

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI

Nanomateriale  
aplicații  
în  
biosenzori, surse de energie, medicină  
biologie

---

Elemente de nanotehnologie

ioan stamatin

2008



## Cuprins

1. Introducere în nanotehnologie	1	
2. Biosenzorii în contextul transdisciplinarității științelor	7	
2.1 De la chemosenzor la biosenzor		7
2.2 Biosenzorii și nanotehnologiile		11
2.3 Biosenzori, biodiagnostic, nanobiotehnologie, nanomedicină		14
2.3.1 Biocipurile și tehnologiile actuale ale secolului XXI		14
2.3.2 Biocipuri, nanobiotehnologia, nanomedicina		15
2.3.3 Scurt istoric		18
2.3.4 Referințe		23
3. Stadiul dezvoltării actuale în domeniul biosenzorilor	25	
3.1 Sisteme, arii de biosenzori, caracteristici de răspuns		27
3.1.1 Sisteme integrate		27
3.1.2 Șabloane		27
3.1.3 Sensibilitate		28
3.1.4 Stabilitate		29
3.1.5 Selectivitate		29
3.1.6 Parametrii de caracterizare a semnalelor biosenzorilor		30
3.1.7 Zgomot, rezoluție, drift		33
3.2 Componentele biologice ale biosenzorilor		34
3.2.1 Principiile recunoașterii moleculare		35
3.2.2 Imobilizarea moleculelor gazdă		42
3.2.3 Transducția semnalului		42
3.2.4 Tipuri de componente biologice		43
3.2.5 Integrarea componentelor biologice în biosenzori		46
3.3 Traductori și electrozi		51
3.3.1 Electrozi		52
3.3.2 Electrozi în senzori electrochimici		53
3.4 Fenomene de transport		54
3.4.1 Cinetica Enzimelor		55
3.4.2 Fenomene de transport		56
4. Biosenzori electrochimici	59	
4.1 Senzori chimici vs senzorii biochimici		59
4.2 Biosenzor electrochimic		62
4.3. Clasificare		62
4.4 Receptorul		63
4.5 Moduri de transducție electrochimică		65
4.6 Analizi, reacții monitorizate.		67
4.7 Construirea unui biosenzor electrochimic.		67
4.8 Criterii de performanță		69

4.9 Exemple de biosenzori electrochimici		73
4.10 Referințe		85
5. Biosenzori microbieni	89	
5.1 Principiu de funcționare		90
5.2 Răspunsul fiziologic al senzorului microbial		93
5.3 Referințe		98
6. Senzori pe structuri semiconductoare FET	99	
6.1 Tranzistori FET, ISFET, CHEMFET, REFET		99
6.2 Referințe		104
7. Biosenzori cu fibră optică	105	
7.1 Fibre optice, caracteristici generale		106
7.2 Fibre optice cu rețele Bragg induse		109
7.3 FOBS în medicină		110
7.4 Referințe		116
8. Celule de biocombustie	117	
8.1 Necesitatea implementării surselor alternative de energie		117
8.2 Celule de biocombustie-celule bioelectrochimice		118
8.3 Mecanisme în celulele bioelectrochimice		119
8.4 Clasificare		121
8.5 Celule de biocombustie microbiene (MFC)		122
8.6 Elemente de electrochimia MFC		125
8.7 Referințe		128
9. Nanoparticule în medicină	131	
9.1 Nanofibrile, Nanocarboni, rolul lor în microbiologia clinică		133
9.2 Nanocarboni		136
9.3 Puncte cuantice		147
9.4 Referințe		162
10 Nanotuburi de carbon	165	
10.1 Istoric		165
10.2 Structură, proprietăți		167
10.3 Funcționalizare		169
10.3.1 Purificarea nanotuburilor		169
10.3.2 Evaluarea purității CNT		170
10.3.3 Selectarea nanotuburilor după lungime și diametru		172
10.3.4 Separarea CNT după proprietățile lor metalice sau semiconductoare		172
10.3.5 Atașarea de grupe funcționale		174
10.4 Referințe		176
11 Nanofire, nanosenzori	179	
11.1 Senzori FET cu nanofire		179
11.2 Limitele de detecție și răspuns pentru nanobiosenzori		183
11.3 Referințe		186

*Această carte este dedicată  
în primul rând celor doi copii Ionuț și Șerban pentru înțelegerea și sprijinul acordat,  
suportul spiritual al timpurilor grele,  
acelor Oameni care mai cred în adevăr  
și lui Nini Pop prietenul de o viață*



# 1. Introducere în nanotehnologie

*„Discovery consists of seeing what everybody seen and thinking what nobody has thought”*

Albert von Szent-Gyogyi  
The Scientist Speculates, 1962

*If our small minds, for some convenience, divide this... Universe into parts - physics, biology, chemistry, geology, astronomy, and so on – remember that nature does not know it!*

R. P. Feynman, 1963

*“When nature finishes to produce its own species, man begins using natural things in harmony with this very nature to create an infinity of species”*

Leonardo da Vinci

Secolul XXI se confruntă cu transformări de anvergură atât în științele naturii cât și la nivel social, economic, uman. Societatea tinde spre informatizare și globalizare a schimburilor comerciale datorită dezvoltării și integrării pe verticală respectiv pe orizontală a proceselor de producție avansate ce înglobează ultimele inovații ale științei și tehnologiei. Ca orice transformare impactul asupra mediului, dezvoltării sociale, sănătății, dezvoltării demografice respectiv a necesarului de energie este considerabil. Asistăm la transformări și crize de neimaginat altădată: reducerea considerabilă a combustibililor fosili, noi tipuri de boli, epidemii care altădată erau necunoscute, transformări ale naturii datorită încălzirii globale, creșterea accelerată a stresului, modificări drastice în mediu datorită noxelor și deșeurilor, dispariții de specii naturale etc.

Cum acționăm să prevenim? Cum monitorizăm aceste fenomene? Ce soluții avem pentru surse noi de energie și combustibili ecologici? Cum reintegrăm deșeurile? Cum prevenim bolile sau le vindecăm pe acelea incurabile?

Ce soluții ne oferă științele și tehnologiile actuale sau cele de viitor?

Un răspuns categoric nu există iar lucrurile trebuie privite în dinamica dezvoltării societății care este o societate de consum adică lucrurile bune astăzi devin neutilizabile mâine datorită apariției altora mai performante.

Un răspuns actual este dezvoltarea și implementarea nanotehnologiilor la orice scală de dezvoltare a societății în curs de globalizare.

Nanotehnologia este germinată de rezultatele științelor interdisciplinare din secolul XX și a noilor instrumente de investigare la scală nanometrică a materiei. Ea a generat ulterior o largă intermixare a științelor altădată considerate fundamentale și a propulsat noi domenii de cercetare de neimaginat cu câteva decenii în urmă. În sens restrictiv este știința materialelor a căror proprietăți depind de dimensiune și cuprinde:

- Nanostiințele: fenomenele și legile fundamentale ale fizicii, chimiei, biologiei aplicate la scală nanometrică.
- Nanoinginerie: manipularea moleculelor pentru a construi noi tipuri de materiale; instrumentele și metodele prin care sunt proiectate și realizate dispozitive la scală nanometrică, asamblarea lor în produse de larg consum și pentru noi cercetări avansate.

Nanotehnologia, “tehnologia fabricației secolului 21”, cuprinde ingineria de înaltă precizie, direcția principală în aplicațiile biomedicale din arii ca terapia genetică, transportul dirijat de medicamente, noi tipuri de medicamente, tehnici de sinteză la scală nanometrică sau mai concis *arta manipulării atomilor individuali și a moleculelor pentru a construi structuri cu proprietăți dirijate*.

Nanotehnologia reprezintă abilitatea de a construi obiecte prin asamblarea de atomi în secvențe de timp bine precizate. A construi structuri pornind de la atomi și molecule este necesar inventarea de dispozitive de asamblare la scală nanometrică. Rolul lor este de a asambla atomii și moleculele în miliarde de configurații specifice unei structuri nanometrice. Capacitatea ansamblurilor de a se autoreplica este una din cerințele de bază a instrumentelor nanometrice. Fiecare nanoinstrument va trebui să opereze în mod propriu și să fie programabil.

Materialele sintetizate a căror dimensiuni caracteristice se situează între 1nm și 100 nm au proprietăți dependente de dimensiune. Aceasta prezintă un interes științific deosebit. Cu cât dimensiunea unui material se reduce cu atât fenomenele cuantice sunt mai pronunțate iar defectele sunt mai puțin importante ca în procesele de sinterizare ca exemplu.

Interesele industriale sunt enorme: depășirea limitărilor din litografie pentru tehnologia semiconductorilor, cererea de control la nivel molecular, simplificarea proceselor, durificarea suprafețelor, aplicații fotonice, controlul permeabilității, biocompatibilitate pentru a enumera câteva din ele

**Nanotehnologia**: este un domeniu multidisciplinar care aduce marile realizări științifice din Fizică, Chimie, Biologie, Matematică și Știința materialelor spre aplicarea lor la a construi cu atomi și molecule materiale la scală nanometrică cu inteligență artificială, structuri biocompatibile, surse de energie neconvenționale, nanoroboți pentru medicină, cipuri cu densitate mare a componentelor și biomateriale auto-replicabile etc. Metoda de construcție de jos în sus este astăzi cunoscută ca “building from bottom-up”. Este domeniul unde structurile biologice (ADN, proteine, oligomeri și bio-oligomeri) sunt arhitecturate cu materiale sintetizate la scală nanometrică utilizând tehnici combinate din fizică și chimie (microscopia de forțe atomice, nanolitografia, fascicule moleculare, nanoelectrochimie, sol-gel) cu cele din genetică; domeniul unde moleculele și polimerii devin dispozitive electronice (electronica moleculară); domeniul unde proprietățile materialelor sunt exploatate la extrem pentru tehnica spațială; domeniul unde se dezvoltă întreaga tehnologie a informației.

**Ramurile Nanotehnologiei**: nanofabricație, nanomecanică, nanorobotică, nanocompozite și compozite nanostructurate, nanobiotehnologie, nanomedicină, electronică



moleculară, MEMS, NEMS (sisteme micro/ nanoelectromecanice), microfluidică, medicamente inteligente, textile inteligente, biosenzori, econanotehnologie.

Nanotehnologia a revigorat întreaga industrie electronică; astăzi dimensiunile unui tranzistor nu depășește 180 nm într-un procesor

Aceste domenii de cercetare vor profita de combinarea eforturilor teoretice și experimentale din electronica moleculară și materialele inteligente supramoleculare.

