul precedent, s-a utilizat bacteria serogrup *E.coli* O157:H7 care, fiind un analit mare (1-3 μ m), acesta trebuie să-și recunoască anticorpii specifici imobilizați covalent pe o suprafață solidă formată dintr-un strat mixt de molecule organice. Substratul fiind din aur, s-a ales o moleculă organică cu **lanț de alcantiol lung (11 atomi carbon)** care să reacționeze covalent cu anticorpii bacterieni și o alta formată din **lanț de alcantiol scurt (3 atomi de carboni)** care să aibă doar efect de spațializare între aceștia pentru a preveni efectele împiedicărilor sterice care pot apărea. Acest raport între molecule au fost optimizat iar

suprafețele cu cele mai bune rezultate au fost folosite pentru dezvoltarea imunosenzorului final. Toate etapele de funcționalizare și biofuncționalizare cu SAM au fost caracterizate prin tehnici de caracterizare moderne: AFM, SEM, FTIR-ATR, elipsometrie, electrochimice (CV și EIS). S-au înregistrat voltamograme ciclice pentru fiecare etapă de funcționalizare și biofuncționalizare ale suprafețelor funcționalizate cu mSAM₂ (Fig. 3.25) și au fost comparate cu sSAM. Pornirea experimentelor a fost garantată de obținerea oxidării/reducerii aurului în prezența speciei electroactive feri/fero. S-a urmărit separația maximelor de curent anodic și catodic (valori de până la 100 mV fiind considerate acceptabile). Așa cum era de așteptat, în cazul formării straturilor mSAM₂ nu se blochează total curenții nici după de 24 de ore de imersie în tioli. **După activarea cu EDC și NHS curentul de pic înregistrează o creștere** datorită formării de sulfo-NHS esteri pe suprafață care opresc interacțiile repulsive ale ionilor carboxil cu ionii negativi ai speciei electroactive, aceștia având posibilitatea de a ajunge mai ușor la suprafața de aur. Are loc astfel o scădere a proprietăților conductive ale monostraturilor, această creștere este, însă mai mare la sSAM decât mSAM₂ deoarece prezența grupărilor ionizabile de hidroxil contribuie în plus la creșterea repulsiilor între ioni (observație constatată și în cazul sSAM comparativ cu mSAM₁). Legarea covalentă a anticorpilor de suprafață reduce penetrarea ionilor redox către cele două tipuri de suprafețe, scăzând astfel intensitatea curentului. O informație importantă este faptul că atunci când are loc reacția cu anticorpul și blocarea suprafețelor cu BSA răspunsul în curent de pic anodic este cam de aceeași valoare ($I_a = 4$ mA) pentru ambele suprafețe. Prin urmare, deși în primele etape ale funcționalizării și biofuncționalizării lor, comportarea acestora este diferită din punct de vedere electrochimic, totuși, după blocare situsurilor nereactive de pe anticorp, straturile au cam aceleași proprietăți izolatoare (Fig.3.26).



(a)[197]



(b)

Fig. 3.26 Voltamograme ciclice pe suprafețe de aur după etapa de funcționalizare și biofuncționalizare cu (a) mSAM₂/activare EDC/Sulfo-NHS/imobilizare anti-*E.coli* și pentru (b) sSAM/activare EDC/NHS/imobilizare anti-*E.coli*. Soluția electrolit este formată din soluție PBS (pH=7,4) și cuplul redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ cu viteza de scanare de 25 mV/s

Morfologia suprafețelor SAMs formate nu a putut fi determinată cu SEM sau AFM. În Figurile 3.34 a și b, se poate observa morfologia bacteriei adsorbită pe suprafața de Au cu anticorpi specifici imobilizați prin adsorbție fizică. Este evident numărul extrem de redus de bacterii imobilizate. Spre deosebire de suprafețele din sticlă, suprafața de Au nefuncționalizată prezintă o hidrofobicitate ridicată și un grad extrem de redus de adsorbție a anticorpilor bacterieni. Este clar că această suprafață necesită un tratament chimic pentru creșterea adsorbției anticorpilor anti-bacterieni pe suprafață deoarece, privită ca o viitoare suprafață senzitivă folosită pentru imobilizarea și detecția bacteriilor, aceasta nu ar fi eficientă.

