
TEZĂ DE DOCTORAT

Noi strategii în design-ul senzorilor cu aplicații analitice și bioanalitice

Doctorand

Oana - Alexandra Hosu

Coordonatori
științifici

Prof. Dr. Robert Săndulescu

Prof. Dr. Christopher M.A. Brett

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU	15
CAPITOLUL I. Noi strategii în design-ul biosenzorilor	17
1.1. Biosenzori electrochimici	17
1.2. Performanțele analitice a unui biosenzor	19
1.3. Nanomateriale electrodice	19
1.4. Bioreceptori	23
1.5. Tehnici de imobilizare a bioreceptorilor	29
CAPITOLUL II. Metode electrochimice	31
2.1. Voltametrica ciclică, puls diferențială și cu undă pătrată	31
2.2. Spectroscopia de impedanță electrochimică	32
2.3. Chronoamperometria	33
2.4. Microbalanța electrochimică cu cristal de cuarț	34
CAPITOLUL III. Cancerul. Metode de diagnostic	35
3.1. Biomarkeri tumorali	36
3.2. Biomarkeri cu importanță clinică	37
CAPITOLUL IV. Analizi de interes	39
4.1. Sonde redox	39
4.2. Molecule țintă de interes farmaceutic	39
4.3. Molecule țintă de interes biomedical	41
CONTRIBUȚII PERSONALE	43
CAPITOLUL. Imunosenzori de afinitate	45
1. Imunosenzor pe bază de particule magnetice modificate cu Proteina G pentru detecția acetaminofenului	45
2. Imunosenzor nemarcat pe bază de oxid de grafenă pentru detecția acetaminofenului	51
3. Imunosenzor colorimetric cuplat cu un smartphone pentru detecția biomarkerului tumoral CA125 (Mucina16)	63
4. Imunosenzor nemarcat pe bază de sare diazoniu pentru detecția selectivă a Mucinei 4	75
CAPITOLUL II. Biosenzori pe bază de platforme nanostructurate	85
5. Materiale hibride nanocompozite pe bază de nanotuburi de carbon și filme polimerice (albastru de metilen) sintetizate în solvenți eutectici	85
CAPITOLUL III. Biosenzori enzimatici	109
6. Elaborarea unor platforme nanostructurate fotoactivabile pe bază de film polimeric de piren-diazirină	109
CONCLUZII GENERALE	119
ORIGINALITATEA TEZEI	121
BIBLIOGRAFIE	123

Cuvinte cheie:

(Bio)senzori, Polimeri, Solvenți eutectici, Nanomateriale, Grafenă, Nanotuburi de carbon, Săruri de diazoniu, Diazirină, Enzimă, Biomarker, Electrochimie

INTRODUCERE

Progresul major în domeniul nanotehnologiei pentru crearea dispozitivelor mici, integrate și fiabile de micro și nano-traductoare în combinație cu elemente de detecție biologică, a revoluționat domeniul biosenzorilor în ultimul deceniu. Astfel de sisteme de biosenzori permit obținerea unui semnal biochimic și biofizic asociat cu o boală specifică la nivelul unei singure molecule sau celule. În prezent, cancerul poate fi diagnosticat prin monitorizarea concentrației anumitor antigene prezente în fluxul sanguin sau în alte fluide ale corpului sau prin examinare histologică. Modificarea electrozilor cu nanomateriale este un deziderat de mare interes pentru domeniul nanoștiinței și al nanotehnologiei, deoarece sistemele compozite obținute pot fi folosite pentru generarea unor platforme cu aplicații multiple, cum ar fi dispozitive optice, chimice, biosensibile sau chiar dispozitive fotovoltaiice. Cu toate acestea, strategiile de imobilizare a biomoleculelor sunt încă o provocare deoarece proprietățile lor specifice trebuie menținute și după imobilizare în vederea obținerii unor senzori fiabili.

Obiectivul principal al tezei de doctorat a fost dezvoltarea unor senzori optici și electrochimici folosind diferite strategii în vederea proiectării unor noi platforme cu aplicații de interes analitic și bioanalitic. În acest context, s-au urmărit câteva direcții pentru îmbunătățirea performanțelor senzorilor, și anume utilizarea polimerilor organici conductori în solvenți eutectici, săruri de aril diazoniu sau reticulatori hibridi foto-electrochimici. Nanomaterialele au fost utilizate singure sau în combinație cu aceste strategii, sporind astfel performanța senzorilor dezvoltati. Aplicabilitatea și performanțele îmbunătățite ale noilor senzori dezvoltati au fost evaluate în vederea detecției unor molecule electroactive, cum ar fi acetaminofenul și acidul ascorbic.

Bioreceptori, precum anticorpi sau enzime, au fost utilizați în vederea creșterii selectivității pentru moleculele țintă. În acest scop, s-au dezvoltat doi imunosenzori pentru detecția mucinelor 4 și 16, în timp ce pentru cei doi senzori enzimatici elaborați s-au utilizat glucozoxidaza și polifenol oxidaza pentru detecția glucozei, respectiv a catecolului.

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU

În *prima parte* a tezei este prezentată o analiză a datelor din literatură precum și introducerea metodologiilor de lucru utilizate și a moleculelor țintă în contextul actual al cercetării în domeniu. Astfel, primul capitol prezintă un scurt istoric, definește și explică utilitatea biosenzorilor și descrie noile strategii de elaborare a acestora¹. Sensibilitatea lor poate fi mărită prin utilizarea nanomaterialelor care îmbunătățesc procesele de transfer de sarcină și determină proprietățile specifice ale suprafeței electrodice². În această parte a lucrării, materialele care reprezintă obiectul tezei sunt specificate și explicate în detaliu, după cum urmează: filme conductoare pe bază de polimeri organici³, filme pe bază de săruri de diazoniu, nanotuburi de carbon, derivați de grafenă și nanoparticule magnetice și metalice. Mai mult decât atât, utilizarea unui compus biologic ca receptor sporește specificitatea senzorilor. În acest context sunt prezentate biomoleculele cel mai frecvent

utilizate (anticorpi, acizi nucleici, aptameri și enzime) și strategiile de imobilizare a acestora la suprafața electrozilor.

Capitolul II prezintă aspecte teoretice privind metodele electrochimice utilizate în teză, și anume voltametria ciclică (CV), voltametria puls diferențială (DPV), voltametria cu undă pătrată (SWV), spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS), microbalanța electrochimică cu cristal de cuarț (EQCM) și cronoamperometria⁴.

