
Teză de doctorat

Nanomateriale inovative utilizate ca piese de bază în construcția (bio)senzorilor

Doctorand

Gheorghe Melinte

Coordonatori

Prof.Dr. Cecilia Cristea

Științifici

Prof.Dr. Giovanna Marrazza



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Cuprins

| | |
|--|----|
| INTRODUCERE | 15 |
| STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII | |
| 1. Electrochimie și senzori electrochimici/biosenzori | 19 |
| 1.1. Biosenzori electrochimici | 19 |
| 1.2. Bioreceptori | 20 |
| 1.2.1. Enzime | 20 |
| 1.2.2. Peptide | 21 |
| 1.2.3. Polimeri imprimați molecular | 22 |
| 1.2.4. Anticorpi | 23 |
| 1.2.5. Acizi nucleici | 23 |
| 1.3. Tehnici de imobilizare | 24 |
| 2. Metode de detecție electrochimică | 26 |
| 2.1. Tehnici electroanalitice | 26 |
| 2.1.1. Voltammetrie ciclică | 26 |
| 2.1.2. Voltammetrie puls diferențială | 26 |
| 2.1.3. Cronoamperometrie | 27 |
| 2.1.4. Multipuls amperometrie | 28 |
| 2.1.5. Spectroscopie de impedanță electrochimică | 28 |
| 2.2. Metode de detecție | 29 |
| 2.2.1. Biosenzori nemarcați electrochimic | 30 |
| 2.2.2. Biosenzori marcați electrochimic | 32 |
| 3. Materiale utilizate în dezvoltarea senzorilor | 34 |
| 3.1. Polimeri electroconductivi | 34 |
| 3.1.1. Polianilină | 35 |
| 3.1.2. Polipyrrol | 35 |
| 3.1.3. Poli-L-Lisina | 35 |
| 3.2. Materiale metalice compozite | 36 |
| 3.2.1. Nanoparticule de aur | 36 |
| 3.2.2. Nanoparticule de platină | 37 |
| 3.2.3. Alte nanomateriale metalice | 37 |
| 3.3. Nanomateriale pe bază de carbon | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1. Nanotuburi de carbon | 39 |
| 3.3.2. Oxizi de carbon | 38 |
| 4. Moleculă țintă | 41 |
| 4.1. Moleculă target pentru analize de mediu | 41 |
| 4.1.1. Arsenic | 41 |
| 4.2. Moleculă relevante în analizele medicale | 42 |
| 4.2.1. Glucoză | 42 |
| 4.2.2. Acid folic | 43 |
| 4.3. Moleculă relevante în analize de probe alimentare | 44 |
| 4.3.1. Lizozim | 44 |
| 4.2.2. Alergeni din arahide | 45 |

CONTRIBUȚII PERSONALE

| | |
|---|-----------|
| Capitolul I. Platforme electrochimice pe bază de polimeri | 49 |
| 1. Senzor electrochimic pe bază de poli-pirrol pentru detecția directă a acidului folic | 49 |
| 1.1. Introducere | 49 |
| 1.2. Materiale și metode | 50 |
| 1.3. Rezultate și discuții | 51 |
| 1.3.1. Sinteza electrochimică și caracterizarea morfologică a PPy-COOH | 51 |
| 1.3.2. Caracterizarea platformei | 52 |
| 1.3.3. Determinarea acidului folic | 53 |
| 1.3.4. Stabilitate, specificitate și aplicații | 55 |
| 1.4. Concluziile | 58 |
| Chapter II. Platforme electrochimice pe bază de particule metalice nobile și polimeri | 59 |
| 1. Platformă nanostructurată bazată pe gold-platină/poli-anilină pentru caracterizarea arsenicului | 59 |
| 1.1. Introducere | 59 |
| 1.2. Materiale și metode | 59 |
| 1.2.1. Materiale | 59 |
| 1.2.2. Analize electrochimice | 60 |
| 1.3. Rezultate și discuții | 61 |
| 1.3.1. Dezvoltarea platformei | 61 |
| 1.3.2. Optimizarea condițiilor experimentale | 63 |
| 1.3.3. Performanțe analitice | 66 |
| 1.3.4. Specificitate | 67 |

| | |
|---|----|
| 1.4. Concluzii | 68 |
| 2. Electrozi de carbon modificați cu nanoparticule de Aur-Platină pentru detecția pe bază de aptamer a lizozimului | 69 |
| 2.1. Introducere | 69 |
| 2.2. Materiale și metode | 70 |
| 2.2.1. Materiale | 70 |
| 2.2.2. Dezvoltarea platformei AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE | 70 |
| 2.2.3. Aptasensor de tip sandwich (Biot-Apt/Lyz/MCH/Apt-SH/AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE) și marcarea enzimatică | 71 |
| 2.2.4. Caracterizare electrochimică și morfologică | 71 |
| 2.2.5 Selectivitate și aplicații | 71 |
| 2.3. Rezultate și discuții | 72 |
| 2.3.1. Dezvoltarea și caracterizarea platformei AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE | 72 |
| 2.3.2. Electrodepunerea nanostructurilor de aur | 73 |
| 2.3.3. Caracterizare electrochimică și morfologică | 74 |
| 2.3.4. Dezvoltarea detecției pe bază de aptamer | 76 |
| 2.3.5. Performanțe analitice | 77 |
| 2.3.6. Specificitate și aplicații | 79 |
| 2.4. Concluzii | 81 |
| Chapter III. Platforme electrochimice bazate pe nanostructuri metalice | 83 |
| 1. Fire de cupru modificate din spumă de nichel pentru determinarea amperometrică a glucozei | 83 |
| 1.1. Introducere | 83 |
| 1.2. Materiale și metode | 83 |
| 2.2.1. Materiale | 83 |
| 2.2.2. Evaluarea electrochimică a electrozilor nanoporoși 3D din Cu | 84 |
| 1.3. Rezultate și discuții | 84 |
| 1.3.1. Caracterizarea electrochimică a electrozilor nanoporoși 3D din Cu | 84 |
| 1.3.2. Performanțe analitice | 86 |
| 1.3.3. Specificitate și aplicații | 87 |
| 1.4. Concluzii | 89 |
| 2. Electrozi de carbon vitros modificați cu nanospații de aur pentru detecția selectivă a tetraciclinei | 90 |
| 2.1. Introducere | 90 |
| 2.2. Materiale și metode | 91 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.1. Materiale | 91 |
| 2.2.2. Instrumente | 92 |
| 2.2.3. Dezvoltarea platformei | 92 |
| 2.2.4. Dezvoltarea aptasenzorului | 93 |
| 2.2.5 Selectivitate și aplicații | 93 |
| 2.3. Rezultate și discuții | 94 |
| 2.3.1. Optimizarea platformei | 94 |
| 2.3.2. Dezvoltarea aptasenzorului | 98 |
| 2.3.3. Performanțe analitice | 100 |
| 2.3.4. Selectivitate, stabilitate și aplicații | 101 |
| 2.4. Concluzii | 102 |
| 3. Platformă pe bază de oxizi de carbon și nanostructuri de Aur-Platină pentru detecția Ara H1 | 103 |
| 3.1. Introducere | 103 |
| 3.2. Materiale și metode | 105 |
| 3.2.1. Materiale | 105 |
| 3.2.2. Dezvoltarea platformei | 106 |
| 3.2.3. Dezvoltarea aptasenzorului | 106 |
| 3.2.4. Aplicații | 107 |
| 3.3. Rezultate și discuții | 107 |
| 3.3.1. Optimizarea platformei | 107 |
| 3.3.2. Comparatie între sinteza electrochimică (GO-COOH/Au-PtNPs) și chimică (GO-COOH@Au-PtNPs) ale platformelor bimetalice | 109 |
| 3.3.3. Dezvoltarea aptasenzorului | 111 |
| 3.3.4. Performanțe analitice | 114 |
| 3.3.5. Specificitate și aplicații | 115 |
| 3.4. Concluzii | 117 |
| IV. Concluzii generale | 119 |
| V. Originalitatea tezei | 121 |
| Bibliografie | 123 |