Conexiunea dintre ramurile nanotehnologiei o constituie *Sistemele Micro și Nano-electromecanice*, discipline noi create o dată cu dezvoltările rapide din nano și micro-litografie, microelectronică, stereolitografie.

Dispozitive MEMS, NEMS, bioMEMS sunt aplicate la structuri complexe inteligente care cu o decadă în urmă practic erau de domeniul science fiction. Domeniul este focalizat în prezent pe crearea de micro/nanosisteme în efortul de combatere a terorismului, aplicații în securitatea domestică (protecția caselor, terenurilor etc), securitatea electronică, siguranță în exploatare.

Aspectele multidisciplinare sunt extrem de complexe pentru înțelegerea ingineriei acestor sisteme ce acoperă arii extrem de largi: nanostructuri, nanoelectronică, microfluidică, senzori biochimici de înaltă rezoluție, detecția substanțelor chimice și a agenților biologici nocivi, microsenzori pentru radioactivitate, senzori cu consum redus de putere, aplicații medicale, investigații noninvazive, biomimetică, secvențierea rapidă a ADN-ului, transportul la țintă a medicamentelor, polimeri electronici, nanooptică, tehnici analitice la nivel nanometric, nanoasamblare, nanointegrare, tehnologia informației la scală nanometrică, nanosisteme multifuncționale, bionanointerfețe.

Tehnologiile implicate în această ramură: microstereolitografie, microformări prin matrițare și extrudare la dimensiuni submironice.

**Produse și servicii generate de nanotehnologie:**

- Dispozitive chimice inteligente, compatibilitate pentru microsisteme; chimice, biocompatibilitate pentru bioMEMS;
- Senzori și actuatori inteligenți;
- Microsisteme MEMS inteligente pentru microanalize;
- Nanosisteme utilizate în transportul la țintă a medicamentelor;
- Electronica comunicațiilor: microantene cu autocontrol, reconfigurabile; tehnologia Bluetooth; RF-MEMS;
- Laborator-pe un cip (lab on chip): compensare, autocalibrare, transmisie de date; cipuri hibride; interfețe auto-adaptabile;
- Materiale pentru electronic packaging;
- Polimeri, biopolimeri autoasamblabili;
- Sisteme CAD/CAM pentru structuri MEMS: modelare electro-termomecanică, microfluidică;
- Pentru medicină, farmacie, bioingineria dispozitivelor Lab- on cip, biologie moleculară, inginerie genetică, proteomică, biomimetică: nanoboți transportori de medicamente reparatori de țesuturi, nanoboți cu proprietăți de anticorpi, nanoboți sanepizi.

- Tehnologie IT: dispozitive pe structuri CNT (nanotuburi de carbon), nanofotonică, pile sau celule de combustie nanometrice, dispozitive spintronice.

Practic este imposibil de a prezice implicațiile nanotehnologiei dar simplu am putea considera că noile domenii ce apar se dezvoltă într-un ritm alert. Oricum trebuie să remarcăm un lucru esențial despre nanotehnologie și produsele ei:

*„Primul lucru care trebuie a fi cunoscut despre tehnologie este acela că tehnologia prin ea însăși nu crează bogăție, plus valoare și bunăstare. Numai produsele și serviciile care sunt create de tehnologie pot fi vândute sau comercializate. În timp ce este adevărat că tehnologia poate conduce la procese care pot crea plus valoare prin îmbunătățirea eficienței unor operații existente, dezvoltarea și furnizarea acestor procese este frecvent realizată de către o altă firmă ce oferă acest tip de serviciu. Există deasemeni o asociere apropiată dintre un nou proces și un nou produs sau serviciu”*

*Denzil J. Doyle, Making Technology Happen, 2001*

Întrucât capitolele ce tratează diferite aspecte ale implicațiilor nanomaterialelor în biosenzori și medicină, consider că este necesar a da unele definiții:

**Nanobiotehnologie:** știință multidisciplinară care aplică instrumente și procese din nano /microfabricație pentru a construi dispozitive în vederea studierii biosistemelor, micro-analiza biomoleculelor prin interfațarea unei singure celule, ridicarea profilului metabolismului și biochimismului ei, analiza răspunsului la diferiți analiți; nanoparticule inspirate din biologie; biosenzori, celule de combustie microbiene, noi tipuri de markeri etc

**Nanomedicină:** descrie un set de capacități a sistemelor de mașini moleculare care pot fi utilizate în diagnostic, tratament și reparări de țesuturi sau organe: dispozitive medicale nanorobotice, abilitatea de a recunoaște, sorta și transporta molecule, autogenerare, comunicare cu medicul, abilitatea de a migra prin tot corpul de a manipula obiecte microscopice, de a dezafecta celule și viruși, evidențierea genelor responsabile de cancer eventual repararea lor.

**Econanotehnologie:** nanotehnologia în protecția mediului și a poluării, epurarea mediului și soluții noi de energie regenerabilă, recuperarea și menținerea biodiversității, toxicitatea nanoparticulelor (nanonoxe).

Lucrarea de față abordează teme și subiecte de mare actualitate fiecare capitol putând fi studiat separat. Ea este rezultatul lecțiilor de curs ținute la secțiile de master de Biofizică și Fizică medicală, Fizica Polimerilor dar mai ales al cercetărilor din diferite contracte naționale și internaționale pe teme diverse ce au dezvoltat aceste subiecte:

1. FP-6, TOK, Biological and microbial fuel cells ( TOK-Marie Curie)
2. NATO-SfP 974214, Carbon-Ceramic composite materials for electrical engineering applications.
3. PN-II-2007, Dezvoltare de biosenzori bazați pe acizi nucleici pentru evaluarea și monitorizarea unor agenți toxici cu aplicații în bioterorism.

4. CEEEX-PD-3158, proiect postdoctoral, Celule de combustie – stocare de hidrogen.
5. CEEEX- Ctr 25/2005, Impactul micotoxinelor produse de specii de fungi ale genului Fusarium, asupra lanțului alimentar; investigarea unor metode de contracarare a toxicității acestora în scopul îmbunătățirii calității și securității alimentare la nivelul standardelor impuse de aderarea la UE.
6. CEEEX-Ctr 88/2005, Materiale alternative multifuncționale cu cost scăzut, pentru pile de combustie cu electrolit polimer (PEMFC) ce operează la temperaturi mai mari de 180°C.
7. CEEEX-Ctr. 635/2005, Sticle ecologice obținute prin nanotehnologii, pentru atenuarea, adaptarea și reastaurarea factorilor de mediu naturali .
8. PCI 2006-Universitatea din București, Măsurarea, caracterizarea și manipularea structurilor nanometrice cu microscopia de forțe atomice
9. CEEEX-Ctr 60/2006, Administrarea dirijată de medicamente prin nanostructuri procesate prin tehnici laser pulsate avansate
10. CEEEX- Ctr. 110/2006, Model experimental pentru studiul biodisponibilității unor factori nutriționali (Ca, B, fitosteroli) și influența lor asupra mineralizării osului la porc, suport științific în studiul osteoporozei
11. MATNANTECH / PF 256 / 2004 Nanostructuri pe bază de carbon sintetizate prin tehnici avansate și acțiunea lor asupra microorganismelor patogene.
12. CERES / PED, 2004, Acoperiri nanostructurate de biopolimeri obținute prin evaporare laser pulsată asistată de o matrice pentru aplicații în industria farmaceutică

Prin multitudinea subiectelor tratate cartea se adresează specialiștilor din diferite domenii ale fizicii, biologiei, chimiei, medicinei și ingineriei încercând să furnizeze instrumente utile de investigare, concepere, design de dispozitive de senzare și de utilizare a nanomaterialelor în diverse domenii. Este concepută în așa fel încât să furnizeze cunoștințele necesare pentru inițierea studenților, tinerilor cercetători în a aborda domenii multidisciplinare dar și pentru cercetători avansați care doresc să-și extindă aria de investigare spre multidisciplinaritate.

Cartea include o serie de rezultate originale, idei și concepte de utilizare ale nanomaterialelor care sunt publicate pentru prima dată.

Fiind rezultatul multiplelor cercetări și experimentări în domenii diverse aduc pe această cale mulțumiri cercetătorilor și profesorilor care au participat și sprijinit această inițiativă:

Profesor universitar dr Ioan Pânzaru, Rector al Universității din București, pentru sprijinul acordat în abordarea acestor cercetări multidisciplinare și de a înființa primul centru de cercetare în nanoștiințe și surse alternative de energie

Profesor universitar dr. Ion Mihăilescu, pentru primul ajutor acordat de a iniția și forma centrul de cercetare.

Profesor universitar dr. Emil Barna, Prorector al Universității din București, pentru înțelegerea și încrederea acordată.

Profesor universitar dr. Anton Ciucu, pentru discuțiile și sugestiile în elaborarea capitolelor de biosenzori

Profesor universitar dr Ion Mihailescu, INFLPR, pentru dezvoltarea de cercetări și a aplicațiilor radiației laser în manipularea biopolimerilor

Dr. Ion Morjan și Dr. Ion Voicu, INFLPR, pentru discuțiile fructuoase de utilizare a nanocarbonilor

Dr. Luminița Stamatina, S.C Biolumimeditica, pentru experimentele și cercetările dezvoltate pe bionanocompozite, aplicații în parazitologie și microbiologie medicală

Dr. Ionela Țăranu, IBNA, pentru discuțiile fructuoase de utilizare a punctelor cuantice în detecția micotoxinelor.

Dr. Rîmbu Gimi Aurelian și Dr Iulian Iordache, ICPE-CA, pentru multiplele discuții și cercetări comune în domeniul celulelor de combustie respectiv bio-combustie

Dr. Rodica Cristescu, INFLPR, pentru dezvoltarea de cercetări în metode de transport dirijat al medicamentelor la țintă.

Dr. Elisa Mihai, Dr. Bogdan Sava Alexandru, INOE, pentru dezvoltarea de cercetări în domeniul sticlelor ecologice.

## 2. Biosenzorii în contextul transdisciplinarității științelor

### 2.1 De la chemosenzor la biosenzor

Lumea în care trăim este rapid dominată de informația digitală și de necesitatea de a investiga materia la scală din ce în ce mai mică cu instrumente aparent ultrasofisticate ce pot „vedea” atomii și moleculele la lucru prin interacția și asamblarea lor pe diferite nivele de organizare. Inițial, revoluția digitală a implicat în principal computere autonome care gradual s-au integrat în rețele complexe practic globalizate.