Capitolul III se concentrează pe prezentarea biomarkerilor tumorali și a metodelor de diagnosticare a cancerului. Biomarkerii și rolul acestora în diagnosticarea, prognosticul și tratamentul cancerului sunt descrise în acest capitol. De asemenea, se prezintă o clasificare a biosenzorilor electrochimici din literatura de specialitate pentru detectarea anumitor biomarkeri ai cancerului⁵.

Ultimul capitol descrie mai multe molecule de interes analitic și bioanalitic analizate în activitatea de cercetare, implicațiile lor biomedicale, precum și mecanismele electrochimice propuse pe baza rezultatelor obținute experimental.

CONTRIBUȚII PERSONALE

A doua parte a tezei prezintă contribuțiile personale privind design-ul și optimizarea unor senzori electrochimici inovativi pentru atingerea obiectivelor propuse.

Capitolul I, Imunosenzori de afinitate, prezintă date privind dezvoltarea, optimizarea și aplicabilitatea mai multor imunosenzori pentru detecția acetaminofenului și a doi biomarkeri tumorali (MUC16 și MUC4). În acest scop, nanomateriale, precum nanoparticule magnetice și metalice, derivați de grafenă și filme pe bază de sare de diazoniu au fost utilizate pentru a dezvolta platformele în vederea imobilizării bioreceptorilor. Au fost evaluate performanțele analitice ale imunosenzorilor, cum sunt limita de detecție, reproductibilitatea și selectivitatea în matrici complexe. Rezultatele obținute au fost publicate în cinci articole în reviste internaționale ISI de profil^{6,7,8,9,10}.

1. Imunosenzor pe bază de particule magnetice modificate cu Proteina G pentru detecția acetaminofenului⁶

Scopul studiului a fost dezvoltarea unui imunosenzor electrochimic bazat pe anticorpus anticetaminofen ca element de recunoaștere moleculară pentru detecția acetaminofenului (APAP). În acest scop, nanoparticulele magnetice modificate cu proteina G (Invitrogen) au fost incubate cu anticorpus anticetaminofen în vederea legării biocomponentului prin intermediul legăturii amidice. Locurile active rămase libere au fost blocate cu albumină din ser bovin, apoi platforma de tip sandwich a fost pusă în contact cu o soluție de acetaminofen. Analizele EIS au fost efectuate în prezența sondei redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/4-$ care a permis evaluarea variațiilor înregistrate pentru rezistența la transferul de sarcină (R_{ct}) după fiecare etapă de incubare, variații care demonstrează modificarea suprafeței cu nanoparticule magnetice. Imunosenzorul optimizat a fost testat utilizând EIS și DPV.

Performanțele analitice ale imunosenzorului pe bază de proteină G pentru detecția APAP au fost optimizate luând în considerare parametri, cum ar fi, concentrația și timpul de incubare cu soluția de anticorpus, agentul de blocare și molecula țintă. În condiții optimizate, s-a obținut o variație lineară a semnalului analitic înregistrat în funcție de concentrația soluțiilor de APAP în domeniul de la 0 până la 0,75 mM cu limita de detecție (LoD) de 1,76

μM și o limita de cuantificare (LoQ) de $5,28 \mu\text{M}$. Imunosenzorul a fost testat cu succes pe probe reale provenite din două produse farmaceutice comerciale: Panadol® și Panadol Extra®. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele raportate de producător, iar gradele de regăsire a APAP în ambele forme farmaceutice sunt situate între 96,6% și 103,7%, atât pentru produsul farmaceutic care conține doar APAP, cât și pentru cel care conține APAP și cafeină.

2. Imunosenzor nemarcat pe bază de oxid de grafenă pentru detecția acetaminofenului⁷

Un alt tip de imunosenzor care a fost elaborat și prezentat în primul capitol se referă la un nou imunosenzor nemarcat bazat pe electrozi serigrafiați pe bază de grafit, modificați cu oxid de grafenă activată pentru detecția selectivă a acetaminofenului. Scopul principal al utilizării grafenei activate a fost optimizare a vitezei de transfer a electronilor între electrod și centrele active ale biocomponentului prin intermediul canalelor electronice directe, evitând astfel necesitatea folosirii mediatorilor. Grafena modificată a fost depusă pe electrozii serigrafiați pe bază de grafit printr-o metodă strat-cu-strat, iar platforma nanostructurată obținută a fost utilizată pentru imobilizarea moleculelor de anticorp anti-APAP.

Determinările EQCM au fost utilizate pentru evaluarea masei depuse pe suprafața electrodului în timpul elaborării testului imunologic. Toate etapele implicate în construirea imunosenzorului au fost optimizate și caracterizate folosind SWV, EIS și EQCM. Imunosenzorul dezvoltat a fost testat cu succes din preparate farmaceutice, precum și din ser uman comercial, prezentând o valoare LoD de $0,17 \mu\text{M}$ și demonstrând astfel aplicabilitatea senzorului în analize biomedicale fără necesitatea unei separări anterioare.

3. Imunosenzor colorimetric cuplat cu un smartphone pentru detecția biomarkerului tumoral CA125 (Mucina16)⁸

Cel de-al treilea biosenzor dezvoltat în această teză este reprezentat de un senzor colorimetric ce utilizează un smartphone pentru detecția CA125 (antigen de cancer 125) (fig. 1).

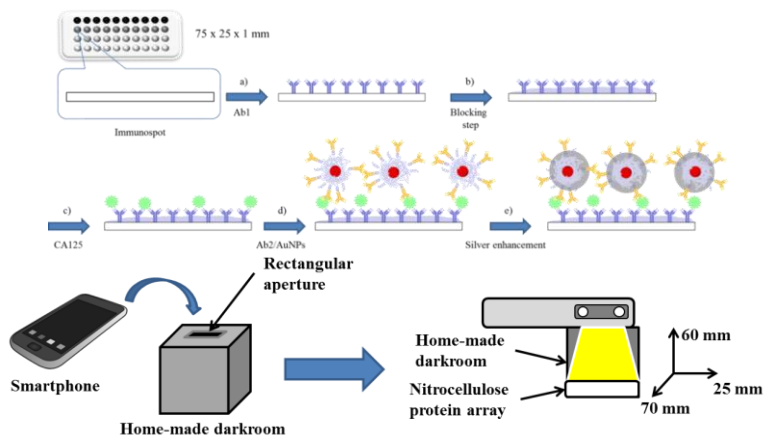


Fig. 1. Reprezentarea schematică a imunosenzorului cuplat cu un smartphone pentru analiza biomarkerului tumoral CA125

Biosenzorul elaborat este un imunosenzor de tip sandwich în care anticorpul primar a fost imobilizat prin depunerea soluției de anticorp pe o membrană de nitroceluloză. Ulterior, spot-urile obținute au fost puse în contact cu antigenul CA125, etapă urmată de reacția de afinitate cu un anticorp secundar conjugat cu nanoparticule de aur (AuNP). O soluție de argint a fost utilizată în vederea amplificării semnalului, datele experimentale arătând că această reacție poate fi vizibilă cu ochiul liber. Formarea nanoparticulelor de Au-Ag are ca rezultat obținerea de diferite tonuri de gri, colorație dependentă de concentrația de CA125. Camera foto a smartphone-ului a fost utilizată ca detector de culoare pentru achiziția imaginilor și prelucrarea datelor printr-o aplicație specifică (fig.1).