Cuvinte cheie

Electrochimie, senzori, biosenzori, alergeni, bioreceptori, aptamer, voltametrie, amperometrie, medicament.

INTRODUCERE

În ultimii ani, știința nanomaterialelor și a nanotehnologiei a cunoscut o dezvoltare semnificativă în ceea ce privește dezvoltarea nanosenzorilor, cu limite foarte scăzute de detecție, versatilitate ridicată și capacitatea de a detecta diferite semnale biofizice care pot fi asociate cu prezența unor markeri de sănătate sau de poluare.

Această capacitate de detectare a moleculelor care pot fi asociate cu prezența unei boli sau a unui nivel de contaminare reprezintă un instrument esențial cu un impact asupra bunăstării populației generale prin creșterea calității vieții și a speranței. Dezvoltarea senzorilor electrochimici a fost studiată pe larg, deoarece se pot genera platforme cu multe aplicații ce reduc dezavantajele celulelor electrochimice clasice.

Nanomaterialele pot fi utilizate pentru a mări aria electroactivă a electrodului și, prin urmare, pentru a oferi semnale electrice mai mari care permit detecția unor niveluri mai scăzute de analiți. Selectivitatea senzorilor electrochimici poate crește prin imobilizarea biomoleculelor care pot recunoaște selectiv și lega analitul țintă. Aceste molecule se numesc bioreceptori, iar senzorul electrochimic se numește biosenzor.

Obiectivul principal al cercetării acestei teze de doctorat a fost dezvoltarea unor platforme electrochimice potrivite pentru aplicații electroanalitice folosind diferite strategii. Pentru aceasta, mai multe nanomateriale, cum ar fi polimerii conductivi, nanoparticulele metalice, firele metalice, au fost utilizate pentru a crește performanțele analitice. Aplicabilitatea platformelor dezvoltate a fost dovedită prin detectarea bioanalitică a unor substanțe de interes. Analiți țintă cu roluri importante în domeniul medical și de mediu au fost aleși pentru a fi detectați din matrice complexe, simulând condițiile *in situ*.

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU

În prima parte a acestei teze, este prezentată o analiză a datelor din literatura de specialitate prin introducerea domeniului senzorilor electrochimici și a celor mai recente tendințe în domeniu. Astfel, secțiunea prezintă informații generale despre nivelul actual al cercetării electrochimice și necesitatea detecției rapide și precise a compușilor biomedicali relevanți.

Prin urmare, **primul capitol** prezintă fundamentele senzorilor electrochimici și rolul important al utilizării bioreceptorilor pentru a crește selectivitatea senzorului.

Al doilea capitol prezintă principalele metode electrochimice ce pot fi utilizate pentru modificarea electrozilor și chiar pentru detecția analiților. Pentru a simplifica înțelegerea lor, metodele au fost împărțite în funcție de caracteristica lor principală în metodele voltammetrice și metodele amperometrice. În plus, în acest capitol a fost

efectuată o scurtă introducere despre metodele de cuantificare a analiților, indicând diferențele dintre detectarea analiților utilizând sau nu markeri electrochimici.

În al 3-lea capitol al acestei părți este prezentat rolul modificării al suprafeței electrochimice. Pentru început, sunt prezentați polimerii conductivi și rolul lor în creșterea conductivității și a reproductibilității suprafeței. Apoi, sunt descrise materialele compozite metalice și rolul lor în imobilizarea biomoleculilor, capitolul încheindu-se cu descrierea materialelor pe bază de grafit și a metodele de modificare a acestora.

Ultimul capitol face o scurtă introducere a moleculelor detectate în această teză de cercetare, explicând necesitatea detecției rapide, sensibile și precise a acestora. Analiții au fost împărțiți în 3 categorii: analiza de mediu, analiți de importanță medicală și analiți detectați din alimente.

CONTRIBUȚII PERSONALE

În această parte a tezei sunt descrise principalele contribuții ale autorului. Secțiunea este împărțită în 3 capitole principale fiecare cu propriile sale studii. Caracteristica principală a fiecărui capitol este reprezentată de materialele utilizate pentru modificarea electrozilor.

Capitolul I prezintă **platforme electrochimice pe bază de polimeri**. În acest capitol este prezentat un singur studiu, un protocol de polimerizare a pirrol-ului pe suprafața electrozilor de carbon imprimați (SPCE) și aplicarea acestuia în vederea determinării acidului folic.

1. Senzor electrochimic pe bază de poli-pirol pentru detecția directă a acidului folic

Detecția acidului folic în probe biologice sau produse farmaceutice este de mare importanță datorită implicațiilor sale în funcțiile biologice ale corpului uman precum în dezvoltarea și creșterea fătului. Deficitul de acid folic poate fi contracarat prin aportul extern din formulări farmaceutice sau produse alimentare. Elaborarea platformelor de detecție reprezintă o muncă continuă în care utilizarea polimerilor conductivi modificați cu diferite grupări funcționale reprezintă una dintre strategiile de ultim moment. Posibilitatea de a manipula morfologia lor cu ajutorul șabloanelor sau agenților tensioactivi reprezintă un alt avantaj. O platformă de detecție bazată pe polipirol funcționalizat cu grupări carboxil a fost sintetizată electrochimică în prezența unui agent tensioactiv polimeric pe o suprafață electrodică pe bază de grafit. Senzorul a fost capabil să detecteze acidul folic într-un domeniu de linearitate cuprins între 2,5 μM și 200 μM cu o limită de detecție de 0,8 μM . Acesta a fost utilizat pentru detecția analitului din serul

uman comercial și produse farmaceutice cu rate excelente de recuperare. Rezultatele au fost verificate de două ori folosind o procedură spectrofotometrică optimizată care a confirmat performanțele senzorului în evaluarea probelor reale.