Unirea calculatoarelor cu sistemele de telecomunicații a dus la o creștere enormă a accesibilității la informație și de aici creșterea cerinței pentru aceasta. În prezent, această cerință este dominată de un amestec de texte, audio și imagini structurate în baze de date care astăzi sunt omniprezente prin accesibilitatea la internet. Comunicațiile și internetul din ultima decadă va alimenta cererea pentru mai multe surse de informații și date despre aspecte importante din viața noastră, sănătatea, mediul înconjurător, mîncarea, munca noastră.

*Corpul uman și în general toate ființele vii și-au dezvoltat, în decursul evoluției, senzorii specifici care să mențină echilibrul fiziologic și metabolic în raport cu interacțiunea și schimburile cu mediul înconjurător. Din nefericire modificările ambientale, societatea din ce în ce mai tehnologizată, implicarea abuzivă și nerațională a omului asupra biosistemelor reglatoare ale naturii a condus la dezechilibre pe care ființele vii nu și le mai pot regla prin sistemelor lor senzoriale proprii. Avem din ce în ce mai multe nevoie de senzori artificiali care să fie interfața monitorizării și schimbării.*

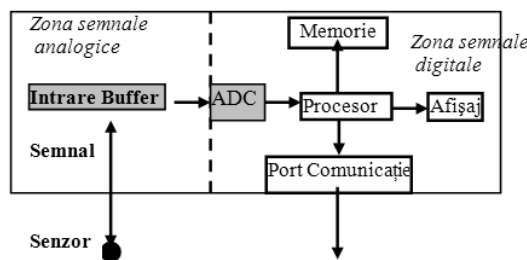


Figura 2.1- Schema tipică a unui instrument de control și măsurare în senzor. Semnalul de la senzor trece într-un buffer- amplificator operațional-cu impedanță mare de intrare și protecție. Semnalul este digitizat de către ADC transformându-se din analog în digital. În formă digitală poate fi procesat, stocat, afișat, disponibil spre alte locații prin rețeaua de comunicații

Astfel senzorii oferă portale dintre lumea “reală” sau analoagă în care trăim și lumea digitală a computerelor și a sistemelor moderne de comunicație prin care ne racordăm

spre mediul ambiant. Sensorii fac posibil ca să se obțină informații în timp real despre lucruri pe care le putem vedea, atinge, mirosi și auzi și despre alte lucruri care nu le putem detecta – lucruri care pot fi nocive sau folositoare pentru noi. Semnalul electronic colectat de la senzor este trecut într-un circuit unde este digitizat de un convertor analog-digital (ADC) (figura 2.1). Informația digitală poate fi apoi stocată în memorie, reprodușă vizual pe un monitor sau făcută accesibilă lumii reale printr-un port digital de comunicație.

Din lumea extrem de diversificată a senzorilor ne vom ocupa de biosenzori, clasă a senzorilor chimici, însă pentru o descriere concisă a problematicii biosenzorilor atât de vastă și variată o definiție se impune de la început în contextul general a noțiunii de **senzor** așa cum figura 2.1 descrie conceptul de detecție și prelucrare a semnalului.

Senzorul în accepțiune largă este un dispozitiv ce detectează un „analit”, A, prin intermediul unui „receptor”, R, ce este cuplat la un „traductor”, T. Interacția analit-receptor produce un schimb de electroni sau emite/absoarbe fotoni pe care traductorul îl transformă într-un semnal electric sau fonic, analogic sau digital

În figura 2.2 este prezentată schema de principiu a unui senzor.

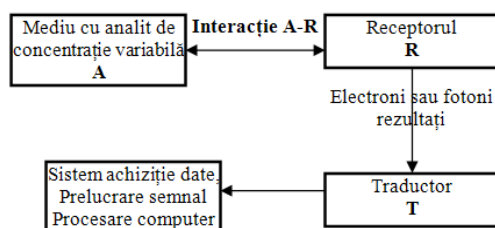


Figura 2.2- Principiul general de construcție și funcționare a unui senzor. Interacția A-R produce un semnal intern preluat de detector, aflat în contact intim cu transfer spre traductor (figura 2.1)

Un senzor chimic sau biologic funcționează pe principiul descris în figura 2.2 prin emiterea de semnal (tensiune sau curent electric, fonic) ca răspuns la o reacție chimică cum ar fi legătura dintre două molecule. Acest eveniment implică un receptor chimic sau biologic, R (ligand macrociclic, enzimă anticorp etc) care se leagă cu o moleculă țintă specifică dintr-o probă de studiat, analitul, A. Transmiterea semnalului este realizată prin cuplarea cu un traductor, T care interfațează procesele din senzor cu unitatea de prelucrare –transformare într-un semnal măsurabil. Detaliu de funcționare și construcție pentru chemosenzor /biosenzor este prezentat în figura 2.3. Conceptul descris în figura 2.3 arată că biosenzorii sunt o clasă, astăzi extrem de vastă cu particularități specifice.

Astfel putem să adâncim definiția de biosenzor spre particularitățile lui.

**Biosenzor**-dispozitiv sensibil la un stimul fizic sau chimic (cum ar fi căldura sau aciditatea, metabolismul) care transmite informații despre procesele vitale. Biosenzorii se

ocupă cu detectarea semnalelor fiziologice și transformarea lor în semnale “tehnice” standardizate, de cele mai multe ori electrice, pentru a fi cuantificate din analog în digital.

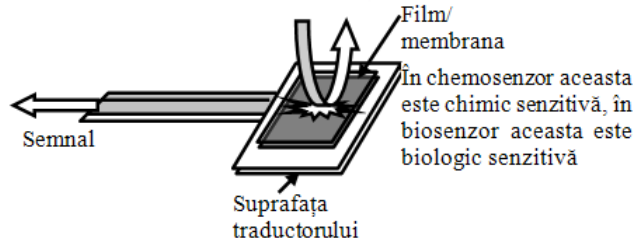


Figura 2.3 În chemosenzor, procesul chimic selectiv ce apare în sau pe filmul /membrana chemosenzitivă este cuplat cu traductorul de semnal. Exemple de mecanisme comune implicate includ legarea host-guest (reactant-substrat reactiv), reacții catalitice sau redox. În senzorul biologic un proces biologic selectiv este direct legat de membrană care este cuplată la traductor pentru generarea semnalului

Analiza de semnale în medicină și biologie vizează prelucrarea semnalelor înregistrate prin măsurători în scopul extragerii maximumului de informație utilă în diagnosticare și monitorizare. Pe baza acestei descrieri generale se observă că senzorii în particular biosenzorii pot fi clasificați după natura traductorului sau a semnalului procesat, figura 2.4.

Figurile 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 arată că un senzor este un instrument de măsurare a mărimilor fiziologice transformându-le în semnale măsurabile.

Acest aspect a parcurs în ultimii ani drumul de la simpli traductori și aparate de măsură la sisteme complexe care integrează atât electronica analogică, cât și digitală.

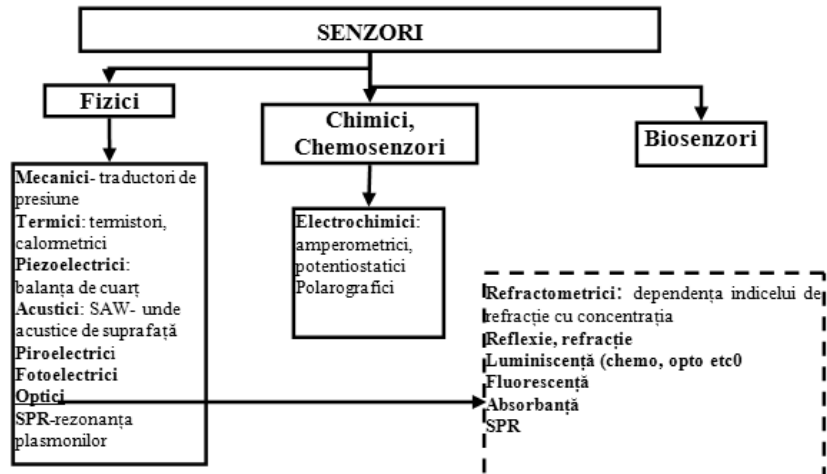


Figura 2.4- Clasificarea senzorilor după natura proceselor măsurate de traductor

Stadiul actual de dezvoltare este cel din figura 2.1 unde totul este integrat și digitalizat. Operațiile care în mod tradițional se efectuau analogic (filtrare, sumare, scădere, diferențiere, integrare) tind să se facă în măsură tot mai mare prin algoritmi de calcul implementați în unitatea de achiziție și procesare de date devenind sisteme moderne de măsurare și transmitere a mărimilor fiziologice.

Efectul acestei tendințe de miniaturizare și digitizare a aparaturii simultan cu creșterea performanțelor a condus la implementarea de funcțiuni mai complexe care la nivelul analogic ar necesita un număr mare de componente liniare discrete (rezistori, condensatori, tranzistori, diode, amplificatoare operaționale).