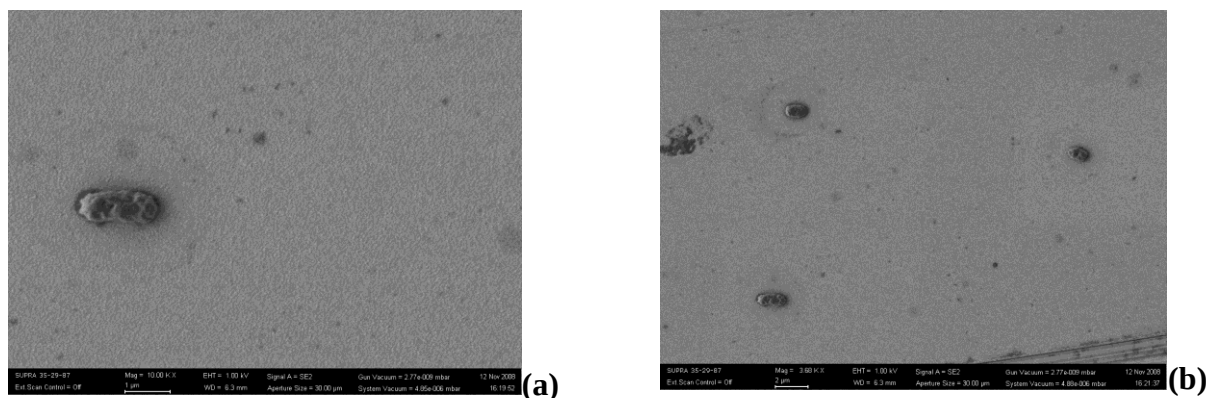


Fig. 3.34 (a,b) Imagini SEM ale bacteriilor imobilizate pe suprafețele de aur prin adsorbția fizică anticorpilor anti-E.coli O157:H7, fără biofuncționalizare (1 μm și 2 μm)

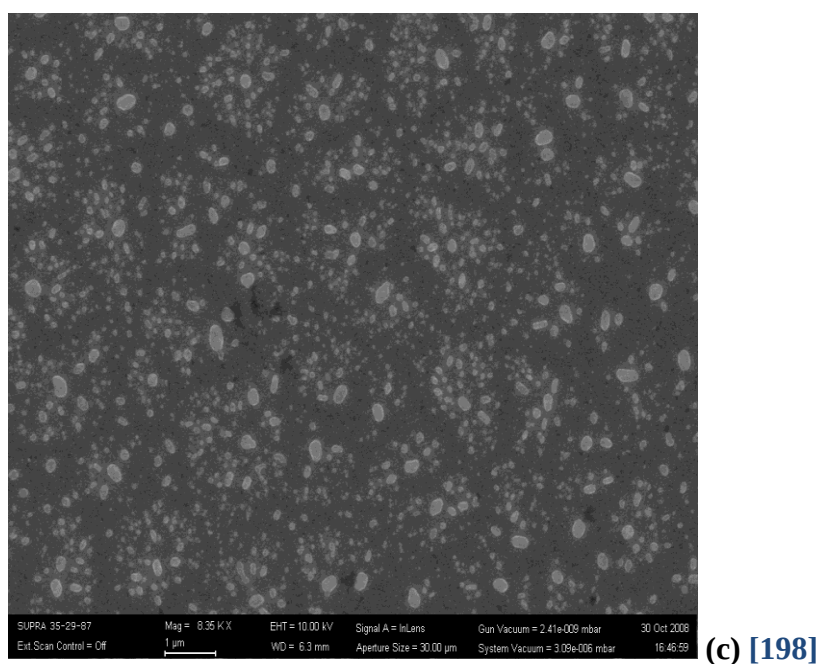
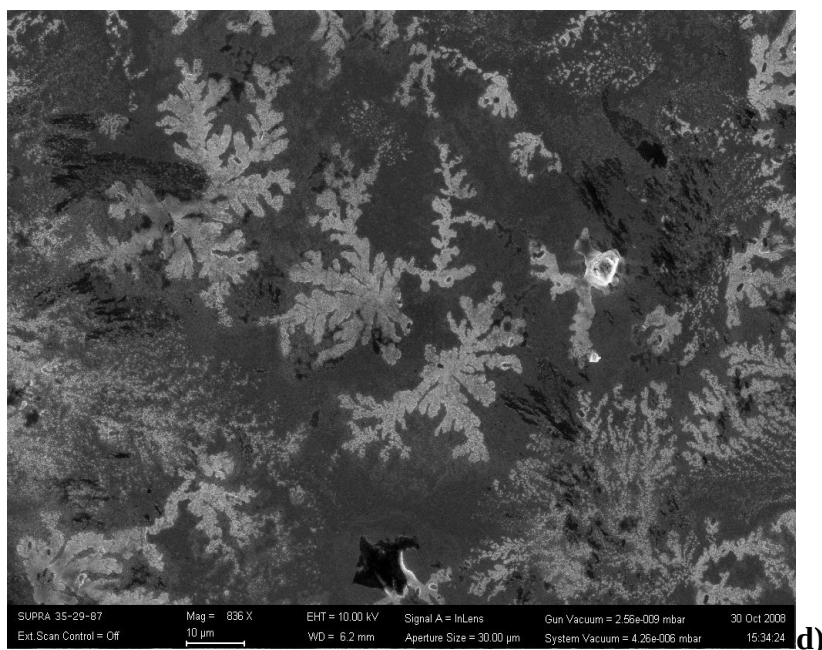