Al doilea capitol, împărțit în 2 studii separate, **prezintă dezvoltarea unor platforme electrochimice pe bază de polimer și particule metalice**. În acest capitol, proprietățile polianilinei și poli-l-lizinei au fost combinate cu cele ale particulelor metalice precum aurul și platina pentru a realiza platforme electrochimice care oferă o suprafață de imobilizare ridicată și o bună conductivitate și limite foarte scăzute de detecție.

1. Platformă nanostructurată pe bază de aur-platină/poli-anilină pentru caracterizarea arsenicului

Arsenicul este unul dintre cele mai abundente minerale și, de asemenea, unul dintre cei mai toxici compuși. Datorită toxicității sale ridicate, dezvoltarea unor metode analitice sensibile este foarte importantă, ținând seama de faptul că nivelul admis în ape este în intervalul de $\mu\text{g L}^{-1}$. Se propune o platformă nouă și ușor de utilizat pentru detectarea As(III) din probele de apă, bazată pe nanoparticule bimetalice de aur și platină și un polimer conductiv (polianilină). Polimerizarea anilinei s-a realizat printr-o procedură de voltametrie ciclică, în timp ce pentru nanoparticulele bimetalice au fost testate proceduri voltametrice și amperometrice, fiind aleasă cea cu cea mai mare arie electroactivă. Detecția electrochimică a fost realizată după optimizarea pre-concentrării As(III) la nivelul suprafeței electrodice și a parametrilor voltametriei anodice de separare a undelor pătrate, dovedindu-și aplicabilitatea pentru analiza in situ și rapidă a arsenicului.

2. Electrozi de carbon modificați cu nanoparticule de Aur-Platină pentru detecția pe bază de aptamer a lizozimului

O nouă platformă hibrid pe bază de poli-L-lizină conductivă (Poly-L-Lys) și nanostructuri de aur (NSs) a fost pregătită pentru dezvoltarea unui aptasensor structurat de tip sandwich pentru detecția sensibilă și selectivă a lizozimului (Lyz). S-a realizat electropolymerizarea Poly-L-Lys pe suprafața SPCE, urmată de depunerea aurului dintr-o soluție care conține HAuCl_4 și polietilenglicol 10 000 (PEG). Concentrația soluției de HAuCl_4 a fost parametrul cheie în controlul morfologiei platformei, confirmat prin microscopie electronică de scanare și microscopie de forță atomică. Caracterizarea electrochimică a platformelor a demonstrat diferențe în ceea ce privește proprietățile electrochimice voltametrice și de impedanță ale platformei obținute folosind 2 mM HAuCl_4 ($\text{AuNSs(I)@PEG/Poly-L-Lys/SPCE}$) și 20 mM HAuCl_4 ($\text{AuNSs(II)@PEG/Poly-L-Lys/SPCE}$). Toți pașii implicați în dezvoltarea aptasensorului au fost evaluați pentru a determina configurația optimă a senzorului pentru detectarea Lyz (Figura 1).

Aptasensorul cu cea mai bună configurație a fost aplicat într-un domeniu de linearitate larg ($70^{-7} \times 10^5$ pM) și a fost calculată o limită de detecție de 2 pM ($3 \cdot \sigma/\text{pantă}$). Aplicabilitatea aptasensorului electrochimic a fost demonstrată prin cuantificarea cu succes a Lyz în probe de vin.

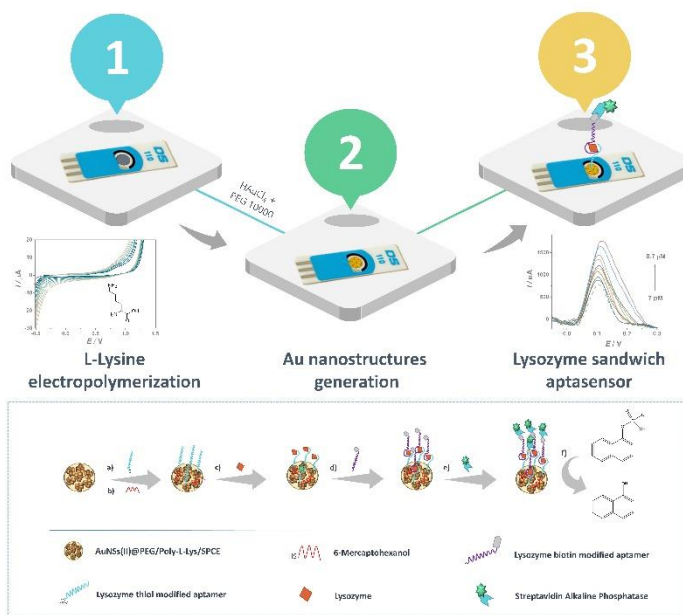


Figure 1 Schematic representation of sandwich-structured aptasensor for Lyz analysis

Ultimul capitol al acestei teze de doctorat prezintă utilizarea **nanostructurilor metalice pentru dezvoltarea platformelor electrochimice**. Trei studii sunt prezentate în acest capitol. Diferite structuri metalice sunt sintetizate pentru a obține platforme cu conductivitate foarte bună și sunt prezentate diferite combinații cu materiale pe bază de grafit, astfel încât performanțele generale ale senzorului să fie îmbunătățite.

1. Fire de cupru modificate din spumă de nichel pentru determinarea amperometrică a glucozei

În ciuda faptului că biosenzorii electrochimici enzimatici reprezintă standardul de aur pentru gestionarea diabetului zaharat, elaborarea senzorilor neenzimatici a devenit studiată pe larg ca un concept out-of-the-box care are ca scop simplificarea abordării existente. Un punct de vedere important este reprezentat de prețul scăzut al dispozitivului de detecție, care are efecte pozitive atât asupra utilizatorilor finali,

cât și pentru sistemele de sănătate. Dezvoltarea nanomaterialelor nanoporoase pentru aplicații biomedicale și electrocataliza a fost menționată ca o alternativă la metodele convenționale datorită suprafeței lor extinse, proprietăților electrice, ușurinței de funcționalizare și nu în ultimul rând a costului lor scăzut. Celule electrochimice 3D din cupru și spumă de nichel (Cu/Ni_r) au fost cu succes caracterizate electrochimic și aplicate în detecția glucozei. Prin funcționalizarea firelor de cupru cu un strat suplimentar de spuma de Ni, s-a îmbunătățit răspunsul electroanalitic legat de detecția non-enzimatică a glucozei în 0,1 M NaOH și în probe de ser. Senzorii au fost testați cu succes în prezența analitului și a unor molecule ce se găsesc împreună în lichidele biologice și pot interfera cu analitul de interes.