Biosenzorii au o istorie recentă. În a doua jumătate a secolului XX biosenzorii erau considerați ca o ramură derivată a chemosenzorilor. Dezvoltarea ca știință transdisciplinară s-a datorat succeselor curente ale biosenzorului de măsurare a glucozei pentru diabetici o metodă convenabilă, igienică, compactă de automonitorizare. Cu acest eveniment biosenzorii au arătat un potențial enorm de a detecta o varietate largă de analiți în medicină, industria alimentară, monitorizarea mediului, apărare, securitate. În tabela 2.1 sunt summarize interferențele aplicațiilor chemosenzorilor -biosenzorilor în decursul evoluției lor. Așa cum este prezentat în tabela 2.1, există multe domenii cu aplicații importante pentru senzorii chimici și biologici, de la monitorizare continuă a proceselor chimice din industrie, sesizarea monoxidului de carbon în case, din mediu ambiant la medicina curentă, terapie intensivă, telemedicină

**Tabela 2.1: Aplicații de uz comun ale chemo și biosenzorilor**

<b>Aplicații</b>	<b>Exemple</b>
Automobile	Sistemul de control al alimentării cu combustibil, monitorizarea emisiilor de gaze și noxe
Apărare	Aplicații militare, contramăsuri în armele biologice și chimice
Industria aeronautică	Sisteme de monitorizare a calității aerului în carlinga avionului,
Agricultură	Detecția pH, ierbicide, pesticide
Industria Chimică	Sisteme de monitorizare a emisiilor de gaze toxice, testare materiale
Securitate civilă	Detecția gazelor
Mediu, Protecția mediului	Detecția poluanților din aer, apăși sol, BOD, controlul detergenților
Medicină	Diagnostiche clinice in vivo sau in vitro, determinarea concentrației de gaze anestezice, telemedicină, terapie intensivă
Control Vamal	Detecția substanțelor ilegale, periculoase, droguri, explozivi, substanțe radioactive
Alimente, Băuturi	Determinarea compoziției chimice, mirosuri, nivelul de degradare, odorante, controlul fermentației, etc



## 2.2 Biosenzorii și nanotehnologiile

Dezvoltarea impetuoasă a biosenzorilor ca o consecință a cerințelor din medicină, protecția mediului, securitate alimentară a impulsionat tehnologiile actuale spre limite și performanțe nebănuite. Noțiunea de senzor, respectiv biosenzor, a evoluat pe măsura creșterii cerințelor de diagnostic noninvaziv, de investigații și analize fără reactivi suplimentari, de a fi utilizați de nespecialiști, de a lucra on-line (regim continuu de monitorizare) sau de a fi de unică folosință. Datorită evoluțiilor actuale spre nanotehnologii biosenzorul își perfecționează definiția. Actual prin *biosenzor se înțelege încorporarea sau integrarea unui element biologic cu un traductor fizic și cu instrumentele și electronica aferentă*. Se așteaptă ca în următorii anii să includem în definiție termeni ca interfețe hibride alcătuite din biocomponente și procesoare moleculare

În mileniul III biosenzorul nu mai poate fi disociat de tehnologiile avansate din optoelectronică, tehnologia siliciului, procesarea de date, electronică moleculară, tehnologia IT&C. Așa cum se va prezenta în următorul capitol clasele de biosenzori se extind și se perfecționează odată cu noile avansări în nanotehnologie cu un impact asupra biotehnologiei și medicinei, ecotehnologiilor care acum o decadă era de neimaginat.

Domenii specifice ale biologiei și medicinei unde nanotehnologia se implementează cu o puternică vigurozitate a generat noi direcții astăzi cunoscute sub denumiri de *nanomedicină, nanobiotehnologie* termeni deja consacrați (*subdomeniul biosenzori deja este privit ca interdisciplinar dintre nanobiotehnologie și nanomedicină*).

Nanotehnologia și biosenzorii s-au impulsionat reciproc în dezvoltare. În etapele inițiale s-au interferat reciproc prin implementarea unor algoritmi numerici mai puternici și mai complecși (software) ce s-au realizat în cadrul structurii fizice de calcul numeric, (hardware) existente. La acestea au concurat progresele tehnologice în termeni de reducere a volumului fizic al componentelor discrete iar ulterior a circuitelor integrate digitale care au continuat cu o integrare și ultraminiaturizare până la nivelul de 1nm. În paralel dezvoltarea în timp a medicinei a urmat, în mare, evoluția încercărilor omului de a se cunoaște mai bine, de a împinge tot mai departe cunoștințele în ceea ce privește mediul în care se dezvoltă.

Treptat, tehnologii avansate și nanotehnologii din ce în ce mai sofisticate au pătruns tot mai mult în cercetarea medicală și a mediului înconjurător, realizând o investigație tot mai amănunțită, mai riguroasă, a fenomenelor vieții, a bolilor, a mediului.

Secolul 21 aduce disciplinele din științele naturii, anterior considerate independente, într-un context de interdisciplinaritate nebănuț odată cu dezvoltarea acestui nou concept: nanotehnologia.

Nanotehnologia reprezintă științele la scală nanometrică, manipularea materiei nanometrice în realizarea de noi structuri și ansamble moleculare. Un nanometru reprezintă a miliardă parte dintr-un metru, aproximativ 1/80000 din diametrul firului de păr sau de 10 ori diametrul atomului de hidrogen.

O definiție: Nanotehnologia este tehnologia bazată pe arta manipulării atomilor individuali și a moleculelor pentru a construi structuri cu proprietăți dirijate.
---

Nanotehnologia reprezintă abilitatea de a construi obiecte prin asamblarea de atomi la un moment de timp în secvențe bine precizate. În prezent cu instrumentele puse la dispoziție de nanotehnologie, inginerie genetică, proteomică construim obiecte de „jos în sus=bottom-up” adică ansamblăm atomi și molecule în structuri.

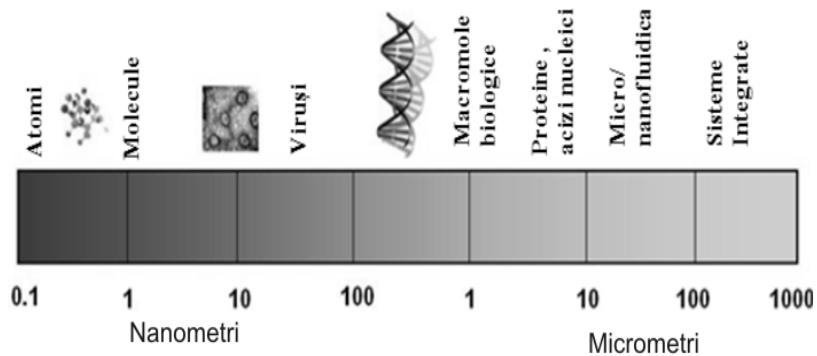


Figura 2.5- Dispunerea organizării materiei pe scară nanometrică-micrometrică

Pentru a realiza aceasta este necesar de alte tipuri de instrumente și dispozitive de dimensiuni nanometrice. Pentru a realiza obiecte macroscopice avem nevoie de miliarde de aceste mici dispozitive (*ansambleri*).

A reproduce aceste tipuri de instrumente avem nevoie de o metodă de a se autoreproduce sau de instrumente de replicare (*replicatori*). Noile instrumente nanometrice necesită a fi programabile pentru a realiza un anumit tip de operație. În figura 2.5 sunt prezentate diferite nivele de organizare ale materiei, la scară nanometrică și micrometrică.

Se constată imediat că instrumentele nanotehnologiei au dimensiuni sub acelea ale virusurilor. Obsevăm ușor din figura 2.6 cum noile instrumente ale nanotehnologiei pot manipula atomi și molecule la scară nanometrică.

Iată că în acest context traductorii, componente esențiale într-o structură senzorială, capătă semnificații cu totul deosebite datorită miniaturizării și integrării pe scară largă în circuitele integrate devenind ele însăși cipuri cu o puternică interfațare a proceselor de reacție analit-receptor.

Cînd receptorul conține componente biologice parțial sau total integrate pe traductor atunci orice tip de senzor capătă definiția de BIOSENZOR- ca un atribut generic.

În acest context și noțiunea de biosenzor evoluează mai ales privit ca domeniu de aplicație. În ultima decadă termenul de biosenzor a fost în variate moduri aplicat la un număr de dispozitive fie pentru monitorizarea sistemelor vii sau pentru acelea care au încorporate elemente biotice. Recent comitetul IUPAC [1] a încercat o lămurire a definiției termenului de biosenzor printr-o sistematizare a literaturii de specialitate care în decursul timpului a fost utilizat pentru a descrie termometre, spectrometre de masă, dispozitivele de determinare a *daphniei* în ecosistemul apelor, echipamente electrofiziologice, identificări de elemente chimice prin electrozi ionselectivi.

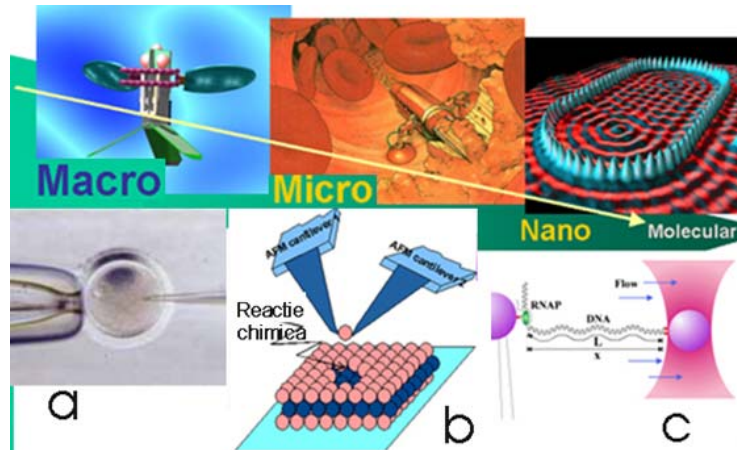


Figura 2.6- Manipulatoare al materiei de la scală micro (a) -implantări din ingineria genetică- la nanoscală (b) unde prin AFM (microscopia de forțe atomice) se pot poziționa și asambla atomi sau molecule (mecanosinteza) sau lucra cu fluide și transport de elemente bio( micro/nanofluidică) (c)

Prin consens s-a stabilit că termenul trebuie să fie rezervat pentru utilizarea în context modern ca un senzor ce încorporează elemente biologice cum ar fi, enzime, anticorpi, acizi nucleici, microorganisme sau celule. IUPAC sugerează ca acest termen să fie pe deplin folosit în acest context. O dată cu dezvoltările din nanotehnologie care au adus o extrem de largă interdisciplinaritate iar materialele sunt în prezent manipulate la scală nanometrică noțiunea de biosenzor capătă o definiție mai largă:

Biosenzorul va fi definit ca un dispozitiv analitic compact încorporând un element senzorial biologic sau derivat biologic integrat intim cu un traductor fizico-chimic. Scopul biosenzorului este de a produce un semnal electronic analogic sau digital care este proporțional cu concentrația unui analit singular sau a unui grup de analiți [2].

Actual, biosenzorii sunt utilizați în foarte multe domenii cum ar fi medicină, industria chimică, alimentară, farmaceutică, tehnică militară și de aceea este necesară cunoașterea principiilor de construcție și funcționarea lor. Domeniul în care aceste dispozitive și-au găsit o largă utilizare fiind cel medical se impune cunoașterea mecanismelor de reacție și a afinității enzimelor și microorganismelor pentru diferite substraturi de interes.

Cercetările actuale au ca scop miniaturizarea de a crea arii de senzori, structuri integrate, laboratoare de analiză pe un singur cip, creșterea sensibilității și a timpului de viață, scăderea timpului de răspuns, lărgirea plajei de utilizare și scăderea costurilor de fabricație a acestor dispozitive.