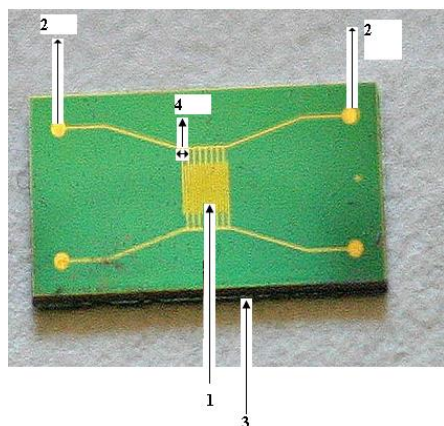
Fig. 3.34 (c) Imagini SEM ale biosuprafeței construite cu Au/mSAM₂/anticorpi anti-bacterieni/BSA (1 μm și 2 μm).



(d) Imagine SEM cu bacteriile imobilizate pe Au/mSAM₂/anticorpi anti-bacterieni/BSA (10 µm, Mag. 836 kX) [198]

Funcționalitatea biosuprafețelor construite a fost demonstrată utilizând și suprafețe nefuncționalizate chimic, prin comparare. S-a elaborat și testat un **protocol nou**, final pe imunosenzorul capacitiv interdigitat pentru detecția acestei bacterii, utilizând platforma de microfluidică descrisă în Capitolul 2. S-au testat și substraturi de siliciu care, comparativ cu cele din aur, au demonstrat o reproductibilitate mai scăzută și o limită de detecție mai ridicată.

După evaluarea morfologică a etapelor de formare a biosuprafeței s-a realizat cuantificarea bacteriei pe suprafețele de aur funcționalizate cu mSAM₂/anti-E. coli și a celor de siliciu funcționalizate cu GOPT/anti-E. coli cu ajutorul unei metode sandwich pe aceste biosuprafețe de tipul tehnicii ELISA. Parametri analitici reprezentați de limita de detecție și coeficienții de variație au prezentat valorile cele mai bune în cazul biosuprafețelor Au/mSAM₂/anticorpi anti-E.coli/BSA. Aceeași metodă a fost folosită pentru funcționalizarea unor suprafețe sub forma unor linii interdigitate de aur ale unui cip realizat în același mod ca și cipurile testate cu proteina hFABP. Acesta are o structură a suprafeței de aur active conform imaginii din Fig. 2.36 b.



1. regiunea cu electrozii de aur interdigitată sau aria activă
2. paduri pentru măsurare (contacte electrice)
3. Imunosenzorul are o arie totală de 7.2 mm²;
4. fiecare electrod de aur are o grosime de 10 microni.