2. Electrozi de carbon vitros modificați cu nanoparticule de aur pentru detecția selectivă a tetraciclinei

În ultimii ani, reziduurile de tetraciclină (TET) din alimente și apă au reprezentat o preocupare majoră pentru autoritățile de reglementare și consumatori, cu efecte adverse atât asupra ecosistemelor, cât și asupra sănătății umane. În această lucrare, am dezvoltat o nouă platformă nanostructurată 3D, denumită goldnanovoids@aptamer cu proprietăți de biorecunoaștere și de îmbunătățire a semnalului pentru detecția tetraciclinei. Am proiectat și sintetizat o platformă nanostructurată de aur pentru funcționalizarea aptamerului specific tetraciclinei, extinzând gama de aptasensori utilizați în detecția electrochimică și oferind o platformă promițătoare pentru monitorizarea *in situ* a apei. Semnalul electrochimic poate fi redus eficient prin interacțiunea specifică TET-aptamer care duce la modificări conformaționale și structurale ale stratului de recunoaștere, înzestrându-l cu o stare "închisă". Aptasenzorul poate detecta TET într-un domeniu de concentrații de $1,25 \cdot 10^{-8}$ M până la $1,00 \cdot 10^{-6}$ M, cu o limită de detecție și limita de cuantificare calculate ca $1,20 \cdot 10^{-9}$ M (0,53 ng/ml) și, respectiv, $4,23 \cdot 10^{-9}$ M (1,87 ng/ml). În plus, aptasenzorul a prezentat o selectivitate excelentă pentru TET în prezența diferiților analiți ce pot interfera cu analiza. În plus, senzorul propus de și-a dovedit caracteristicile practice de cuantificare rapidă și precisă a reziduurilor TET din eșantioanele de ape uzate cu recuperări satisfăcătoare (de la 93,18 la 112,64 %, RSD 1,12 % – 6,13 %). Am proiectat și sintetizat o platformă nanostructurată de aur pentru funcționalizarea cu aptamer specific tetraciclinei, extinzând gama de aptasensori de detecție electrochimică și oferind o unealtă importantă pentru monitorizarea *in situ* a apei .

3. Platformă pe bază de oxizi de carbon și nanostructuri de Aur-Platină pentru detecția Ara H1

Alergiile induse de arahide sunt considerate unele dintre cele mai severe sensibilități alimentare care pun viața în pericol, deoarece declanșează cea mai mare frecvență a reacțiilor severe și fatale, chiar și în urme. Prin urmare, este imperativ

necesară dezvoltarea unor metode analitice rapide, precise și ușor de utilizat pentru a determina Ara h1, o proteină din *Arachis hypogea* și principalul alergen din arahide. În această lucrare, au fost aplicate două strategii pentru a dezvolta o platformă electrochimică bazată pe GO-COOH și nanoparticule metalice SPCE (Figura 2). Datorită reacției de afinitate dintre receptorul ADN specific și analitul țintă, a fost dezvoltat un aptasensor electrochimic cu specificitate ridicată și sensibilitate bună față de Ara h1. Performanțele analitice ale aptasensorului au fost reprezentate de un interval de linearitate de 5 - 150 nM și o limită de detecție de 1.66 nM. Metoda a fost aplicată în probe alimentare fără arahide, cu Ara h1 adăugat, cu recuperări foarte bune dovedindu-se a fi un instrument promițător pentru prevenirea reacțiilor alergice la arahide.

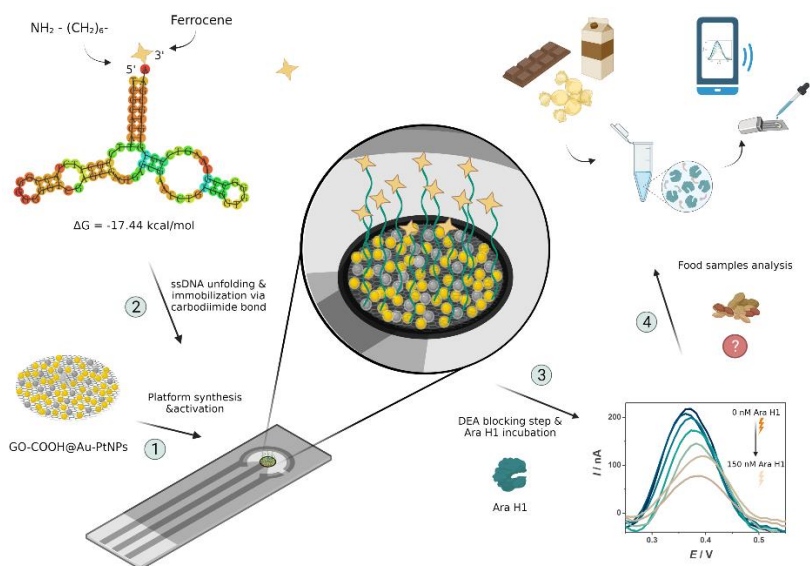


Figura 2 Reprezentarea schematică a aptasensorului pe bază de grafene-compozit bimetalic pentru analiza alergenului din arahide Ara h1.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Scopul acestei teze a fost de a dezvolta noi platforme electrochimice adecvate pentru analiza unor molecule de importanță medicală. Au fost utilizate mai multe strategii de detecție, cum ar fi detecția directă sau detecția indirectă cu folosind un bioreceptor.

Primul obiectiv important al studiilor a fost reprezentat de dezvoltarea și caracterizarea diferitelor nanostructuri și modificarea electrozilor cu acestea în vederea detecției electrochimice. Al doilea obiectiv a fost de a demonstra aplicabilitatea lor în analiza probelor reale. Pentru aceasta, diferite molecule având o caracteristică comună: impactul lor asupra sănătății umane au fost detectate din matrici complexe.