## 2.3 Biosenzori, biodiagnostic, nanobiotehnologie, nanomedicină

Astăzi vorbim despre platforme de diagnostic, imagistică moleculară și diagnostic molecular, caracterizarea proceselor și structurilor biologice. Toate acestea au la bază fundamnetarea și dezvoltarea biosenzorilor. Fără ei nu am putea astăzi să dezvoltăm domenii ca: sisteme de detecție și identificare, recunoaștere moleculară, nanoparticule funcționalizate cu sisteme biologice, arii de senzori cu înaltă sensibilitate și răspuns rapid, imagistică cu microscopia de baleiaj prin forțe atomice- SPM (scanning probe microscopy) a structurilor biologice, detecția intracelulară a biomoleculelor, ingineria nanobio-interfețelor.

După cum se observă ne apropiem de punctul unde detecția unei singure molecule, determinarea in vivo cu precizie a proprietăților biologice și a interacțiunilor specifice va fi posibilă. Atingerea acestui țel va permite cercetătorilor, medicilor, tehnicienilor de:

- A obține o detecție sigură a biomoleculelor în volume de probe minimale, evaluarea și diagnoza rapidă din materiale neprocesate, direct prelevate- de exemplu diagnoza rapidă a bolii sau detecția incipientă a contaminării biologice.
- A studia ciclul de viață în timp real a organismelor la nivel molecular, de exemplu pentru determinarea interacției intracelulare a proteinelor virale cu celulele lor țintă conducând astfel la o mai bună înțelegere a bolilor asociate.
- Investigarea dinamicii proteomice și astfel diferențierea căilor și a răspunsului celular la schimbările din mediul ambiant.

Astăzi discutăm și elaborăm concepte despre:

1. *Platforme de diagnostic*: arii de biosenzori incluzând acelea de a utiliza nanoparticule imobilizate și metode de identificare rapidă cu cantități minimale de probe de material.
2. *Diagnostic imagistic la nivel molecular*: utilizarea nanoparticulelor ca soluție alternativă de diagnostic în timp real a analizei intracelulare, imagistică medicală cu nanoparticule. (Un capitol special în lucrare va fi acordat punctelor cuantice fluorescente ca elemente de identificare și analiză)
3. *Caracterizarea structurilor și a proceselor biologice*: utilizarea de instrumente cum ar fi SPM- cu sondă nanometrică pentru investigarea in situ a interacțiilor biomoleculare și de aici îmbunătățirea, perfecționarea înțelegerii dinamicii celulare și a ciclurilor de viață.
4. *Senzori*: detecția în timp real de biomolecule sau organisme cu aplicații pentru dispozitive de diagnostic fie la distanță fie în sistem ambulatoriu

### 2.3.1 Biocipurile și tehnologiile actuale ale secolului XXI

*Ce este un Biocip?*

Un biocip este un dispozitiv ce conține o structură de elemente senzoriale individuale (biosenzori) interconectate după funcții și specificități de recunoaștere, integrate pe

un cip. Numărul de biosenzori pe un cip poate fi de ordinul  $10^6$  unități. În acest grad de integrare se pot realiza un imens set de teste distincte extrem de rapid și eficient.

Biocipurile sunt adesea construite pe același principii ale microtehnologiei ca și microcipurile. În contrast cu microcipurile, biocipurile nu sunt în general structuri electronice ( deși ele pot conține diferite structuri electronice cuplate la elementele biosenzoriale). Premiza cheie a biocipurilor este aceea că ele pot realiza reacții chimice/ biochimice la micro și nanoscală. Fiecare biosenzor poate fi gândit ca un “microreactor” care realizează a reacție chimică specifică cu un analit. Biosenzorii din biocip pot fi realizați pentru a detecta o largă varietate de analiți incluzând ADN, anticorpi, proteine, biomolecule.

#### *Biocipurile în contextul micro și nanotehnologiilor*

Biocipurile în general sunt arii 2D de senzori plasați într-o rețea specifică cu coordonate bine precizate. De exemplu (figura 2.7) un senzor la coordonatele x-y de valoare (4,5) poate senza anticorpu pentru *HIV*, în timp ce senzorul la coordonatele (7,3) poate detecta anticorpu pentru virusul *Influenza*. Pentru a aranja senzorii în coordonate precise sunt abordate tehnici sofisticate de microdepunere de construire a unui lanț sau o matrice de senzori. Tehnica microdepunerii este costisitoare și de randament scăzut.

O altă tehnică recentă angajează tehnica indexării după funcția ce o îndeplinește și forma microbiosenzorului. Astfel senzorii pot fi plasați oriunde pe cip iar softurile de recunoaștere de imagini pot fi utilizate pentru a citi biocipul. Dispunerea și formarea biosenzorilor pe cip este realizată prin microlitografie sau tehnologia ink-printing sau de contact-printing. Avantajele sunt multiple: 1. senzorii pot fi produși în loturi sau secvențe care pot fi asamblați în paralel sau serial furnizând un randament înalt de fabricație. 2.Senzorii pot fi asamblați pe arii foarte mici, cu distanțe reduse între ei. 3. Pot fi generate structuri 3D furnizând semnale mari față de structurile 2D . 4. Poate fi încorporată orice tip de reacție biochimică 5. Senzorii pot fi produși separat și asamblați ulterior după specificitate și natura aplicației. Iată un concept avansat de platformă de diagnostic tip biochip (figura 2.7) pentru a detecta o clasă de virusuri.

#### **2.3.2 Biocipuri, nanobiotehnologia, nanomedicina**

Implementarea cuceririlor din biologie chimia supramoleculară și biochimie pe suportul nanotehnologiei și a instrumentelor de investigare la scală nanometrică dezvoltate în fizică a generat noul domeniu, acela al nanobiotehnologiei, unde biosenzorii și biocipurile ocupă un loc preferențial. Inferarea lor în medicină a generat noul domeniu: nanomedicina domeniul unde tehnicile non invazive și autoreparatorii sunt elementele esențiale ale viitorului medicinei. Curînd vom asista la sisteme și nanoroboți care vor lua locul chirurgiei și tratamentelor invazive: transportul dirijat al medicamentelor la țintă, nanoboți injectabili cu informații precise ce vor repara organe, generarea internă de celule de biocombustie pentru întreținerea activității inimii sau a sistemelor pulmonare, neuronale, reglarea glucozei din sînge de către celulele de biocombustie miniaturizate etc.

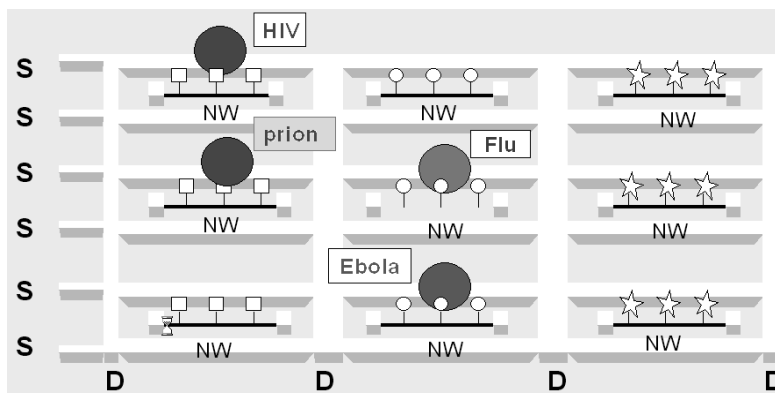


Figura 2.7- Arii de senzori interconectați prin nanofire (NW) ce pot detecta natura virusului care trece prin structura de microcanale dintr-un fluid biologic colectat. Fiecare arie de senzori detectează forma, dimensiunea tipul de toxină, activitatea specifică, preluând un semnal de prezență (S) și un semnal de detecție specific

Cîteva din perspective sunt sumarizate, începînd de la faimoasa publicație a lui Feynman: (Richard Feynman Plenary Lecture on Nanotechnology, 1963):

1. Electronica la scală moleculară- manipularea electronilor pe structuri ADN și proteine, asamblarea lor în structuri cu proprietăți electronice
2. Nanobioelectronica pentru biosenzori
3. Celule de biocombustie- sursa internă de energie ce consumă glucoza sau alte polizaharide din sînge generînd energie elec-trică pentru biostimulatoare sau pentru reglarea dozelor din bolile de diabet. Ele sunt surse de convertire a deșeurilor și biomasei în materiale rgenerabile ( agricultură, pesticide, etc). Celulele de biocombustie sunt componentele de bază în designul biosenzorilor microbieni.
4. Circuite bioelectronice
5. Arhitecturi supramoleculare la interfața electrod-electrolit, pentru aplicații în biosenzori
6. Detecția electrochimică a acidului 2,4 diclorofenoxiacetic sau a altor toxine, mirosuri, odorizante etc. ( nasuri electronice)
7. Nanostructuri polimere, 1D-2D-3D, elemete suport în biosenzori, protezare medicală
8. Microarii ca porți de legătură cu sistemele biologice. Interfețele neuronale artificiale
9. Dispozitive de calcul nanometrice formate din biomolecule cuplate cu interfețe clasice și biologice
10. Optica nanometrică în biosenzori și biotehnologie
11. Materiale nanocompozite, nanostructurate

12. Biocipuri, componente în alte tipuri de arhitecturi
13. Asamblarea de peptide la interfețe
14. Dinamica și fluctuațiile ADN-ului
15. Imprimare moleculară
16. Investigarea sistemelor de polimerizare electrochimică în procese sol-gel.  
Modificarea electrozilor prin funcționalizarea xerogelurilor anorganice
17. Biosenzori impedimetrice pe structuri de proteine și celule
18. Polimeri inteligenți: aplicații la elaborarea de dispozitive bioanalitice
19. Investigări în timp real cu biosenzori în timpul operațiilor chi-rurgicale
20. Investigarea mediilor moleculare prin optica neliniară, lumi-niscentă, etc

#### **Alte domenii transdisciplinare generate de biosenzori și nanotehnologii**

- Microarii, biocipuri, sisteme microbioanalitice
- Neuroprocesoare- senzarea și procesarea *In-Vivo* și *In-Vitro* a semnalelor neuronale
- Transportul electric prin ADN,
- Cip genetic
- Măsurarea amperometrică a exocitozei veziculare din neurotransmițători: descifrarea semnificației biologice și fizico-chimice