Fig.2.36 b. Dispozitivul utilizat în teză

S-a urmărit același principiu de imunodetecție ca în cazul imunosenzorului capacitiv folosit pentru detecția proteinei h-FAB, astfel: legarea bacteriilor pe biosuprafețele funcționalizate Au/sSAM/anti-E.coli /BSA și respectiv Au/mSAM₁/anti-E.coli /BSA produce o creștere a grosimii straturilor, ceea ce determină modificarea capacității totale pentru fiecare biosuprafață conform ecuației:

$$1/C_t = 1/C_{SAM} + 1/C_{rec} + 1/C_{dl} \quad (1)$$

unde C_t este capacitatea totală la suprafață, C_{SAM} este capacitatea stratului SAM, C_{SL} , capacitatea stratului biologic de recunoaștere și C_{dl} capacitatea stratului difuz.

În condiții optime, pentru biosuprafețele interdigitate **Au/mSAM₂/anti-E.coli/BSA/** s-au obținut modificări de capacitate (ΔC) direct proporționale cu logaritmul concentrației de bacterie adăugate în soluție tampon în domeniul $c_1 = 0$ CFU/mL, $c_2 = 10^2$ CFU/mL, $c_3 = 10^3$ CFU/mL, $c_4 = 10^4$ CFU/mL, $c_5 = 10^5$ CFU/mL, $c_6 = 10^6$ CFU/mL și $c_7 = 10^7$ CFU/mL așa cum putem constata în Fig. 3.45 (A) Ecuația de regresie, coeficientul de regresie R^2 și limita de detecție pentru ambii electrozi sunt prezentați în Tabelul 3.7

Tabel.3.7. Parametri dreaptă calibrare pentru determinare bacterii în tampon PBS

Parametri dreaptă calibrare	Au/mSAM₂/EDC/NHS/anti-E.coli O157:H7/BSA
Ecuație	DC (nF) = -11,00 – 9,55 log $C_{E.coli}$
Coeficient de regresie	$R^2 = 0,982$
Limită de detecție	120 CFU/mL

Trecerea de la “macroarray” la tehnica “microarray” nu a fost decât o chestiune de timp, când în anii 90 cea din urmă a fost utilizată de către Mark Schena și colab. la Universitatea Stanford și aplicată pentru prima dată în studiul ADN-ului [3]. Prin această metodă se pot realiza cipuri cu ajutorul cărora să se poată determina **simultan și cantitativ** mai mulți biomarkeri specifici infarctului de miocard acut (IMA): printre aceștia se află și **biomarker-ul hFABP de mare importanță** dar deocamdată foarte puțin utilizat, care, în mod fiziologic, se găsește în concentrații de ordinul ng/mL în sânge dar își modifică concentrația în timp de câteva ore de la debutul IMA, astfel încât, în funcție de valoarea determinată, medicul poate stabili cu mare precizie debutul, precum și gravitatea afecțiunii.

Există foarte puțini autori care au realizat teste pe această proteină marker cardiac utilizând tehnologia *microarray* dar, mai ales, nu există nicio astfel de biosuprafață nanostructurată de aur de tip *microarray* specifică detecției capacitive de hFABP. Având în vedere toate aceste constatări, dezvoltarea și optimizarea unei strategii pentru **detecția proteinei, marker cardiac, hFABP prin tehnica *microarray*, pe suprafețe de aur, funcționalizate cu straturi auto-asamblate, a fost un alt obiectiv al acestei teze.**

Astfel, **capitolul 4 elaborează protocolul pentru dezvoltarea unui cip *microarray* pentru detecția proteinei marker cardiac hFABP.** Demonstrarea metodelor de funcționalizare pe suprafața cipului a fost realizată prin depunerea anticorpilor marcați cu un fluorofor (cu ajutorul aparatelor de *microarray*), în volume de nanolitri, determinarea intensității de fluorescență a spoturilor și compararea cu o suprafață cu anticorpi specifici imobilizați prin adsorbție fizică în aceleași condiții. Pentru detecția proteinei s-a utilizat reacția imună de tip *sandwich*, astfel că, pe suprafață s-a depus un anticorp nemarcat, monoclonal (de captură), care