Contribuția personală și adusă acestei teze a fost împărțită în trei capitole principale și un total de 6 studii. Deoarece unul dintre obiectivele principale ale tezei a fost dezvoltarea platformelor care utilizează nanomaterialele ca elemente de bază pentru senzorii electrochimici, tipul de materiale utilizate pentru modificarea electrozilor a fost ales când s-au împărțit studiile pe capitole. Originalitatea acestei teze constă în design-ul studiilor și dezvoltarea de noi abordări și metode pentru dezvoltarea mai multor senzori electrochimici pe bază de nanomateriale, potriviți pentru detectarea unei game largi de molecule. Platformele electrochimice au fost obținute prin depunerea de particule metalice, polimeri sau oxizi de carbon funcționalizați pe suprafața diferitelor celule electrochimice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ensafi AA. An introduction to sensors and biosensors. *Electrochemical Biosensors*. 2019 Jan 1;1-10.
2. Florea A, Melinte G, Simon I, Cristea C. Electrochemical Biosensors as Potential Diagnostic Devices for Autoimmune Diseases. *Biosensors* 2019, Vol 9, Page 38 , 2019 Mar 4 9(1):38.
3. Tertîș M, Melinte G, Ciui B, Șimon I, Știuțuc R, Săndulescu R, et al. A Novel Label Free Electrochemical Magnetoimmunosensor for Human Interleukin-6 Quantification in Serum. *Electroanalysis* [Internet]. 2019 Feb 1.
4. Ștefan G, Hosu O, de Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances. *Electrochimica Acta*. 2021 Apr 20;376:137994
5. Melinte G, Selvolini G, Cristea C, Marrazza G. Aptasensors for lysozyme detection: Recent advances. *Talanta*. 2021 May 1;226:122169.
6. Blidar A, Hosu O, Feier B, Ștefan G, Bogdan D, Cristea C. Gold-based nanostructured platforms for oxytetracycline detection from milk by a “signal-on” aptasensing approach. *Food Chemistry*. 2022 Mar 1;371:131127.
7. Melinte G, Hosu O, Ștefan G, Bogdan D, Cristea C, Marrazza G. Poly-L-Lysine@gold nanostructured hybrid platform for Lysozyme aptamer sandwich-based detection. *Electrochimica Acta* [Internet]. 2022 Jan 20 [cited 2022 Jan 27];403:139718
8. Blidar A, Hosu O, Feier B, Ștefan G, Bogdan D, Cristea C. Gold-based nanostructured platforms for oxytetracycline detection from milk by a “signal-on” aptasensing approach. *Food Chemistry*. 2022 Mar 1;371:131127.
9. G. Melinte, O.Hosu, C. Cristea, G. Marrazza, *DNA sensing technology a useful food scanning tool*, Trends in Analytical Chemistry 2022, 154, 116679
10. G. Melinte, A. Cernat, M.B. Irimes, S. J. Györfi, M. Tertis, M. Suciuc, L. Anicai, R. Sandulescu and C. Cristea, Selective Detection of Folic Acid Using 3D Polymeric Structures of 3-Carboxylic Polypyrrole, *Sensors* 2020, 20, 2315.
11. G. Melinte, O. Hosu, C. Cristea, G. Marrazza, *Electrochemical fingerprint of Arsenic (III) by using hybrid nanocomposite based platforms*, *Sensors* 2019, 19(10), 2279

DOCTORAL THESIS

Innovative nanomaterials as building blocks of (bio)sensors

Candidate **Gheorghe Melinte**

PhD coordinators **Prof.Dr. Cecilia Cristea**
Prof.Dr. Giovanna Marrazza



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Table of Contents

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 15 |
| STATE OF THE ART | |
| 3. Electrochemistry and electrochemical sensors/biosensors | 19 |
| 1.1. Electrochemical biosensors | 19 |
| 1.2. Bioreceptors | 20 |
| 1.2.1. Enzymes | 20 |
| 1.2.2. Peptides | 21 |
| 1.2.3. Molecularly imprinted polymers | 22 |
| 1.2.4. Antibodies | 23 |
| 1.2.5. Nucleic Acids | 23 |
| 1.3. Immobilization techniques | 24 |
| 4. Electrochemical detection methods | 26 |
| 2.1. Electroanalytical techniques | 26 |
| 2.1.1. Cyclic Voltammetry | 26 |
| 2.1.2. Differential pulse voltammetry | 26 |
| 2.1.3. Chronoamperometry | 27 |
| 2.1.4. Multipulse amperometry | 28 |
| 2.1.5. Electrochemical impedance spectroscopy | 28 |
| 2.2. Analytes detection | 29 |
| 2.2.1. Label free biosensors | 30 |
| 2.2.2. Labelled biosensors | 32 |
| 3. Materials used in electrochemical sensors | 34 |
| 3.1. Electroconductive polymers | 34 |
| 3.1.1. Polyaniline | 35 |
| 3.1.2. Polypyrrole | 35 |
| 3.1.3. Poly-L-Lysine | 35 |
| 3.2. Metallic composites | 36 |
| 3.2.1. Gold nanoparticles | 36 |
| 3.2.2. Platinum nanoparticles | 37 |
| 3.2.3. Other metallic particles | 37 |
| 3.3. Carbon based nanomaterials | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1. Single-walled carbon nanotubes | 39 |
| 3.3.2. Graphene oxides | 38 |
| 4. Target molecules | 41 |
| 4.1. Targets from environmental analysis | 41 |
| 4.1.1. Arsenic | 41 |
| 4.2. Relevant targets for medical analysis | 42 |
| 4.2.1. Glucose | 42 |
| 4.2.2. Folic acid | 43 |
| 4.3. Relevant targets for food analysis | 44 |
| 4.3.1. Lysozyme | 44 |
| 4.2.2. Peanut allergens | 45 |
| | |
| PERSONAL CONTRIBUTIONS | |
| Chapter I. Polymer-based electrochemical platforms | 49 |
| 1. Poly-Pyrrole electrochemical sensor for direct detection of Folic Acid | 49 |
| 1.1. Introduction | 49 |
| 1.2. Materials and methods | 50 |
| 1.3. Results and discussion | 51 |
| 1.3.1. Electrochemical Deposition and Characterization of the PPy-COOH Morphology | 51 |
| 1.3.2. Platform characterization | 52 |
| 1.3.3. Folic Acid determination | 53 |
| 1.3.4. Stability, specificity and applications | 55 |
| 1.4. Conclusions | 58 |
| Chapter II. Polymer-noble metallic particles based electrochemical platforms | 59 |
| 1. Gold-Platinum/poly-aniline nanostructured platform for arsenic fingerprinting | 59 |
| 1.1. Introduction | 59 |
| 1.2. Materials and methods | 59 |
| 1.2.1. Materials | 59 |
| 1.2.2. Electrochemical analysis | 60 |
| 1.3. Results and discussion | 61 |
| 1.3.1. Platform development | 61 |
| 1.3.2. Experimental conditions optimization | 63 |
| 1.3.3. Analytical performances | 66 |