#### *Nanobiotehnologie și NanoBiosisteme*

- Nanoimprimarea biomoleculilor și a biosuprafețelor cu microscopia de forțe atomice
- Studiul relaxărilor în ADN cu “pensetele” optice (optical tweezers)
- Recunoașterea de mono/oligonucleotide pe monostraturi de filme polimere.
- Dinamica biopolimerilor, starea dinamică a motilității pe bază de actină
- Reglarea proteinelor motor, microtubule

#### *Nanobiotehnologie și Biosenzori*

- Monitorizarea noninvazivă a glucozei prin biocipuri ce controlează ultrasonic pielea permeată
- Arii de microace, cip-microfluidic pentru integrarea unei celule în sistem
- Senzori colorimetrice pentru analiza bacterială
- Senzori bacterieni pentru detecția metalelor grele
- Efectul biorecunoașterii (bioafinitatea) și implicațiile asupra vieții cotidiene. Monitorizarea genotoxicității în timpul degradării fotocatalitice a paranitrofenolului.
- Monitorizarea electrochimică a bacteriilor biotinilate denitri-ficatoare
- Celule-biocip pentru detecția toxicității

Iată numai câteva din domeniile unde biosenzorii au impulsat cercetările cu realizări notabile. Biosenzorii au propulsat domenii de graniță și au creat noi domenii și științe: chimia supramoleculară; tehnici de autoasamblare; concepția de noi receptori sin-

tetici utilizând metode combinatoriale; imprimări moleculare (molecular imprinting); nanosisteme; ingineria proteinelor, acizilor nucleici și a zaharidelor ca receptori și sisteme catalitice; ingineria biomoleculelor capabile de a avea funcțiuni suplimentare cum ar fi transducția semnalelor (fire moleculare) sau transmițeri mecanice (motoare moleculare, brațe moleculare; senzori cu acizi nucleici, cipuri cu ADN; imunosenzori, senzori pe structuri enzimatică; receptori naturali și sintetici; proteomica și analiza individuală a celulei; bioelectronica, celule de biocombustie, sisteme nanoanalitice

Deși aceste cuceriri ale științelor de graniță apăreau ca lucruri de neimaginat acum 20 ani totuși avem câteva elemente cheie de control care indiferent de scala de lucru sunt de o importanță perpetuă: selectivitatea, sensibilitatea, stabilitatea în proiectarea de sisteme senzoriale integrate cu structuri și aranjamente de elemente senzitive.

Observăm că indiferent ce concept se abordează în construcția și realizarea de biosenzori ne confruntăm cu următoarele probleme:

1. Sterilizarea directă a biosenzorilor este imposibilă;
2. Pentru calibrarea biosenzorilor sunt necesare măsuratori discrete;
3. În majoritatea cazurilor, concentrațiile compușilor depășesc domeniile de răspuns liniar ale biosenzorilor;
4. Stabilitatea biosenzorilor este afectată de stresul mecanic și termic;
5. Sensibilitatea și reproductibilitatea: parametrii ce asigură buna funcționare a biosenzorilor, gradul de noninvazivitate.

Merită în acest context să sumarizăm o scurtă retrospectivă a dezvoltării istorice a biosenzorilor pentru a realiza conexiunea dintre fenomene fundamentale și tendințele actuale.

### **2.3.3 Scurt istoric**

„1986: *ROYAL SOCIETY, Londra*, s-au definit biosenzorii ca fiind dispozitive bazate pe cuplajul spațial direct al unui compus biologic activ imobilizat cu un traductor și un amplificator electronic”.

„as a compact analytical device incorporating a biological or biologically-derived sensing element either integrated within or intimately associated with a physicochemical transducer. The usual aim of a biosensor is to produce either discrete or continuous digital electronic signals which are proportional to a single analyte or a related group of analytes”.[2]

Succesul biosenzorului pentru determinarea de glucoză, a constituit placa turnantă a exploziei biosenzorilor. El s-a dezvoltat datorită cerințelor extraordinare a bolnavilor de diabet și a abilității biosenzorilor de a oferi o metodă convenabilă, igienică și compactă de monitorizare personală. Biosenzorii oferă un mare potențial de a detecta o largă varietate de analiți în medicina curentă specifică laboratoarelor clinice sau tratamentelor în regim ambulator; în industria alimentară, în monitorizarea factorilor poluanți din mediu.

### **1950 -1960 Electroful Clark**

O problemă deosebit de importantă în chimia analitică o constituia selecția și în particular, cea făcută la concentrații scăzute și în prezența substanțelor care interferează.



Determinarea sensibilă și selectivă a unui mare număr de compuși era și este în continuare foarte utilă pentru cercetările științifice, ca și pentru unele ramuri industriale (chimică și alimentară). În domeniul sănătății devenea indispensabilă găsirea de metode pentru diagnosticarea unor boli iar senzorii cu o fină selectivitate și ușor de manevrat devenise o problemă cheie în perfecționarea analizelor de laborator. În această perioadă o serie de senzori pe structuri solide erau folosiți la determinarea parametrilor fizici cum ar fi temperatura, presiunea, energia sunetului dar analizele calitative și cantitative făcute asupra compoziției chimice rămâneau dificile. Cele mai cunoscute în această etapă erau pH-metrele care sunt puțin aplicabile măsurătorilor unor substanțe fiziologice importante cum ar fi: ureea, colesterolul. Ele au devenit utile în primele investigații în cazul macromoleculor cum sunt: enzimele, anticorpii, sau microorganismele. Ființele vii însă sunt capabile să se adapteze la schimbările propriului lor metabolism și la mediul inconjurator cu ajutorul așa numiților receptori care sunt alcătuite din structuri proteice complexe și sunt, în mare parte, legate de membranele celulare. Ele posedă o mare afinitate pentru factorii specifici, cum ar fi: hormoni, enzime sau anticorpii. Legătura dintre acești factori determină activarea unor "cascade" de enzime, care provoacă schimbări în proteina receptoare și o amplificare a semnalului. Aceste considerente erau oarecum bine statuate în această perioadă dar pînă în 1956 nu s-a realizat nici un progres semnificativ de a găsi o metodă de măsurare.

În 1956, pentru a simplifica măsurătorile de glucoză s-a adoptat principiul hîrtiei folosită la determinările de pH, [3]. Impregnînd o hîrtie de filtru cu enzime de glucoză, Free a obținut primul "test-fișie de enzime", care poate fi privit ca un predecesor al biosenzorilor optoelectronici.

În această perioadă se ridica necesitatea de determinare a conținutului de oxigen din sînge, respectiv a glucozei. Leland C. Clark Jr., a inventat un electrod destinat a fi folosit pentru măsurarea oxigenului dizolvat în sîngele bolnavilor operați. Acesta este format dintr-un electrod de platină și un electrod cu o membrană de plastic permeabilă la gaze. Polaritatea electrodului a fost astfel stabilită încît intensitatea curentului prin circuit să depindă de viteza de difuzie a oxigenului prin membrană, viteză ce este direct proporțională cu concentrația externă a oxigenului. O dată cu electrodul Clark, considerat primul biosenzor, începe și clarificarea scopului și definiției conceptului de biosenzor ce continuă a fost modificată și reactualizată. Profesorul Leland C Clark Jr este considerat părintele domeniului biosenzori. În 1956, Clark publică articolul său despre electrodul de oxigen (discutat pe larg în [3]). Clark prin acumularea unei bogate experiențe lansează în 1962 prin conferința susținută la Academia de Științe din New York o viziune generală asupra conceptului de biosenzor și direcțiile de dezvoltare: *"to make electrochemical sensors (pH, polarographic, potentiometric or conductometric) more intelligent" by adding "enzyme transducers as membrane enclosed sandwiches"*. [4]

## 1962 Electrodul enzimatic

Clark extinde folosirea acestui "electrod de măsurare a oxigenului" la determinarea nivelului de glucoză în sînge. El a „îmbrăcat” senzorul pentru oxigen cu un strat subțire

de gel ce contine un biocatalizator, **enzima** glucozoxidaza, urmat de o membrană semi-permeabilă de dializă ce permite glucozei să difuzeze în senzor, dar oprește enzima să difuzeze. Cu cât intră mai multă glucoză, cu atât mai mult oxigen este consumat de enzimă. Deci, o cantitate mică de oxigen existentă se traduce prin existența unui nivel ridicat de glucoză. Clark și Lyons [4] introduc termenul de electrod enzimatic, adeseori greșit atribuit de mulți autori de recenzii ca fiind introdus de Updike și Hicks [5] care au avut meritul de a descrie experimental detaliile necesare de a construi un electrod cu enzimă pentru glucoză. Prima descriere a unui biosenzor a fost realizată de Clark și Lyons în anul 1962, unde era prezentat de fapt un electrod de platină cu enzima oxidoreductaza, într-o construcție de sandwich. Anodul de platină polarizat la +0,6V, răspunde la peroxidul produs de enzimă în reacție cu substratul. Acest tip de biosenzor deschide calea pentru măsurarea glucozei din sânge.

### **1969 Senzori enzimatici, traductori potențiometrici**

Guilbault și Montalvo [6] descriu un electrod-enzimă potențiometric. Autorii descriu un senzor de uree folosind ureaza imobilizată pe un electrod-membrană, selectivă la amoniac. G.Guilbault a în-ventat un sistem de măsură pentru uree în fluidele corpului uman. Dispozitivul lui folosește enzima ureaza ce transformă urea în bioxid de carbon și amoniac. Electrocul sesizează schimbările concentrației ionilor de amoniu. Acest dispozitiv a constituit o îmbunătățire pentru că se bazează pe o detecție potențiometrică (senzor potențiometric). În timp ce senzorii de tip Clark măsoară trecerea curentului prin electrod (senzor amperometric), senzorul potențiometric măsoară tensiunea cerută pentru menținerea curentului la zero. Electrocul nu consumă nici un fel de reactanți de aceea este mai puțin susceptibil la erori cauzate de schimbările survenite în mediul extern. În plus, sistemul potențiometric are o curbă logaritmică de răspuns astfel încât poate urmări o concentrație de peste 100 de ori mai mare în raport cu alte tipuri. Ulterior au fost folosite în construcția de biosenzori peste 100 de enzime. Cercetătorii în domeniu au realizat că nu numai enzimele singulare se pot folosi, ci și **țesuturi** ce reacționează la aminoacizi și la alte bio-molecule. De exemplu, folosirea pulpei de banană pentru măsurarea dopaminei, miezul de porumb pentru piruvat, frunza de castravete pentru cisteină, sfecla de zahăr pentru tirozina, ficatul de iepure pentru guanina și pudra de muschi de iepure pentru monofosfat de adenzina. Rechnitz [7, 8] a mers și mai departe în folosirea unor părți din sisteme biologice; unul din senzorii săi conține o antenulă, un mic organ de simț, de la un crab albastru, supus disecției pentru a folosi fibrele nervoase conectate la un electrod. Acest dispozitiv poate măsura concentrația unor droguri, precum și a toxinelor din mediu.