ar trebui să recunoască o secvență de aminoacizi specifică din proteina hFABP, iar pentru detecție s-a folosit anticorpul marcat cu fluorofor care recunoaște o secvență distinctă de aminoacizi din structura proteinei față de anticorpul imobilizat pe suprafață. Scanarea în fluorescență a suprafețelor *microarray*, după această reacție, a arătat o intensitate la fluorescență mult diminuată față de intensitatea pe care au înregistrat-o anticorpul de detecție când s-au depus singuri pe suprafață. Deoarece intensitățile de fluorescență în funcție de concentrațiile de proteină hFABP după reacția imună nu s-au putut evalua, am vrut să testăm din punct de vedere fizico-chimic complexul anticorp anti-hFABP în interacție cu fluoroforul și să vedem dacă procedura de conjugare cu fluoroforul nu a afectat secvența de aminoacizi responsabilă de legarea cu proteina (regiunea Fab). Studiul fizico-chimic (fluorescență, dicroism circular, modelare teoretică moleculară) a demonstrat că, într-adevăr, conjugarea acestui anticorp de tip IgG₁ cu fluoroforul comercial, larg folosit, izotiocianatul de fluoresceină (FITC), ar fi putut afecta situsul de legare cu proteina. Experimentele realizate până acum ne-au condus la următorul obiectiv al acestui studiu, și anume ***realizarea unui studiu fizico-chimic complex, comparativ, între un compus fluorescent din clasa indandionelor 2-(2-hidroxi-5-nitrobenziliden)-1,3-indanedionă (HNBID) și cel mai cunoscut fluorofor (FITC) în interacție cu anticorpul anti-hFABP.***

Reprezentarea Stern-Volmer pe domeniul liniar este prezentată în Fig. 4.10 (a) iar valorile K_{SV} sunt date în Tabelul 2. Se poate observa că HNBID are o capacitate de stingere a emisiei proteinei de aproximativ 2,5 ori mai mare comparativ cu FITC. Aceasta înseamnă că este nevoie de cantități mai mici de HNBID pentru a obține același efect asupra anticorpului, cauzând, prin urmare, o perturbare mai mică asupra sistemului studiat [208].

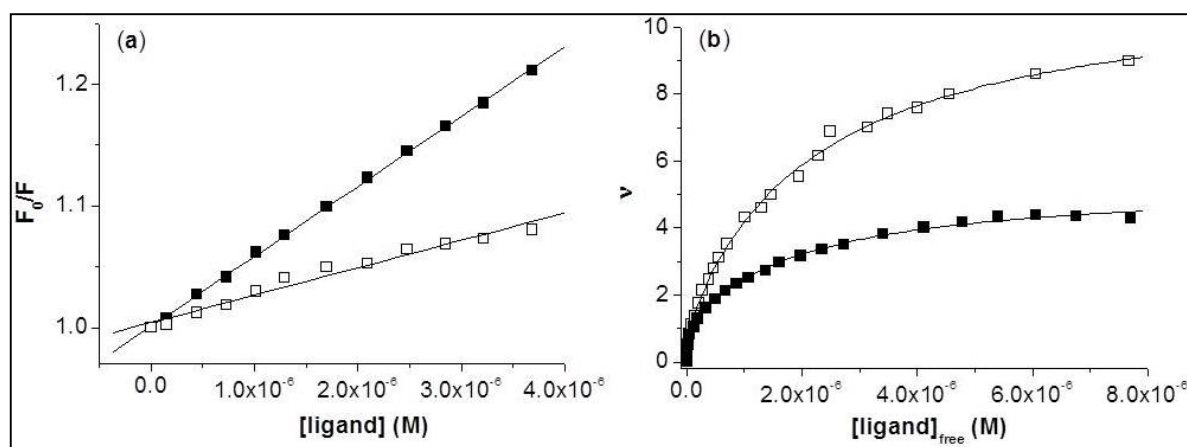


Fig. 4.10 Determinarea parametrilor de stingere (a) și de legare (b) ai sistemelor HNBID–anti-hFABP (■) și FITC–anti-hFABP (□).

Tabel 2. Parametrii de stingere și legare ai sistemelor HNBID–anti-hFABP și FITC–anti-hFABP

Ligand	$K_{SV} \times 10^{-4} (M^{-1})$	$R^{2a}; DS^b; N^c$	$K \times 10^{-6} (M^{-1})$	n	$R^2; DS; N$
HNBID	$5,7 \pm 0,1$	0,999; 0,002; 12	$41,3 \pm 16,8$ $5,2 \pm 0,6$	1 4	0,997; 0,080; 23
FITC	$2,2 \pm 0,1$	0,986; 0,005; 12	$50,4 \pm 30,5$ $0,4 \pm 0,1$	1 10	0,998; 0,142; 23

^a R^2 = coeficient de corelație; ^b SD = deviație standard; ^c N = număr de puncte experimentale.