Parametrii implicați în fiecare etapă a design-ului senzorului de afinitate au fost optimizați. A fost studiată performanța imunotestului în ceea ce privește sensibilitatea, reproductibilitatea și selectivitatea. În condiții optime, s-a obținut o corelație cantitativă între scăderea procentuală a valorii culorii (% V) și a concentrației CA125 în intervalul 30 – 1000 U mL⁻¹ ($y = -0.08x + 70$, $R^2 = 0.98$). A fost găsită o valoare a LoD (S/N 3) de 30 U mL⁻¹ și o LoQ (S / N 10) de 100 U mL⁻¹. Metoda descrisă este simplă, rapidă și poate fi utilizată fără a necesita un personal de operare cu înaltă calificare și instrumente scumpe, reprezentând o alternativă de analiză a biomarkerilor tumorali cu reducerea semnificativă costurilor și a timpului de răspuns.

4. Imunosenzor nemarcat pe bază de sare diazoniu pentru detecția selectivă a Mucinei 4^{9,10}

Cel de-al patrulea imunosenzor a fost dezvoltat pentru detecția MUC4 prin utilizarea unei platforme pe bază de aril diazoniu grefat electrochimic la suprafața electrodului de grafit în vederea imobilizării covalente a anticorpului. Mucina 4 este exprimată în mod normal în celulele epiteliale ale căilor respiratorii, în laptele matern, salivă, fluidele urechii și ochilor, în timp ce expresia aberantă a fost raportată în carcinoame pancreatice, mamare, ovariene, colorectale și a vezicii urinare. Platforma de imobilizare a fost obținută prin grefarea electrochimică a ionilor aril diazoniu generați *in-situ* pornind de la acidul *p*-aminofenilacetic pe electrozii serigrafiați de grafit. Filmul aril-carboxilic rezultat a fost apoi funcționalizat cu anticorpul antiMUC4 prin intermediul terminațiilor aminice.

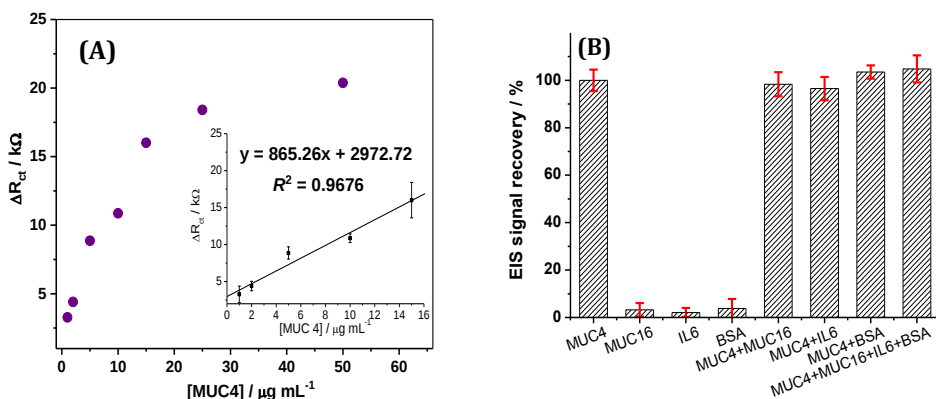


Fig. 2. (A) Curbă de calibrare pentru detecția MUC4; (B) Semnal EIS pentru: 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ soluție MUC4, MUC16, IL-6, BSA, și soluții mixte ale acestor proteine având aceeași concentrație (30 min)

Etapale de elaborare implicate în construirea imunosenzorului au fost optimizate pentru a obține cea mai bună performanță analitică. O ecuație de regresie liniară ($R^2 = 0,968$, $RSD = 3,9\%$) a fost obținută în intervalul de concentrație pentru soluțiile de MUC4 $1 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$ cu o valoare LoD de $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ (S/N 3). S-a obținut o valoare medie acceptabilă pentru deviația relativă standard a valorilor R_{ct} de $4,6\%$, indicând o bună reproductibilitate între diferiți senzori. Evaluarea selectivității biosenzorului pentru MUC4 a fost realizată suplimentar prin examinarea valorilor R_{ct} obținute în prezența altor proteine (fig.2), cum sunt albumina serică bovină (BSA), interleukina 6 (IL-6) și mucina 16 (MUC16). Noul imunosenzor nemarcat permite detecția electrochimică sensibilă și selectivă a MUC4 în probe reconstituite în ser uman. Gradele de regăsire au fost de $101,6\%$ ($n = 3$) cu o valoare RSD de $1,4\%$, demonstrând astfel potențialul acestui imunosenzor pentru aplicații biomedicale și clinice.

Capitolul II, dedicat **Biosenzorilor pe bază de platforme nanostructurate**, tema care reprezintă un alt obiectiv principal al tezei, mai precis dezvoltarea de noi platforme nanostructurate pentru elaborarea biosenzorilor pe bază de materiale hibride, și anume nanotuburi de carbon și filme de polimer redox formate în solvenți eutectici (DES) și soluții apoase. În vederea caracterizării noilor materiale s-au folosit tehnici, cum ar fi, CV, DPV, SWV, EIS, EQCM și microscopia electronică. Aplicabilitatea senzorului a fost demonstrată prin analiza unor molecule de interes farmaceutic (acid ascorbic și acetaminofen), rezultatele fiind publicate în două articole ISI în reviste internaționale^{11,12}.

5. Materiale hibride nanocompozite pe bază de nanotuburi de carbon și filme polimerice (albastru de metilen) sintetizate în solvenți eutectici^{11,12}

Materialele hibride bazate pe polimeri redox conductori/electroactivi și nanotuburi de carbon (CNT) au primit o atenție deosebită în ultimii ani în domeniul bioanalizei, în special în ceea ce privește dezvoltarea biosenzorilor, datorită capacității lor de a-și adapta structura și spori sensibilitatea și activitatea electrocatalitică. Prin urmare, s-au dezvoltat compozite hibride formate din filme polimerice de poli(albastru de metilen) realizate prin electropolimerizare în solvenți eutectici (PMB_{DES}) și din CNT (fig. 3).