### **1970 Miniaturizarea electrozilor.**

La începutul anilor “70” au fost perfecționați primii senzori enzimatici, cu indicații calorimetrice iar ulterior s-au folosit indicatori optici [2]. Noile descoperiri din biotehnologie au perfecționat biosenzorii. În 1970, s-au construit multielectrozi miniaturizați pe un cip de siliciu [2, 8] ce poate realiza măsurători pe țesuturi neuronale. Toate

cercetările în acest sens au condus la adoptarea unei tehnici generale de combinare a componentelor chimice cu circuitele integrate într-un singur sistem. Unii cercetători au miniaturizat biosenzorii electronici, alții au dezvoltat un întreg sistem bazat pe sensibilitate optică - în 1969, G.Vurek și R.Bowman [9] au demonstrat primii senzori pe fibre optice folosiți la analize clinice. 1970- Yellow Springs Instrument Co. (Yellow Springs, OH) comercializează primul senzor pentru monitorizarea glucozei

**1974 Traductorii termici.** Termometrele în variate forme, termorezistențele și termistorii au fost propuși ca biosenzori prin imobilizarea de enzime pe suportul traductor și măsurarea efectului termic datorită efectelor termice induse de reacția enzimatică.

Biosenzorii cu traductori termici propuși în 1974 au devenit termeni uzuali astăzi ca *sonde termice enzimatiche* [10] sau termistori enzimatici [11].

### **1975 Bioanalizoare de glucoză, senzori microbieni, optici**

În anul 1975, DIVIES [12] a folosit o bacterie într-un senzor de alcool în timp ce GUILBAULT a construit în 1976, un NADH-senzor folosind o mitocondrie. Aplicarea modelelor enzimatiche de mare stabilitate în biosenzori a oferit o nouă alternativă enzimelor. În 1975 JANATA (citată în [7]) a realizat un "imunoelectrod". Ideile lui Clark devin realitate în 1975 prin lansarea de succes de compania Yellow Springs Instrument Company (Ohio) a analizorului de glucoză pe principiul detecției amperometrice a peroxidului de hidrogen. Este perioada lansării, în lume, a *primului analizor de laborator*.

**Biosenzori microbieni.** În 1975 biosenzorii iau o nouă rută evoluționară când Divies [12] sugerează că bacteriile pot fi utilizate ca element biologic într-un *electrod microbial* pentru măsurarea concentrației de alcool. Articolul marchează începuturile eforturilor de cercetare din Japonia și ulterior în toate țările a aplicațiilor biosenzorilor în protecția mediului și biotehnologie.

**Optode.** Lubbers și Opitz [13] introduc termenul de *optodă* în 1975 pentru a descrie senzorul cu fibroptică ce are imobilizat un indicator pentru măsurarea bioxidului de carbon și a oxigenului. Autorii extind conceptul dezvoltând un biosenzor optic pentru alcool prin imobilizarea alcooloxidazei la o terminație a senzorului cu fibră optică pentru oxigen [14]. Optodele comerciale au în prezent performanțe excelente pentru măsurarea in vivo de pH, pCO<sub>2</sub> și pO<sub>2</sub>, însă optodele enzimatiche încă sunt sub lupa cercetării fără a primi o largă audiență comercială.

### **1976 Implementări noninvazive, mediatorii pentru transferul de electroni**

În 1976, Clemens și colab.[15] încorporează un biosenzor electrochimic de glucoză la un pancreas artificial marcând implementarea comercială de către compania Miles (Elkhart) a Biostatorului. Biostatorul nu a fost comercializat pe scară largă el fiind înlocuit de un analizor de glucoză cu cateter continuu - VIA Medical (San Diego). În același an La Roche (Elveția) introduce Lactate Analyser LA 640 în care mediatorul solubil hexacianoferatul este utilizat pentru transferul mediat de electroni de la lactat dehidrogenaza spre electrod. Cu toate că nu a căpătat un uz comercial s-a deschis generația biosenzorilor

cu mediatori în transferul de electroni cu aplicații în analizorii de lactate pentru domeniul sportiv și aplicații chimice. Un important avans pentru aplicații in vivo a senzorului de glucoză a fost raportat de Shichiri și colab.[16] ce descrie un electrod enzimă tip ac pentru implantări subcutanate, 1982, un succes științific însă fără o valorificare comercială.

### **1980- 2000-2007**

#### **Imunosenzori, efectul SPR.**

Ideia construirii de imunosenzori cu fixare directă de anticorpi pe un traductor piezoelectric sau potențiomtric a fost explorată din anii 70. Însă pavarea drumului spre un succes comercial este realizată de Liedberg *et al.* [17] descriind aplicarea fenomenului de rezonanță a plasmonilor (SPR) pentru a monitoriza afinitatea reacțiilor în timp real.

1987, MediSense (Cambridge, MA) introduce primul biosenzor pentru monitorizarea glucozei în regim ambulatoriu. BIAcore ( Pharmacia, Suedia), lansată în 1990 utilizează tehnologia SPR

#### **Ferocinii ca mediatori în electrozii enzimă, aplicații în ambulatoriu, microminiaturizarea**

În 1984, una din cele mai citate publicații [18] anunță un electrod enzimă cu utilizarea ferocinilor și a derivaților săi ca un mediator de imobilizare pentru oxidoreductază. Acest principiu stă la baza electrozilor enzimă lansat de MediSense (Cambridge, USA) în 1987 ca un instrument de măsură în formă de creion pentru monitorizarea glucozei din sânge a pacienților în regim ambulatoriu. Întreaga sa electronică a fost proiectată pe modelul de credit card în formatul unui “mouse-computer”. MediSense a atins o creștere exponențială în vânzări (US\$175 milioane) fiind ulterior adsorbită de Abbott. Companiile Boehringer, Mannheim și Bayer au în prezent biosenzori cu mediatori deținând 85% din totalul pieței internaționale. Interesant că cele trei companii dezvoltă tehnologii pe baza fotometriei de reflexie convenționale pentru diagnosticul ambulatoriu. Jurnalele academice conțin descrieri de largi varietăți de dispozitive exploatând enzime, acizi nucleici, celule receptor, anticorpi, celule în combinație cu traductori electrochimici, optici, piezoelectrice și termici [19]. În cadrul oricărei permutări în tehnicile traductorilor alte mirade de posibilități apar în concepte de proiectare ale senzorilor rezolvând diverse probleme din medicină [20], alimente și băuturi [21], procese industriale [22], monitorizarea mediului [23], apărare și securitate (detecția drogurilor, explozivilor). Biosenzorii au început să fie folosiți cu succes și în alte domenii decât cele medicale de exemplu măsurarea necesarului de oxigen biochimic, ce reprezintă un indiciu al prezenței materiilor organice din apa uzată.

Biosenzorul bazat pe drojdie, realizează o citire a rezultatelor în 30 minute față de 5 zile pentru a obține rezultatele prin metode conventionale. Biosenzorii sunt folosiți și pentru a determina calitatea hranei și prospețimea ei. Cu mare succes sunt folosiți în procesele industriale, pentru a determina compoziția chimică a materialelor. Aceste măsurători sunt importante în special în biotehnologie unde în mod curent nu se pot monitoriza culturile de microorganisme procese de fermentație ce produc proteine active și alte pro-

duse ca interferon sau insulina. O largă gamă de aplicații sunt cuprinse într-o serie de monografii ce au condus la un important impuls al dezvoltării biosenzorilor [24, 25, 26, 27 -34].

### 2.3.4 Referințe

- 1 Theavenot Daniel R., Toth Klara, Durst Richard A., Wilson George S, *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification* Pure Appl. Chem., Vol. 71, 12, pp. 2333-2348, (1999)
2. Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford. 770p. (1987)
- 3 Clark, L.C. *Jnr. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **2**, 41-48 (1956).
- 4 Clark L.C. and Lyons C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102, 29-45 (1962)
- 5 Updike, S.J. and Hicks, J.P. *Nature* 214, 986-988 (1967).
- 6 Guilbault, G.G. and Montalvo, J. *JACS* 91, 2164-2569 (1969).
- 7 Ho MYK, and Rechnitz GA, "An Introduction to Biosensors," in *Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*, Nakamura RM, Kasahara Y, and Rechnitz GA (eds), Washington, DC, American Society for Microbiology, pp 275-290, (1992).
- 8 Rechnitz GA, *Chem Eng News*, 5:2436, (1988)
- 9 Vurek G. si Bowman R, *Scientific American*, August pag 48 (1991).
- 10 Cooney, C.L., Weaver, J.C., Tannebaum, S.R., Faller, S.R., Shields, D.V. and Jahnke, M. In: "Enzyme Engineering" (Eds. E.K. Pye and L.B. Wingard Jr.) 2, 411-417. Plenum, New York. (1974).
- 11 Mosbach, K. and Danielsson, B. *Biochim. Biophys. Acta.* **364**, 140-145 (1974).
- 12 Divies, C. *Annals of Microbiology* **126A**, 175-186 (1975).
- 13 Lubbers, D.W. and Opitz, N. *Z. Naturforsch. C: Biosci.* **30c**, 532-533 (1975).
- 14 Voelkl, K.P., Opitz, N. and Lubbers, D.W. *Fres. Z. Anal. Chem.* **301**, 162-163 (1980).
- 15 Clemens, A.H., Chang, P.H. and Myers, R.W. *Proc. Journes Ann. de Diabetologie, Paris* (1976).
- 16 Shichiri, M., Kawamori, R., Yamaski, R., Hakai, Y. and Abe, H. *Lancet*, 1129-1131 (1982).
- 17 Liedberg, B., Nylander, C. and Lundstrm, I. *Sensors and Actuators* **4**, 299-304 (1983).
- 18 Cass, A.E.G., Francis, D.G., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L. and Turner, A.P.F. *Anal. Chem.* **56**, 667-671 (1984).
- 19 Turner, A.P.F. "Advances in Biosensors", I; II; Suppl. I; III. JAI Press, London, UK, 1991; 1992; 1993; (1995).
- 20 Alcock, S.J. and Turner, A.P.F. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, June/July, 319 (1994).
- 21 Kress-Rogers, E. "Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food and the Environment", CRC Press, Boca Raton, USA, (1996).