Parametrii de legare au fost determinați pe baza ecuației Scatchard (2), considerând prezența a două clase independente de situsuri de legare echivalente ($i = 2$) [212, 213]

$$v = \sum_i \frac{n_i K_i [\text{ligand}]_{\text{liber}}}{1 + K_i [\text{ligand}]_{\text{liber}}} \quad (2)$$

unde v reprezintă numărul de moli de ligand legați la un mol de anticorp. Concentrația ligandului liber s-a estimat folosind ecuația (3):

$$[\text{ligand}]_{\text{liber}} = [\text{ligand}] \left(1 - \frac{F - F_{\infty}}{F_0 - F_{\infty}}\right) \quad (3)$$

unde F_{∞} este intensitatea de fluorescență a anti-hFABP la concentrație maximă de ligand iar celelalte mărimi au semnificațiile de mai sus. Se observă că prima clasă de situsuri este constituită dintr-un singur situs de legare, și anume situsul de afinitate mare ($n_1 = 1$), în timp ce a doua clasă cuprinde 4 (în cazul HNBID) respectiv 10 (în cazul FITC) situsuri de legare de afinitate mică (Tabel 2). Localizarea acestor situsuri se va face pe baza docării moleculare așa cum putem vedea în Figura 4.13.

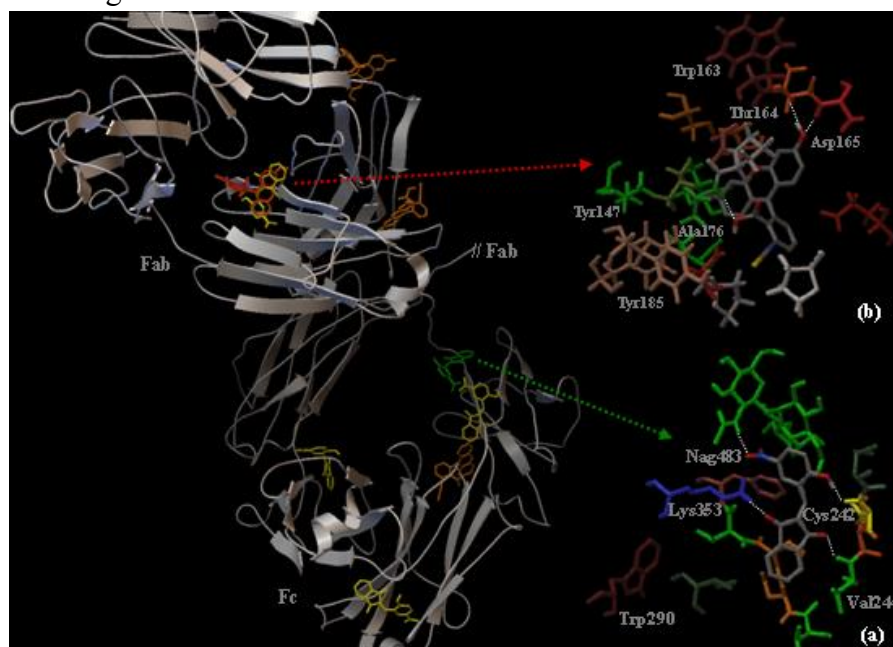


Fig. 4.13 Stânga: Localizarea situsurilor de legare în regiunile Fab și Fc ale IgG₁: HNBID – situs de afinitate mare în Fc (în verde) și situsuri de afinitate mică în Fab și Fc (în galben); FITC – situs de afinitate mare în Fab (în roșu) și situsuri de afinitate mică în Fab și Fc (în portocaliu). Dreapta: Resturile de aminoacizi ale IgG₁ situate pe o distanță de 5 Å de ligand: (a) HNBID, (b) FITC). Legăturile de hidrogen sunt reprezentate cu linii punctate.

Afinitatea HNBID pentru regiunea anticorpului ce conține resturi de oligozaharide ar putea constitui un avantaj, condițiile de marcarea anticorpului putând fi mai blânde.