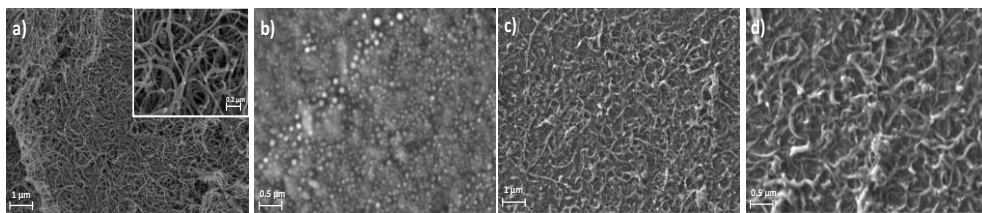


Fig. 3. Imagini microscopice ale a) CNT, b) PMB_{DES} , c) și d) CNT acoperite cu PMB_{DES} obținute la două rezoluții

Polimerul sintetizat în DES prezintă caracteristici nanostructurate care au îmbunătățit activitatea electronică de conductivitate/redox comparativ cu analogul obținut în mediu apos și, împreună cu CNT, a permis construirea unor senzori electrochimici cu performanțe îmbunătățite. S-au obținut valori ale LoD de $13,8 \mu\text{M}$ și $1,6 \mu\text{M}$, cu sensibilități excelente de

$2.2 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, și $68.7 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, pentru acidul ascorbic, respectiv acetaminofen, valori care surclasează alți senzori din literatură. Noii senzori au demonstrat o bună stabilitate, reproductibilitate, repetabilitate și factori de regăsire ridicați atunci când au fost aplicați pentru analiza unor formulări farmaceutice. Nouă metodă elaborată permite detecția simplă și cu o sensibilitate ridicată a analiților de interes din matrici complexe, dovedind astfel avantajul utilizării solvenților eutectici în dezvoltarea senzorilor electrochimici.

În **Capitolul III**, intitulat **Biosenzori enzimatici**, este prezentată o nouă strategie de imobilizare a biomoleculelor la suprafața electrodului. Se investighează sinteza și caracterizarea unui nou derivat de diazirină (piren-diazirina). Filmele electrogenerate de poli(piren-diazirină) și parametri implicați în reacția de electropolimerizare au fost caracterizați și optimizați. Prin combinarea noilor filme polimerice cu CNT au fost evaluate diferite arhitecturi ale biosenzorilor. Capacitatea de imobilizare a biomoleculelor a fost investigată prin intermediul a două enzime (glucozoxidază și polifenol oxidază). Rezultatele obținute în această secțiune a tezei au fost publicate sub forma a două articole în reviste ISI^{13,14}.

6. Elaborarea unor platforme nanostructurate fotoactivabile pe baza de film polimeric de piren-diazirină^{13,14}

Prin combinarea proprietăților foto- și electro-chimice, se poate dezvolta un instrument versatil pentru imobilizarea biomoleculelor (enzime, anticorpi, aptameri) pe suprafețe nanostructurate. Astfel, s-a realizat dezvoltarea unei noi platforme de imobilizare bazată pe utilizarea unui nou derivat de diazirină (piren-diazirină) pentru legarea proteinelor. Prin iradiere cu lumina UV, diazirinele formează intermediari carbenici foarte reactivi, care pot reacționa cu legăturile C-H, N-H și O-H, făcându-le reactivi de reticulare foto-reactivi excelenți. În acest sens, s-a sintetizat un nou compus, care a fost ulterior depus pe electrozii modificați cu CNT, cât și electropolimerizarea acestuia pe suprafața electrozilor de platină (Pt), cât și a arhitecturii Pt/CNT.

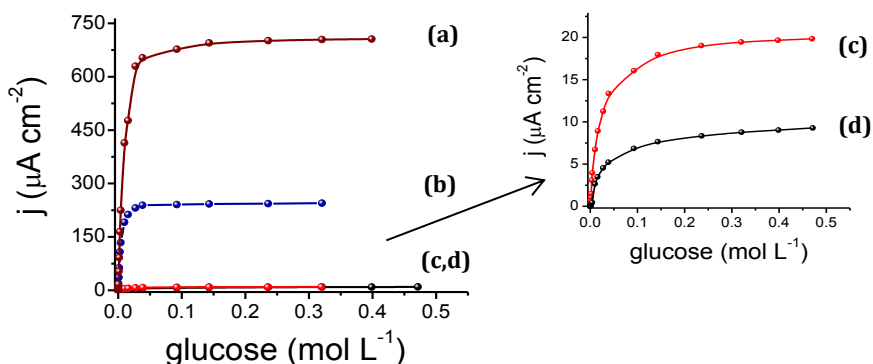


Fig. 4. Curbe de calibrare pentru detecția glucozei obținute la: **(a)** Pt/CNT/poly-1/GOx iradiat UV, **(b)** Pt/CNT/1/GOx iradiat UV, **(c)** Pt/poly-1/GOx iradiat UV, **(d)** Pt/poly-1/GOx neiradiat în 0.1 M PBS (pH 7.0)

Parametrii de electropolimerizare au fost optimizați, iar filmele polimerice au fost caracterizate prin CV. Diferite configurații ale electrozilor modificați au fost evaluate pentru a demonstra fotoreactivitatea lor. Astfel, s-au dezvoltat doi senzori enzimatici pentru