| | |
|---|----|
| 1.3.4. Specificity | 67 |
| 1.4. Conclusions | 68 |
| 2. Gold/Poly-L-Lysine modified carbon electrodes for Lysozyme aptasensing | 69 |
| 2.1. Introduction | 69 |
| 2.2. Materials and methods | 70 |
| 2.2.1. Materials | 70 |
| 2.2.2. AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE platform development | 70 |
| 2.2.3. Sandwich-structured aptasensor (Biot-Apt/Lyz/MCH/Apt-SH/AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE) and enzymatic label | 71 |
| 2.2.4. Electrochemical and morphological characterization | 71 |
| 2.2.5 Selectivity and applications | 71 |
| 2.3. Results and discussion | 72 |
| 2.3.1. AuNSs@PEG/Poly-L-Lys/SPCE electrode platform development and characterization | 72 |
| 2.3.2. Gold nanostructures electrodeposition | 73 |
| 2.3.3. Electrochemical and morphological characterization | 74 |
| 2.3.4. Aptasensing steps development | 76 |
| 2.3.5. Analytical performances | 77 |
| 2.3.6. Specificity and applications | 79 |
| 2.4. Conclusions | 81 |
| Chapter III. Metallic nanostructures based electrochemical platforms | 83 |
| 1. Nickel foam modified copper wires for glucose amperometric determination | 83 |
| 1.1. Introduction | 83 |
| 1.2. Materials and methods | 83 |
| 2.2.1. Materials | 83 |
| 2.2.2. Electrochemical assessment of the 3D Cu nanoporous electrodes | 84 |
| 1.3. Results and discussion | 84 |
| 1.3.1. Electrochemical characterization of 3D Cu nanoporous electrodes | 84 |
| 1.3.2. Analytical performances | 86 |
| 1.3.3. Specificity and applications | 87 |
| 1.4. Conclusions | 89 |

| | |
|--|-----|
| 2. Modified glassy carbon electrodes with gold nanovoids for selective tetracycline detection | 90 |
| 2.1. Introduction | 90 |
| 2.2. Materials and methods | 91 |
| 2.2.1. Materials | 91 |
| 2.2.2. Instrumentation | 92 |
| 2.2.3. Platform development | 92 |
| 2.2.4. Aptasensor development | 93 |
| 2.2.5. Selectivity and applications | 93 |
| 2.3. Results and discussion | 94 |
| 2.3.1. Platform optimization | 94 |
| 2.3.2. Aptasensor development | 98 |
| 2.3.3. Analytical performances | 100 |
| 2.3.4. Selectivity, stability and applications | 101 |
| 2.4. Conclusions | 102 |
| 3. Gold-Platinum@Graphene oxide based platform for Ara H1 allergen determination | 103 |
| 3.1. Introduction | 103 |
| 3.2. Materials and methods | 105 |
| 3.2.1. Materials | 105 |
| 3.2.2. Platform development | 106 |
| 3.2.3. Aptasensor development | 106 |
| 3.2.4. Applications | 107 |
| 3.3. Results and discussions | 107 |
| 3.3.1. Platform optimization | 107 |
| 3.3.2. Comparison between electrochemical (GO-COOH/Au-PtNPs) and chemical (GO-COOH@Au-PtNPs) syntheses of GO-COOH bimetallic platforms | 109 |
| 3.3.3. Aptasensor development | 111 |
| 3.3.4. Analytical performances | 114 |
| 3.3.5. Specificity and applications | 115 |
| 3.4. Conclusions | 117 |
| IV. General conclusions | 119 |
| V. Originality of the thesis | 121 |
| Bibliography | 123 |

Keywords: Electrochemistry, sensors, biosensors, allergens, bioreceptors, aptamer, voltammetry, amperometry, drug.

INTRODUCTION

In the last couple of years, the science of nanomaterials and nanotechnology has seen a significant development towards nanoscale biosensing with very low limits of detection, high versatility and the ability to detect different biophysical signals that can be associated with the presence of health or pollution markers.

This capability of detecting molecules that can be associated with the presence of a disease or level of contamination represents an essential tool that impacts the general population's well-being by increasing life quality and expectancy. The development of electrochemical sensors has been extensively studied as they can generate platforms with many applications and reduce the disadvantages of unmodified electrochemical cells.

Nanomaterials can be used to increase the electrochemical area of the electrode and, therefore, offer higher electric signals that enable the detection of lower levels of target analytes. The selectivity of the electrochemical sensors can be increased by the immobilization of biomolecules that can selectively recognize and bind the target analyte. These molecules are called bioreceptors, and the electrochemical sensor is called a biosensor.

The main objective of this thesis research was to develop various electrochemical platforms suitable for electroanalytical applications using different designs and strategies. For this, several nanomaterials were used as building blocks to increase the analytical performances, like conductive polymers, noble MNPs, or metallic wires. The applicability of the developed platforms was proven in bioanalytical sensing. Target analytes with important roles in the medical and environmental fields were chosen to be detected from complex matrixes, simulating the *in-situ* conditions.

STATE OF THE ART

In the first part of this thesis, an analysis of the literature data is presented by introducing the field of electrochemical sensors and the latest trends in the field. Thereby, the state of the art section presents general information about current electrochemical developments and the need of biomedical relevant compounds fast and accurate detection.

Therefore, the **first chapter** presents the fundamentals of electrochemical sensors and the important role of using bioreceptors molecules in order to increase the selectivity of the sensor.

The **second chapter** presents the main electrochemical methods that can be used for electrode modification and even for analytes detection. In order to simplify their

understanding, the methods have been divided according to their main characteristic in Voltammetric methods and amperometric methods. Moreover, a brief introduction into analytes quantification was performed in this chapter, showing the differences between labeled and label free analytes detection.

In the **3rd chapter** of this part the role of difference surface modifiers is presented. Firstly, the conductive polymers and their role in increasing the conductivity and the reproducibility of the surface is presented. Next, the metallic composite and their role towards biomolecules immobilization is described, finishing the chapter with the description of graphite based materials and their modifications methods.

The **last chapter** is making a brief introduction of the analytes detected in this research thesis explaining the need of their fast, sensitive and accurate detection. The analytes were divided in 3 categories: environmental analysis, medical importance analytes and food detected analytes.

PERSONAL CONTRIBUTION

In this part of the thesis, the main author contributions are described. The section is divided into 3 main chapters each one with its own studies. The main characteristic of each chapter is represented by the materials used for electrode modification.

Chapter I presents **Polymer-based electrochemical platforms**. In this chapter only one study is presented, a protocol of Pyrrole polymerization on the surface of screen printed carbon electrodes (SPCE) and its application towards Folic acid determination.

1. Poly-Pyrrole electrochemical sensor for direct detection of Folic Acid

The detection of folic acid in biological samples or pharmaceutical products is of great importance due to its implications in the biological functions of the human body, along with the development and growth of the fetus. The deficiency of folic acid can be reversed by the intake of different pharmaceutical formulations or alimentary products fortified with this molecule. The elaboration of sensing platforms represents a continuous work in progress, a task in which the use of conductive polymers modified with different functionalities represents one of the outcoming strategies. The possibility of manipulating their morphology with the use of templates or surfactants represents another advantage. A sensing platform based on carboxylic functionalized polypyrrole was synthesized via the electrochemical approach in the presence of a polymeric surfactant on a graphite-based surface. The sensor was able to detect the folic acid from 2.5 μM to 200 μM with a calculated limited of detection of 0.8 μM . It was employed for

the detection of the analyte from commercial human serum and pharmaceutical products with excellent recovery rates. The results were double checked using an optimized spectrophotometric procedure that confirmed furthermore the performances of the sensor related to real samples assessment.