Rezultatele din acest capitol recomandă HNBID ca o alternativă a FITC pentru uzul ca marker fluorescent pentru anticorpi IgG₁ anti-hFABP. În viitor ne propunem marcarea anti-hFABP cu HNBID, profitând de grupările reactive ale HNBID (-OH și -NO₂) ce pot lega covalent grupări funcționale specifice din regiunea Fc a anticorpului, precum și studierea interacției antigen–

anticorp, cu scopul final de a dezvolta un **fluorescent sandwich microarray immunoassay** pentru detecția proteinei hFABP.

Pe lângă consumul redus de reactivi și de probe biologice îmi pun speranța ca într-un viitor apropiat **biosuprafețele nanostructurate vor conduce, în final, la obținerea unor dispozitive medicale cu potențial mare de portabilitate, proprietate importantă atunci când se pot urmări/detecta biomarkeri importanți în infarctul de miocard acut sau bacterii prezente în probe contaminate.**

LISTA PUBLICAȚIILOR ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT

Cotate ISI:

1. **Mihailescu, C. M.**, Stan, D., Iosub, R., Moldovan, C., & Savin, M, A Sensitive Capacitive Immunosensor for Direct Detection of Human Heart Fatt Binding Protein (H-FABP)/. *Talanta/ 132/ 2015/ 37-43* (factor impact 3,511).
2. Stan, D., **Mihailescu, C. M.**, Savin, M., & Matei, I. (2013). Fluorescein Isothiocyanate in Interaction with Anti-hFABP Immunoglobulin G1: Fluorescence Quenching, Secondary Structure Alteration and Binding Sites Localization. *Int. J. Mol. Sci, 14*, 3011-3025 (factor impact 2,339).
3. Stan, D., **Mihailescu, C. M.**, Iosub, R., Moldovan, C., Savin, M., & Baci, I. (2012). Electrochemical studies of homogeneous self-assembled monolayers versus mixed self-assembled monolayers on gold electrode for “label free” detection of heart fatty acid binding protein. *Thin Solid Films, 526*, 143-149 (factor impact 1,867).
4. Moldovan, C., **Mihailescu, C.**, Stan, D., Ruta, L., Iosub, R., Gavrilă, R., ... & Vasilica, S. (2009). Characterization of self-assembled monolayers (SAMs) on silicon substrate comparative with polymer substrate for *Escherichia coli* O157: H7 detection. *Applied Surface Science, 255*(22), 8953-8959 (factor impact 2,538).

Reviste indexate internațional

1. **Mihailescu, C.**, Stan, D., Ruta, L., Ion, B., Moldovan, C., Schiopu, V., ... & Gavrilă, R. (2008, October). Mixed-monolayers with alkane thiol on gold as substrates for microarray applications. In *Semiconductor Conference, 2008. CAS 2008. International* (Vol. 1, pp. 173-176). IEEE.
2. **Mihailescu, C.**, Baci, I., Stan, D., Moldovan, C., Iosub, R., Dinescu, A., ... & Savin, M. (2011, October). Morphological identification through electron microscopy (SEM) and

Ellipsometric studies of E. coli O157: H7 cells adsorbed onto surface. In *Semiconductor Conference (CAS), 2011 International* (Vol. 1, pp. 105-108). IEEE.

3. Stan, D., **Mihailescu, C.**, Iosub, R., Savin, M., Ion, B., & Gavrilă, R. (2012, October). Development of an immunoassay for impedance-based detection of heart-type fatty acid binding protein. In *Semiconductor Conference (CAS), 2012 International* (Vol. 1, pp. 157-160). IEEE.

Alte articole științifice cotate ISI din domeniu (a căror rezultate nu sunt cuprinse în această teză)

1. Simion, M.; Ruta, L.; **Mihailescu, C.**; Kleps, I.; Brăgaru, A.; Miu, M.; Ignat, T.; Băciu, Ion, Porous silicon used as support for protein microarray, *Superlattices And Microstructures*, 46 (2009), 69-76 (factor impact 1.979).
2. D. Stan, **C. Mihailescu**, C. Paraschivescu, **E. Oprea**, I. C. Fărcașanu, Rev. Chim. 2006, 57 308-311 (factor impact 0.677). Electroforeza proteinelor, o importantă metodă în diagnosticul de laborator clinic.
3. D. Stan, I. Matei, **C. Mihailescu**, M. Savin, M. Matache, M. Hillebrand, I. Băciu "Spectroscopic Investigations of the Binding Interaction of a New Indanedione Derivative with Human and Bovine Serum Albumins"/ *Molecules*/ 2009/ 14/ 1614–1626 (factor impact 2.095)