detectia glucozei (fig.4) și a catecolului, obținându-se valori ale densităților de curent de 706 $\mu\text{A cm}^{-2}$ și 677 $\mu\text{A cm}^{-2}$ prin utilizarea celui mai bun design arhitectural și anume CNT/poly(piren-diazirină) deasupra electrozilor de Pt sau GCE. Rezultatele obținute au demonstrat eficiența ridicată a fotogrefării enzimelor, demonstrând potențiala lor utilizare în imobilizarea fotoelectrochimică a biomoleculelor.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Studiile prezentate în această lucrare prezintă diferite strategii de elaborare a biosenzorilor bazate pe diverse nanomateriale în vederea modificării suprafețelor electrodice, cum ar fi filmele polimerice conductive organice, filmele pe bază de sare de diazoniu, nanotuburile de carbon, derivații de grafenă, nanoparticulele metalice și magnetice. Aceste materiale nanostructurate integrate îmbunătățesc sensibilitatea senzorilor dezvoltati și facilitează imobilizarea biomoleculelor atunci când este necesar. Astfel, rezultatele au un impact important în domeniul senzorilor, deoarece sistemele dezvoltate prezintă o bună reproductibilitate, factori de regăsire ridicați, precum și o bună sensibilitate pentru analiza moleculelor de interes farmaceutic și biomedical.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Marrazza G, Minunni M, Palchetti I. To the memory of Marco Mascini: His contribution in the field of biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016;79:2–8.
2. Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem.* 2014;2:63.
3. Barsan MM, Ghica ME, Brett CMA. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Anal Chim Acta.* 2015;881:1–23.
4. Brett CMA, Oliveira Brett AM. *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
5. Hosu O, Selvolini G, Cristea C, Marrazza G. Electrochemical immunosensors for disease detection and diagnosis. *Curr Med Chem.* 2017, DOI: 10.2174/0929867324666170727104429.
6. Hosu O, Tertis M, Săndulescu R, Cristea C. Protein G magnetic beads based immunosensor for sensitive detection of acetaminophen. *Farmacia.* 2015;1:140–145.
7. Tertis M, Hosu O, Fritea L, et al. A novel label-free immunosensor based on activated graphene oxide for acetaminophen detection. *Electroanalysis.* 2015;27(3):638–647.
8. Hosu O, Ravalli A, Lo Piccolo GM, Cristea C, Sandulescu R, Marrazza G. Smartphone-based immunosensor for CA125 detection. *Talanta.* 2017;166:234–40.
9. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Săndulescu R, Cristea C. Mucin 4 Detection with a Label-Free Electrochemical Immunosensor. *Electrochem Commun.* 2017;80:39–43.
10. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Săndulescu R, Cristea C. Mucin 4 immunosensor based on p-aminophenylacetic acid grafting on carbon electrodes as immobilisation platform. *Procedia Tech.* 2017;27:110–111.
11. Hosu O, Barsan MM, Cristea C, Sandulescu R, Brett CMA. Nanostructured electropolymerized poly(methylene blue) films from deep eutectic solvents. Optimization and characterization. *Electrochimica Acta.* 2017;232:285–295.
12. Hosu O, Barsan MM, Cristea C, Sandulescu R, Brett CMA. Nanocomposites based on carbon nanotubes and redox-active polymers synthesized in a deep eutectic solvent as a new electrochemical sensing platform. *Microchimica Acta.* 2017, 1–9, DOI 10.1007/s00604-017-2420-z.
13. Hosu O, Elouarzaki K, Gorgy K, Cristea C, Săndulescu R, Marks RS, Cosnier S. Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazirine. *Electrochem Commun.* 2017;80:5–8.
14. Elouarzaki K, Hosu O, Gorgy K, Cristea C, Săndulescu R, Marks RS, Cosnier S. Towards a versatile structured photoactivatable platform based for biosensing applications. *J Anal Test.* 2017;1(2):16, DOI 10.1007/s41664-017-0016-6.

PhD THESIS

New strategies in sensor design for analytical and bioanalytical applications

PhD Student

Oana – Alexandra Hosu

PhD Supervisors

Prof. Robert Săndulescu, PhD
Prof. Christopher M.A. Brett, PhD

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	15
CHAPTER I. New Strategies for Biosensor Design	17
1.1. Electrochemical biosensors	17
1.2. Performance of a biosensor	19
1.3. Electrode modifiers	19
1.4. Bioreceptors	23
1.5. Bioreceptor immobilisation techniques	29
CHAPTER II. Electrochemical Methods	31
2.1. Cyclic, differential pulse and square wave voltammetry	31
2.2. Electrochemical impedance spectroscopy	32
2.3. Chronoamperometry	33
2.4. Electrochemical quartz crystal microbalance	34
CHAPTER III. Cancer and Methods of Diagnosis	35
3.1. Cancer biomarkers	36
3.2. Clinical biomarkers	37
CHAPTER IV. Target Molecules	39
4.1. Redox probes	39
4.2. Pharmaceutical analytes	39
4.3. Biomedical analytes	41
PERSONAL CONTRIBUTIONS	43
CHAPTER I. Affinity Immunosensors	45
1. Protein G magnetic beads based immunosensor for acetaminophen detection	45
2. Graphene oxide based label-free immunosensor for acetaminophen detection	51
3. Smartphone based immunosensor for CA125 (Mucin16) detection	63
4. Diazonium salt based label free immunosensor for sensitive detection of Mucin 4	75
CHAPTER II. Nanostructured Platforms for Biosensor Development	85
5. Nanocomposite hybrid materials based on carbon nanotubes and poly(methylene blue) films synthesized in deep eutectic solvents	85
CHAPTER III. Enzyme Biosensors	109
6. Nanostructured pyrene diazirine based film for the development of photoactivatable platform	109
GENERAL CONCLUSIONS	119
ORIGINALITY OF THE THESIS	121
REFERENCES	123

Keywords:

(Bio)sensors, Polymer, Deep eutectic solvent, Nanomaterial, Graphene, Carbon nanotubes, Diazonium chemistry, Diazirine, Enzyme, Biomarker, Electrochemistry;

INTRODUCTION

The major progress in nanotechnology for creating small, integrated and reliable micro- and nano-transducers devices in combination with biological sensing elements has revolutionized the field of biosensors during the last decade. Such biosensor systems raised the expectation to get any biochemical and biophysical signal associated with a specific disease at the level of a single molecule or cell. Currently, cancer can be detected by monitoring the concentration of certain antigens present in the bloodstream or other bodily fluids, or through tissue examinations. The modification of electrodes based on nanomaterials is of great interest in nanoscience and nanotechnology as they can be used to generate platforms for many applications such as optical, chemical, biosensing, or even in photovoltaic devices. However, the immobilisation strategies of biomolecules are still a challenge as their specific properties must be retained after immobilisation, to get reliable sensors.

The main objective of this thesis was the development of various electrochemical and optical sensors using different strategies for designing new platforms for analytical and bioanalytical applications. In this context, several directions were followed in order to increase the performance of the sensors, namely, the use of conductive organic polymers in deep eutectic solvents, aryl diazonium chemistry, or photo-electrochemistry hybrid cross-linkers. Nanomaterials were used alone or in combination with these strategies, thereby enhancing the performance of the developed sensors. The applicability and the greatly improved performance of the newly developed sensors were assessed with electroactive molecules such as acetaminophen and ascorbic acid.