The second chapter, divided into 2 separate studies is presenting **polymer-noble metallic particles based electrochemical platforms**. In this chapter, the properties of polyaniline and poly-L-lysine were combined with the ones of metallic particles like gold and platinum in order to achieve electrochemical platforms that offer a high immobilization surface and a good conductivity in order to obtain very low limits of detection.

1. Gold-Platinum/poly-aniline nanostructured platform for arsenic fingerprinting

Arsenic, one of the most abundant mineral and also one of the most toxic compounds. Due to its high toxicity sensitive analytical methods are highly important, taking into account that the admitted level is in the range of $\mu\text{g L}^{-1}$. A novel and easy to use platform for As(III) detection from water samples is proposed, based on gold and platinum bimetallic nanoparticles and a conductive polymer (polyaniline). The polymerisation of aniline was performed using a cyclic voltammetry procedure while for the bimetallic nanoparticles voltammetric and amperometric procedures were tested, the one with the highest electroactive area being chosen for As(III) detection.. The electrochemical detection was achieved after optimization of cathodic pre-concentration and stripping parameters by square wave anodic stripping voltammetry at modified screen-printed carbon-based electrochemical cells, proving its applicability for disposable and cost-effective in situ analysis of arsenic.

2. Gold/Poly-L-Lysine modified carbon electrodes for Lysozyme aptasensing

A novel hybrid platform of conductive Poly-L-Lysine (Poly-L-Lys) and gold nanostructures (NSs) was prepared for the development of a sandwich-structured aptasensor towards the sensitive and selective detection of Lysozyme (Lyz). Electrodeposition of Poly-L-Lys at screen-printed carbon electrodes (SPCE) was done, followed by the gold deposition from a solution containing HAuCl_4 and 10 000 Polyethylene glycol (PEG). The concentration of the HAuCl_4 solution was the key parameter in controlling the morphology of the platform, confirmed by scanning electron microscopy and atomic force microscopy. Electrochemical characterization of the hybrid platforms demonstrated differences in the electrochemical voltammetric and impedance properties of the platform obtained using 2 mM HAuCl_4 (AuNSs(I)@PEG/Poly-L-Lys/SPCE) and 20 mM HAuCl_4 (AuNSs(II)@PEG/Poly-L-Lys/SPCE). All steps involved in the aptasensor development were evaluated to

determine the optimum sensor configuration for Lyz detection (Figure 1). The aptasensor with the best configuration was applied in a wide linear range ($70^{-7} \times 10^5$ pM), and a limit of detection of 2 pM was calculated ($3 * \sigma / \text{slope}$). The applicability of the electrochemical aptasensor was demonstrated by the successful quantification of Lyz in wine samples.

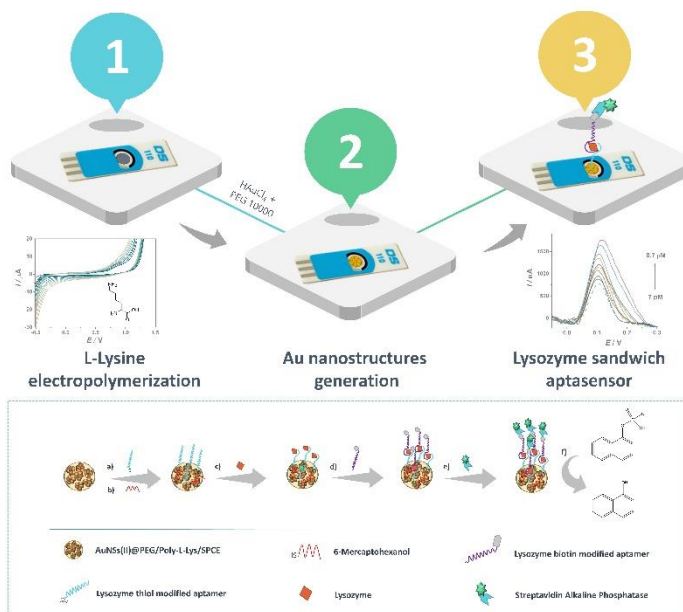


Figure 3 Schematic representation of sandwich-structured aptasensor for Lyz analysis

The last chapter of this research is presenting the use of **metallic nanostructures for electrochemical platforms development**. Three studies are presented in this chapter. Different metallic structures are synthesized in order to obtain platforms with very good conductivity and different combinations with graphite based materials are presented so that the overall performances of the sensor are improved.

1. Nickel foam modified copper wires for glucose amperometric determination

Despite the fact that the electrochemical biosensors based on glucose oxidase represent the golden standard for the management of diabetes, the elaboration of nonenzymatic sensors became extensively studied as an out-of-the-box concept that aims to simplify the existing approach. An important point of view is represented by the

low price of the sensing device that has positive effects for both end-users and healthcare systems. The development of nanoporous nanomaterials for biomedical applications and electrocatalysis was referred to as an alternative to the conventional methods due to their enlarged area, electrical properties, ease of functionalization and not least to their low cost. 3D electrochemical Cu/Ni electrodes and Cu sticks have been successfully electrochemically characterized and applied for Glu detection. An extra step of Cu sticks functionalization with an additional Ni foam layer enhanced the electroanalytical response related to the non-enzymatic detection of Glu in 0.1 M NaOH and in serum samples. The sensors were successfully tested in the presence of the designated target, even in the presence of common interference agents found in biological samples.

2. Modified glassy carbon electrodes with gold nanovoids for selective tetracycline detection

In recent years, tetracycline (TET) antibiotic residues in food and water have been of great concern to regulators and consumers, with adverse effects on both ecosystems and human health. In this work, we developed a novel 3D honeycombed goldnanovoids@aptamer nanostructured platform with biorecognition and signal enhancement properties for the detection of tetracycline. We have designed and synthesized a 3D honeycombed gold nanostructured platform for the highly tailored aptamer functionalization for the specific detection of tetracycline, expanding the range of electrochemical detection aptasensors and offering great promise for water *in-situ* monitoring. The electrochemical signal can be effectively quenched by TET-aptamer specific interaction that leads to conformational and structural changes in the recognition layer, endowing it an “off” condition. The aptasensor can detect TET at a concentration of $1.25 \cdot 10^{-8}$ M to $1.00 \cdot 10^{-6}$ M, and the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as $1.20 \cdot 10^{-9}$ M (0.53 ng/mL) and $4.23 \cdot 10^{-9}$ M (1.87 ng/mL), respectively. Furthermore, the aptasensor presented excellent selectivity in detecting TET in the presence of various anti-interference analytes. In addition, the proposed “signal-off” sensor proved its practical feasibilities to quickly and accurately quantify TET residues in wastewater samples with satisfactory recoveries (from 93.18 to 112.64 %, RSD 1.12 % – 6.13 %). We have designed and synthesized a 3D honeycombed gold nanostructured platform for the highly tailored aptamer functionalization for the specific detection of tetracycline, expanding the range of electrochemical detection aptasensors and offering great promise for water *in-situ* monitoring.