Rezultatele au fost prezentate și în cadrul altor manifestări științifice :

1. Characterized of self-assembled monolayers (SAMs) on polymer substrate comparative with silicon substrate for *E.coli detection*, Carmen Moldovan, **Carmen Mihailescu**, Dana Stan, 15th- 19th September, 2008, EMRS Conference, Warsaw University of Technology Warsaw (Poland), Book of Abstracts, pagini 287-288.
2. Mixed Self-Assembled Monolayers (SAMs) with alkane thiol on gold as substrates for immunosensors applications /D. Stan, **C. Mihailescu**, C.Moldovan, A. Dinescu, V. Schiopu, R. Iosub, M. Savin, I. Băciu /7th International Conference on Biomedical Application of Nanotechnology, 1-4 decembrie 2010, Berlin – Germania / Book of abstracts pag. 46-48.
3. Dezvoltarea unui nou imunosenzor capacitiv label free pentru detectia *Escherichia coli O157:H7*/ **C-M Mihailescu**, D. Stan, R. Iosub, , M. Savin, C. Moldovan/ Revista Romana de Medicina de Laborator/2013/21/S77-S78.

4. Porous Silicon Surfaces - a Proper Substrate for Microarray Tehnology, M. Simion, **C. Mihailescu**, L. Ruta, T. Ignat, I. Kleps, D. Stan, A. Bragaru, M. Miu, **Advances in Microarray Technology (AMT)**, poster May 2008, Spain.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1]. Turner A.P.F., I. Karube, G.S. Wilson, Biosensors: Fundamentals and Applications, Oxford University Press, Oxford, **1989**, pp.24-36.
- [2]. Thevenot DR, Toth K, Durst R.A, Wilson G.S., **1999**, *Pure Appl. Chem.* 7, 2333-2348.
- [3]. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O., *Science*, **1995**, 270(5235), 467-470.
- [101]. Zou Z., Kai J., Rust M.J., Han J., Ahn C.H., **2007**, *Sensors Actuators A*, 136, 518-526.
- [101]. Boubour, E. . *Ion Transport and Electron Transfer at Self-assembled Alkylthiol/gold Monolayers*. McGill University, 2000, pp.iii.
- [145]. Stan, D., **Mihailescu, C. M.**, Iosub, R., Moldovan, C., Savin, M., & Baci, I., **2012**, *Thin Solid Films*, 526, 143-149.
- [146]. Boubour, E. (2000). *Ion Transport and Electron Transfer at Self-assembled Alkylthiol/gold Monolayers*. McGill University.
- [147]. **Mihailescu, C. M.**, Stan, D., Iosub, R., Moldovan, C., & Savin, M. (2015). *Talanta*, 132, 37-43.
- [152]. Nuzzo R.G., Korenic E.M., Dubois L.H., Allara D.L., **1990a**. *J.Phys.Chem*, 767-773.
- [197]. Moldovan, **C.**, **Mihailescu, C.**, Stan, D., Ruta, L., Iosub, R., Gavrilă, R., & Vasilica, S., **2009**,. *Applied Surface Science*, 255, 8953-8959.
- [198]. **Mihailescu, C.**, Baci, I., Stan, D., Moldovan, C., Iosub, R., Dinescu, A., & Savin, M. (2011, October). Morphological identification through electron microscopy (SEM) and Ellipsometric studies of E. coli O157: H7 cells adsorbed onto surface. In *Semiconductor Conference (CAS), 2011 International (Vol. 1, pp. 105-108)*. IEEE.
- [208]. D. Stan, **CM. Mihailescu**, M. Savin, I. Matei, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 3011–3025.
- [211]. M. R. Eftink, Fluorescence quenching. Theory and applications. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J.R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY, USA, 1999; pp. 53–127
- [212]. Scatchard, G., **1949**, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660–672.
- [213]. Höfliger, M.M.; Beck-Sickinger, A.G. Receptor–ligand interaction. In *Protein-Ligand Interactions from Molecular Recognition to Drug Design*; Böhm, H.J., Schneider, G., Eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2003; p. 113.