In order to establish a better selectivity for the target molecules, bioreceptors such as antibodies or enzymes were used. For this purpose, two immunoassays for Mucin4 (MUC4) and Mucin16 (MUC16) were developed, whereas for enzymatic sensors glucose oxidase and polyphenol oxidase for glucose and catechol determinations were considered.

STATE OF THE ART

In the *first part* of the thesis, an analysis of the literature data is presented by introducing the developed work research. Thereby, the first chapter presents a short historical review, defines and explains the utility of biosensors, and describes the new strategies for the elaboration of biosensors¹. Thus, their sensitivity can be increased by the use of nanomaterials improving the charge transfer processes and determining electrode-surface specific properties². In this part of the thesis, the materials which represent the subject of the thesis are specified and explained in detail, as it follows: conductive organic polymer based films³, diazonium salt-based films, carbon nanotubes, graphene and magnetic or metallic nanoparticles, respectively. The use of a biological compound as a receptor increases the specificity of the sensors. In this context, the most frequently used biomolecules (antibodies, nucleic acids, aptamers, and enzymes) and their immobilization strategies at the electrode surface are presented.

Chapter II presents theoretical aspects of the electrochemical methods used in the thesis, namely cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical quartz crystal microbalance, and chronoamperometry⁴.

Chapter III is focusing on the presentation of biomarkers and cancer diagnosis methods. Biomarker-type substances and their role in the diagnosis, prognostic and treatment of cancer are described. A classification of electrochemical biosensors found in the literature for the detection of certain cancer biomarkers is also presented⁵.

The **last chapter** describes several analytical and bioanalytical target molecules which were analysed in the research work. Their biomedical implications and the proposed electrochemical mechanism that take place during the analysis are reported.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The second part of the thesis, presents the motivation, the objectives, but also the strategies used to reach the proposed objectives of this thesis.

Chapter I, concerning **Affinity Immunosensors**, presents the development, optimization and application of several immunosensors for acetaminophen and two cancer biomarkers (MUC16 and MUC4) detection. For this purpose, nanomaterials such as magnetic and metallic nanoparticles, graphene, and diazonium salt based films were used to develop the platforms for bioreceptor immobilisation. The analytical performance of the immunosensors, such as limit of detection, reproducibility and selectivity in complex matrices were evaluated. The results were published in five ISI articles in international journals.

1. Protein G magnetic beads based immunosensor for acetaminophen detection⁶

The aim of the study was to develop an electrochemical immunosensor based on acetaminophen (APAP) antibody as a molecular recognition element for the detection of acetaminophen. For this purpose, magnetic nanoparticles modified with Protein G (Invitrogen) were incubated with acetaminophen antibody in order to bind the biocomponent within the amidic bond. The unoccupied active sites were then blocked with Albumin from bovine serum and the sandwich type assay was incubated with acetaminophen. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were carried out in the presence of the redox probe $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ which showed variations in charge transfer resistance (R_{ct}) after each incubation step, then proving the MBs surface modification. The optimized immunosensor was tested using EIS and differential pulse voltammetry (DPV).

The analytical performances of protein G MNPs-based immunosensor for APAP detection was optimized with respect to several parameters such as concentration and incubation time with the antibody solution, blocking agent, and target molecule. Under optimized conditions, a linear calibration curve of APAP solutions was obtained in the range from 0 to 0.75 mM with 1.76 μM LoD and 5.28 μM LoQ. The immunosensor was successfully tested on real samples obtained from two pharmaceutical products:

Panadol® and Panadol Extra®. The results were consistent with those reported by the manufacturer, and the recoveries rates of APAP in both pharmaceuticals were found between 96.6 % and 103.7 %, whether alone (Panadol®) or in the presence of caffeine (Panadol Extra®).

2. Graphene oxide based label-free immunosensor for acetaminophen detection⁷

Another type of immunosensor that was elaborated and presented in the first chapter involves a novel label-free immunosensor based on screen-printed electrodes modified with activated graphene oxide for the selective detection of acetaminophen. The main goal of using graphene modified electrodes was to increase the electron transfer between electrode and the active centres of the biocomponent by means of direct electron channelling, avoiding the necessity to use mediators. The modified graphene was deposited onto graphite based screen-printed electrodes via a layer-by-layer method and the obtained nanostructured platform was used for antiacetaminophen antibody immobilisation during the immunosensor development.

Electrochemical quartz microbalance measurements were performed in order to assess the mass deposition on the electrode surface during the elaboration of the immunoassay. All the steps involved in the construction of the assay were optimised and the sensor was characterised using square wave voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and electrochemical quartz crystal microbalance. The developed immunosensor was successfully tested in the presence of pharmaceutical formulations, as well as in human serum, presenting a LoD of 0.17 μM , demonstrating that the sensor could be applied in drugs and biomedical analysis without prior separations.

3. Smartphone based immunosensor for CA125 (Mucin16) detection⁸

A third biosensor developed in this thesis was created as a smartphone based colorimetric sensor used for the detection of CA125 (antigen cancer 125) (fig. 1).

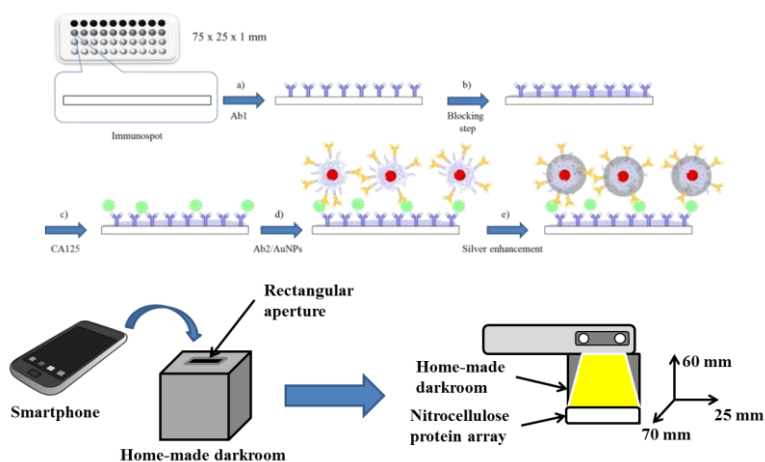


Fig. 1. Schematic representation of smartphone-based immunoassay for CA125 analysis

The biosensor is based on a sandwich immunoassay in which the primary antibody was immobilized by spotting the antibody solution on nitrocellulose membrane. Subsequently, the spots were incubated with CA125 antigen followed by affinity reaction with a secondary antibody conjugated to gold nanoparticles (AuNP). The silver enhancement reaction was introduced to magnify the signal detection. The experimental data show that this reaction can be visible by the naked eye. The formation of gold-silver nanoparticles results in a different grey colour, depending on CA125 concentration. The smartphone camera was used as colour detector, for image acquisition and data handling via a specific application (fig. 1).