3. Gold-Platinum@Graphene oxide based platform for Ara H1 allergen determination

Peanuts induced allergies are considered one of the most severe, life-threatening food sensitivities since they trigger the highest frequency of severe and fatal reactions, even in trace amounts. Therefore, it is imperative to develop fast, accurate and easy-to-use analytical methods to determine Ara h1, is a seed storage protein from *Arachis hypogea* and the main peanut derived allergen. In this work, two strategies were applied to develop an electrochemical platform based on GO-COOH and metallic nanoparticles immobilised on screen-printed carbon electrodes (SPCEs) (Figure 2). Thanks to the affinity reaction between the specific DNA receptor and the target analyte, an electrochemical aptasensor with high specificity and good sensitivity towards Ara h1 was developed. The analytical performances of the aptasensor showed a linear range of 5 - 150 nM, and a limit of detection of 1.66 nM. The method was applied in peanut-free food samples with very good recoveries proving to be a promising tool for peanut allergy prevention.

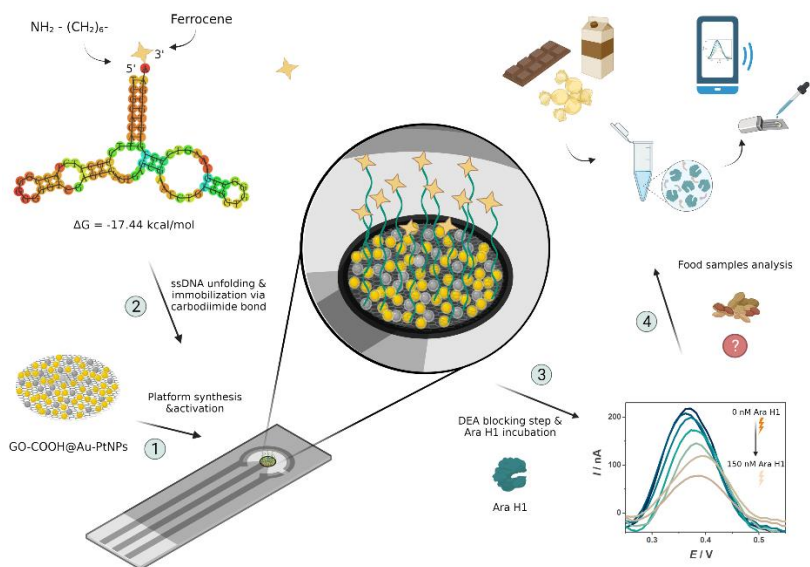


Figure 4 Schematic representation of the graphene-bimetallic based aptasensor for Ara h1 peanut allergen analysis.

GENERAL CONCLUSIONS and ORIGINALITY OF THE THESIS

The aim of this thesis was to develop new electrochemical platforms suitable for medical and environmental targets analysis. Several detection strategies like direct detection or indirect detection using a bioreceptor were employed.

In the studies presented, the first important goal is the development and characterization of different nanostructures modified platforms suitable for

electrochemical detection. The second goal was to demonstrate their applicability in real samples analysis. For this, different analytes with a common characteristic: their impact over the human health were detected from complex matrixes.

The personal contribution added to this thesis was divided into three main chapters and a total of 6 studies. Since one of the main goals of the thesis was to develop platforms using nanomaterials as building blocks for electrochemical sensors, the type of materials used for electrode modification was chosen in order to divide the studies into chapters. This thesis originality consists in the study and development of novel approaches and methods for the design of several nanomaterials based electrochemical sensors suitable for the detection of a broad range of molecules. Sensitive platforms were obtained by the deposition of metallic particles, polymers or functionalized Graphene oxides on the surface of different electrochemical cells.

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

12. Ensafi AA. An introduction to sensors and biosensors. *Electrochemical Biosensors*. 2019 Jan 1;1-10.
13. Florea A, Melinte G, Simon I, Cristea C. Electrochemical Biosensors as Potential Diagnostic Devices for Autoimmune Diseases. *Biosensors* 2019, Vol 9, Page 38 , 2019 Mar 4 9(1):38.
14. Tertiş M, Melinte G, Ciui B, Şimon I, Ştiufiuc R, Săndulescu R, et al. A Novel Label Free Electrochemical Magnetoimmunosensor for Human Interleukin-6 Quantification in Serum. *Electroanalysis* [Internet]. 2019 Feb 1.
15. Ştefan G, Hosu O, de Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances. *Electrochimica Acta*. 2021 Apr 20;376:137994
16. Melinte G, Selvolini G, Cristea C, Marrazza G. Aptasensors for lysozyme detection: Recent advances. *Talanta*. 2021 May 1;226:122169.
17. Blidar A, Hosu O, Feier B, Ştefan G, Bogdan D, Cristea C. Gold-based nanostructured platforms for oxytetracycline detection from milk by a “signal-on” aptasensing approach. *Food Chemistry*. 2022 Mar 1;371:131127.
18. Melinte G, Hosu O, Ştefan G, Bogdan D, Cristea C, Marrazza G. Poly-L-Lysine@gold nanostructured hybrid platform for Lysozyme aptamer sandwich-based detection. *Electrochimica Acta* [Internet]. 2022 Jan 20 [cited 2022 Jan 27];403:139718
19. Blidar A, Hosu O, Feier B, Ştefan G, Bogdan D, Cristea C. Gold-based nanostructured platforms for oxytetracycline detection from milk by a “signal-on” aptasensing approach. *Food Chemistry*. 2022 Mar 1;371:131127.
20. G. Melinte, O.Hosu, C. Cristea, G. Marrazza, *DNA sensing technology a useful food scanning tool*, Trends in Analytical Chemistry 2022, 154, 116679
21. G. Melinte, A. Cernat, M.B. Irimes, S. J. Györfi, M. Tertis, M. Suci, L. Anicai, R. Sandulescu and C. Cristea, Selective Detection of Folic Acid Using 3D Polymeric Structures of 3-Carboxylic Polypyrrole, *Sensors* 2020, 20, 2315.
22. G. Melinte, O. Hosu, C. Cristea, G. Marrazza, *Electrochemical fingerprint of Arsenic (III) by using hybrid nanocomposite based platforms*, *Sensors* 2019, 19(10), 2279