The parameters involved in each step of the affinity sensor design were optimized. The performance of the immunoassay in terms of sensitivity, reproducibility and selectivity was studied. Under optimal conditions, a quantitative correlation between the percentage decrease of color value (%V) and the CA125 concentration in the range of 30 – 1000 U mL⁻¹ ($y = -0.08x + 70$, $R^2 = 0.98$) was obtained. A LoD (S/N 3) of 30 U mL⁻¹ and a LoQ (S/N 10) of 100 U mL⁻¹ were found. The method is simple, fast, and could be performed without requiring highly skilled operating personnel and expensive instrumentation allowing point-of-care analysis with reductions in cost and response time.

4. Diazonium salt based label free immunosensor for sensitive detection of Mucin 4^{9,10}

Another electrochemical immunosensor was developed for the detection of MUC4 by using electrochemical reduction of diazonium salts for the covalent attachment of the antibody. Mucin 4 (MUC4) is normally expressed in airway epithelial cells, in breast milk, saliva, ear and eye fluids, while its aberrant expression has been reported in pancreatic, breast, lung, ovarian, colorectal, and bladder carcinomas. The sensing platform was obtained by electrochemical grafting of *in-situ* generated aryl diazonium ions from *p*-aminophenylacetic acid onto the graphite-based electrodes. The nanoscale film was then functionalized by amino-terminated antibody using standard peptide chemistry.

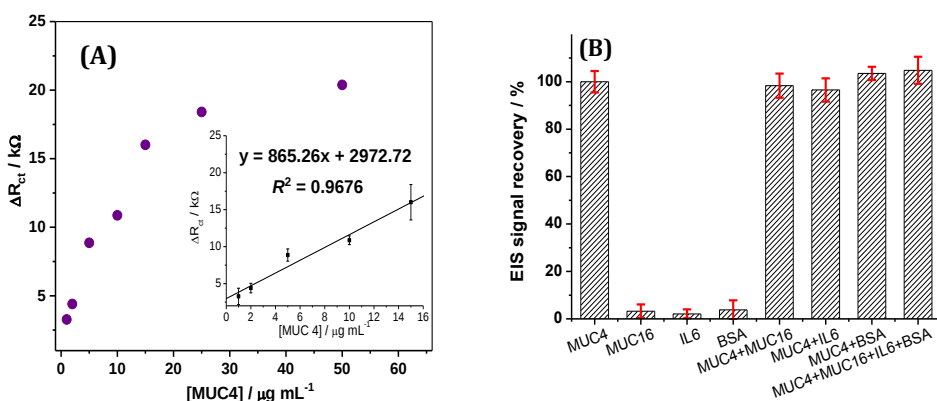


Fig. 2. (A) Calibration curve of MUC4; **(B)** EIS signal for: 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MUC4, MUC16, IL-6, BSA, and mixtures of these proteins at the same concentration (30 min)

The elaboration steps involved in the immunosensor construction were optimized in order to obtain the best performance of the assay. A linear regression equation ($R^2 = 0.968$, $RSD = 3.9\%$) was obtained in the range between 1 and $15\ \mu\text{g mL}^{-1}$ MUC4 solutions with a LoD of $0.33\ \mu\text{g mL}^{-1}$ based on a ($S/N\ 3$). An acceptable average RSD for the R_{ct} values of 4.6% was obtained indicating good inter-sensor reproducibility. The evaluation of the selectivity of the biosensor for MUC4 was further assessed by examining R_{ct} obtained in the presence of other proteins (fig. 2), such as bovine serum albumin (BSA), interleukin 6 (IL-6) and cancer antigen 125 (MUC16). The novel label-free immunosensor allows the sensitive and selective electrochemical detection of MUC4 in spiked human serum samples. The recovery was 101.6% ($n = 3$) with an RSD of 1.4% , thus proving its potential for biomedical and clinical applications.

Chapter II, dedicated to **Nanostructured Platforms for Biosensor Development**, holds another main objective of the thesis, which is the development of new nanostructured platforms for biosensors elaboration based on hybrid materials, namely carbon nanotubes and redox polymer films formed in deep eutectic solvents and aqueous solutions. Techniques such as cyclic, square wave and differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical quartz crystal microbalance, scanning electron microscopy were used to characterise the new materials. The applicability of the sensor was demonstrated using several pharmaceutical molecules (ascorbic acid and acetaminophen). The results were published in two ISI articles in international journals.

5. Nanocomposite hybrid materials based on carbon nanotubes and poly(methylene blue) films synthesized in deep eutectic solvents^{11,12}

Hybrid materials based on conducting/electroactive redox polymers and carbon nanotubes (CNT) have received considerable attention in recent years in the bioanalytical field, especially for biosensor development, due to their capability of tailoring their structure and enhancing the sensitivity and electrocatalytic activity of the corresponding biodevices. Therefore, hybrid composites consisting of poly(methylene blue) films (PMB_{DES}) made by electropolymerisation in deep eutectic solvents (DES) and carbon nanotubes were developed (fig. 3).

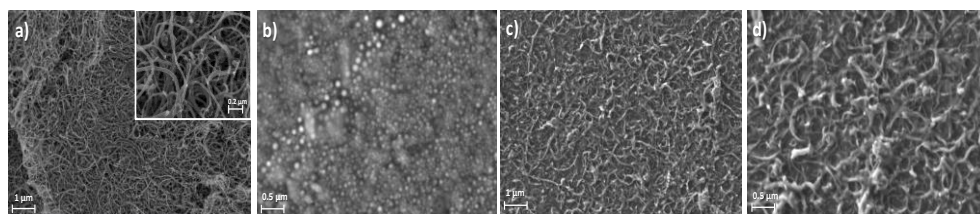


Fig. 3. SEM images of a) CNT, b) PMB_{DES} and c) and d) of PMB_{DES} covering the CNT at two different magnifications

The DES synthesized polymer shows nanostructured features which increased its electronic conductivity/redox activity compared to the aqueous analogue, and together with CNT enabled the construction of highly performance electrochemical sensors. Low

LoD of 13.8 μM and 1.6 μM were obtained, with excellent sensitivities of 2.2 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, and 68.7 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, for ascorbic acid and acetaminophen, respectively, outclassing other similar sensors found in the literature. The new sensors showed good stability, reproducibility, repeatability and high recovery factors when used in pharmaceutical formulations, providing a new method for the simple and highly sensitive detection of key analytes in complex matrices and broadening the use of green solvents in electrochemical sensors and pharmaceutical analysis.

In **Chapter III**, entitled **Enzyme Biosensors**, is presented a new strategy of biomolecule immobilisation at the electrode surface. The synthesis and characterisation of a new diazirine derivative (pyrene-diazirine) are investigated. The poly(pyrene-diazirine) electrogenerated films and the parameters involved in the electropolymerization reaction were characterized and optimized. By the combination between the new polymeric film and carbon nanotubes, different architectures were assessed. The capacity of biomolecule immobilisation was investigated by photografting two enzymes (glucose oxidase and polyphenol oxidase). The obtained and presented results in this section of the thesis were published as two articles in ISI journals.

6. Nanostructured pyrene diazirine based film for the development of photoactivatable platform^{13,14}

By combining electrochemical and photochemical properties, a versatile tool for biomolecules photografting (*i.e.* enzymes, antibodies, aptamers) onto nanostructured surfaces can be developed. The development of a new immobilization platform based on the use of a new diazirine derivative (pyrene-diazirine) for proteins binding was achieved. Upon UV irradiation, diazirines form highly reactive carbene intermediaries, which can react with C-H, N-H, and O-H bonds, making them excellent photo-reactive crosslinking reagents. To get this purpose, a new compound has been synthesized allowing its π -stacking onto multi-walled carbon nanotubes (CNT), and its electropolymerization at both Platinum (Pt) and CNT/Pt electrodes.

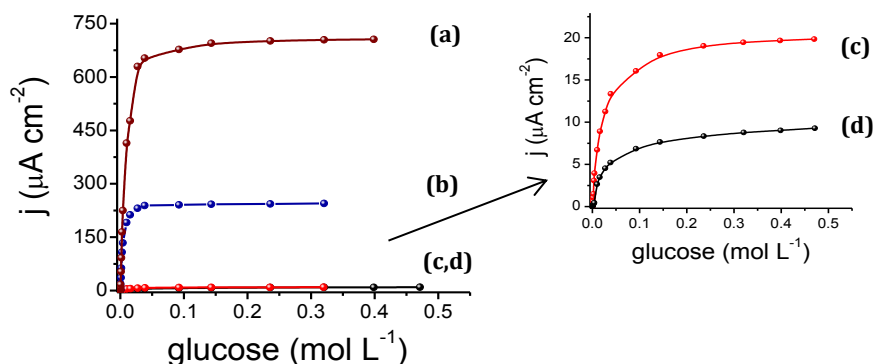


Fig. 4. Calibration curves for glucose obtained at: **(a)** irradiated Pt/CNT/poly-1/GOx, **(b)** irradiated Pt/CNT/1/GOx, **(c)** irradiated Pt/poly-1/GOx, **(d)** non-irradiated Pt/poly-1/GOx in 0.1 M PBS (pH 7.0)

The electropolymerization parameters were optimized and the electrogenerated films of poly(pyrene-diazirine) were characterized by cyclic voltammetry. Different modified electrode configurations were assessed in order to prove their photoreactivity. Thus, two enzyme-based sensors were developed for glucose (fig. 4) and catechol determinations respectively, obtaining maximum current densities of $706 \mu\text{A cm}^{-2}$ and $677 \mu\text{A cm}^{-2}$ by using the best architecture design, namely CNT/poly-(pyrene-diazirine) on top of Pt or GCE electrodes. The obtained results have proven the high efficiency on enzyme photografting showing their potential use as a photoelectrochemical approach for biomolecule immobilization.

GENERAL CONCLUSIONS and ORIGINALITY OF THE THESIS

The studies presented in this thesis reveal several architecture designs based on different electrode modifiers such as conductive organic polymer films, diazonium salt based films, carbon nanotubes, graphene, metallic and magnetic nanoparticles. These integrated nanostructured materials improved the sensitivity of the developed sensors as well as facilitated the immobilisation of biomolecules when needed. Thus, the results have an important impact in the field of sensors as the developed systems show good reproducibility and recovery rates as well as good sensitivities for the analytes of interest from pharmaceutical and biomedical field.

SELECTED REFERENCES

1. Marrazza G, Minunni M, Palchetti I. To the memory of Marco Mascini: His contribution in the field of biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016;79:2–8.
2. Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem.* 2014;2:63.
3. Barsan MM, Ghica ME, Brett CMA. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Anal Chim Acta.* 2015;881:1–23.
4. Brett CMA, Oliveira Brett AM. *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
5. Hosu O, Selvolini G, Cristea C, Marrazza G. Electrochemical immunosensors for disease detection and diagnosis, *Curr Med Chem.* 2017, DOI: 10.2174/0929867324666170727104429.
6. Hosu O, Tertis M, Săndulescu R, Cristea C. Protein G magnetic beads based immunosensor for sensitive detection of acetaminophen. *Farmacia.* 2015;1:140–145.
7. Tertis M, Hosu O, Fritea L, et al. A novel label-free immunosensor based on activated graphene oxide for acetaminophen detection. *Electroanalysis.* 2015;27(3):638–647.
8. Hosu O, Ravalli A, Lo Piccolo GM, Cristea C, Sandulescu R, Marrazza G. Smartphone-based immunosensor for CA125 detection. *Talanta.* 2017;166:234–40.
9. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Săndulescu R, Cristea C. Mucin 4 Detection with a Label-Free Electrochemical Immunosensor. *Electrochem Commun.* 2017;80:39–43.
10. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Săndulescu R, Cristea C. Mucin 4 immunosensor based on p-aminophenylacetic acid grafting on carbon electrodes as immobilisation platform. *Procedia Tech.* 2017;27:110–111.
11. Hosu O, Barsan MM, Cristea C, Sandulescu R, Brett CMA. Nanostructured electropolymerized poly(methylene blue) films from deep eutectic solvents. Optimization and characterization. *Electrochimica Acta.* 2017;232:285–295.
12. Hosu O, Barsan MM, Cristea C, Sandulescu R, Brett CMA. Nanocomposites based on carbon nanotubes and redox-active polymers synthesized in a deep eutectic solvent as a new electrochemical sensing platform. *Microchimica Acta.* 2017, 1–9, DOI 10.1007/s00604-017-2420-z.
13. Hosu O, Elouarzaki K, Gorgy K, et al. Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazirine. *Electrochem Commun.* 2017;80:5–8.
14. Elouarzaki K, Hosu O, Gorgy K, et al. Towards a versatile structured photoactivatable platform based for biosensing applications. *J Anal Test.* 2017;1(2):16, DOI 10.1007/s41664-017-0016-6.