- 
- 22 White, S.F. and Turner, A.P.F. In: "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation"(Eds. M C Flickinger and S W Drew). Wiley, New York, USA, (1997)
  - 23 Dennison, M.J. and Turner, A.P.F. *Biotechnol. Adv.*, 13, 1 (1999)
  - 24 Kress-Rogers E, *Handbook of Biosensors and Electronic Noses*, Boca Raton, USA: CRC Press (1997)
  - 25 Scheller F, Schmid R D, *Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications*, GBF-Monograph, vol 17, Germany, VCH, (1992)
  - 26 Schmid R D, Scheller F, *Biosensors Applications in Medicine, Environmental protection and Process Control*, GBF-Monograph, vol 13, Germany, VCH, (1989)
  - 27 Wagner G, Guilbault G G, *Food Biosensors Analysis*, New York, USA, Marcel Dekker Inc, (1994)
  27. Cooper Jon M., Cass A. E. G., Cass Tony (Eds), *Biosensors*, Oxford Univ Press, pp268 (2004)
  28. Marc Lambrechts & Willy Sansen,(Eds) *Biosensors*, Taylor&Francis, pp360, (2006)
  29. Stamatin Ioan Berlic C. Vaseashta A., *Thin Solid Films* 495,1-2 pp 312-315, (2006)
  - 30 Vaseashta A, Gallios G, Miroslava Vaclavikova, Brumfield James, Vaseashta Sherri, Ornprapa Pummakarnchana, Stamatin Ioan, *Nanostructures in Environmental Pollution Detection, Monitoring, And Remediation*, International Symposium on Nanotechnology in Environmental Protection and Pollution, ISNEPP2006, June 18 - 21, 2006 , The Hong Kong University of Science & Technology International Conference Center, China (<http://www.isnepp.org/>)
  31. Vaseashta A., Irudayaraj J., Vaseashta S., Stamatin I., Erdem A. Approach To An Interdisciplinary Bionanotechnology Education Program: International Network Perspective, MRS-spring meeting 2006, symp KK, 0931-KK05-04, (2006)
  32. Vaseashta A., Erdem A., Stamatin I., *Nanobiomaterials For Controlled Release Of Drugs & Vaccine Delivery*, MRS-spring meeting, symp S Smart Nanotextiles, MRS Proceedings Volume 920, 0920-S06-06 (2006)
  33. Ciucu Anton, *Biosensors For Environmental Monitoring*. Ed Niculescu, Bucuresti, pg. 352, (2000)
  34. Ciucu Anton, *Aplicațiile Analitice ale Biosenzorilor în Controlul Poluării Mediului*, Editura Ars Docendi, București, pg 175, (2000)

### 3. Stadiul dezvoltării actuale în domeniul biosenzorilor

<i>Componente și terminologie</i>	<i>Lanțul de comandă</i>
<p><u>Analit(A)</u>: Elementul necunoscut ce trebuie determinat</p> <p><u>Receptor(R)</u>: Molecula de biorecunoaștere, elementul biologic/ biochimic care interacționează cu analitul printr-o reacție specifică.</p> <p><u>Traductor</u>: Elementul care detectează semnalul de la interacția analit-receptor</p> <p><u>Procesare de semnale</u>: Preluarea de date credibile, eliminarea zgomotului, parametrizare.</p>	<p><u>Recunoașterea specifică</u> a analitului</p> <p><u>Transducția</u>- transformarea efectului fizico-chimic a interacției A-R într-un semnal măsurabil</p> <p><u>Procesarea semnalului și amplificarea</u></p>
<p><i><u>Trăsătura unică</u> a biosenzorului este aceea că încorporează un element biologic în proximitate sau este integrat cu traductorul de semnal pentru a da un sistem de investigare specific pentru un analit țintă fără a fi necesar reactivi suplimentari</i></p>	





### 3.1 Sisteme, arii de biosenzori, caracteristici de răspuns

Cinci arii cheie de dezvoltare a științei și tehnologiei sunt identificate ce au contribuit la facilitarea implementării pe scară largă a biosenzorilor: sensibilitatea, selectivitatea, stabilitatea, sisteme integrate, paterningul (modelarea și multiplicarea ca arii de senzori cu funcțiuni și aplicații multiple). Vom descrie acestea în ordine inversă luând în considerare stadiul actual și metodele moderne de analiză a semnalelor rezultate din interacția analit-receptor conform cu figurile 2.1, 2.2, 2.3.

#### 3.1.1 Sisteme integrate

Succesele notabile atinse cu senzorii individuali prin soluții pragmatice au implicat dezvoltarea de sisteme care să integreze o gamă largă și variată de senzori cu performanțe optimizate și suportate de electronică și software sofisticate. În procesele de monitorizare sistemele integrate au înglobat și multe elemente din fluidică și tehnologia separărilor/fracționărilor. Unul din sistemele integrate cuprinzând modul rotațional aseptice de prelevare probe, sistem de injecție de fluide robotizat și electrozi reutilizabil formați prin metoda ink-jet printing a fost descris în [1]. Sistemul conține electrod enzimatic cu GOX imobilizată în gel iar detecția de apă oxigenată se realizează pe un electrod de carbon rodinizat (acoperire cu Rh). Deși electrodul enzimă are bune caracteristici de stabilitate și eficiență, problema monitorizării și prelevării automate de probe într-un sistem integrat cere optimizarea de mulți parametri datorită interferențelor reciproce. Există o cerință crescândă pe domenii specifice (mediu și analize medicale) de sisteme integrate ultraperformante care să funcționeze în condiții *in vivo* cum ar fi cele de dializă iar mai recent să utilizeze biointerfețe, tehnici evanescente, microscopie de forțe atomice pentru a senza în adâncimea fenomenelor biologice (de exemplu identificarea și înțelegerea interacției proteinelor) [2]. Exploatarea *in vivo* a sistemelor de detecție atât pentru glucoză și lactat a fost confirmat prin eficacitatea utilizării de copolimeri fosfolipidici și îmbunătățirea hemocompatibilității [3]. Imunosenzorii oferă un alt exemplu pentru dezvoltarea de sisteme integrate unde sunt înglobate microseparările, metodele cromatografice, cuplaje electrochimice cu detectorii optici care în final conduc la un sistem miniaturizat. Sunt câ-teva din exemple prin care nivelul de integrare și miniaturizare devine din ce mai accentuat. În secțiunile următoare se va prezenta unele dintre exemple de tipul ADN-nanotub, sau biocipuri-biointerfețe care arată direcțiile de evoluție ale domeniului.

#### 3.1.2 Șabloane

Succesul senzorilor analitici individuali a continuat după cum s-a prezentat în secțiunea anterioară cu sistemele integrate astăzi larg utilizate în laboratoarele clinice medicale. Necesitatea integrării și diversificării parametrilor investigați impune crearea de arii de senzori într-o singură unitate de măsură. Astfel a apărut necesitatea realizării de modele de senzori dispuse pe arii și geometrii sofisticate utilizând tehnologii avansate de fotolitografie, autoasamblare, ink-jet printing denumite tipare sau șabloane (templates) ce îndeplinesc o serie de funcții predeterminate.

Metoda de asamblare de arii de senzori cu funcțiuni diversificate dar specifice pentru un set cât mai larg de analiți se numește șablonare sau simplu astăzi prin termenul asimilat de patterning. Tipare sau șabloane de senzori oferă meniuri relevante pentru locații și situații specifice. Un exemplu în acest sens îl constituie situațiile critice din medicina ambulatorie. Clinicianul are la dispoziție instrumente portabile de la care poate obține informații asupra concentrațiilor a șase analiți cheie din probele de sânge: iar în secțiile medicale / spitale instrumentele pot măsura pînă la 4 parametri. Aceste instrumente sunt configurate pentru glucoză, lactat, uree, creatinină. Multiplicarea numărului de analiți pentru investigare necesită instrumente cu senzori cu un mare grad de miniaturizare, integrare pînă la arii nanometrice. Aceste solicitări vin acum nu numai din domeniul medical, industria farmaceutică solicită intens senzori de evaluare medicamente produse în regim de producție de serie cu înaltă productivitate și care necesită analiza fiecărui produs pentru anumite caracteristici bine precizate cum ar fi dozarea relativ la funcțiunea și rolul lor în organism. Ariile de nanosenzori sunt preconizate a fi larg utilizate în condiții de ambulatoriu și medicina de urgență unde trebuiesc identificați parametri fiziologici/biochimici și stabilită medicația de urgență. În prezent sunt dezvoltate tipuri de arii de senzori optici utilizînd 12 canale de interferometre de tip Mach-Zhender [4] construite pe  $1\text{cm}^2$  de siliciu cu 244 electrozi adresabili individual.

Tehnologia avansată ink-jet a dezvoltat metode de a analiza fracții de nanolitri pe o suprafață de senzori tridimensională la o viteză de  $6\text{m/sec}$  [5]. Este de așteptat ca în viitor să se producă arii de 1 milion senzori/ $\text{cm}^2$  utilizînd fotolitografie, imprimarea prin contact sau tehnici de autoasamblare, adsorbție/desorbție sub fascicul laser ce va permite să “scriem” proteine pe suprafața de analizat cu foarte mare precizie. Tehnici laser, MAPLE (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) sau DW (direct writing) abordate pentru imobilizarea materialelor biologice pe substraturi sunt încă în stadiul de laborator dar au mari perspective de utilizare ca metode de imprimare moleculară.

### **3.1.3 Sensibilitate**

Fie că sunt senzori individuali, sisteme integrate sau arii de senzori toți sunt caracterizați prin parametri unici iar unul din aceștia este sensibilitatea și limita de detecție pentru o gamă de analiți. Detecția de urme a diferiților analiți (indicatori, aditivi, contaminanți) cu o suficientă sensivitate și siguranță sunt criteriile de bază a unui biosenzor pentru a fi utilizat. Desigur astăzi limita de detecție în laborator este împinsă pînă la un atom atunci cînd este folosită microscopia de forțe atomice. Însă în cazul biosenzorilor aceasta este pe departe decît un deziderat. De exemplu electrozii enzimatici, larg studiați și continuu perfecționați utilizează încă paleative cum ar fi concentrarea analitului de interes ceea ce conduce la dificultăți majore de proiectare și miniaturizare [6]. S-au raportat pe acest principiu microbiosenzori pentru vapori de fenol unde fenoloxidaza s-a imobilizat pe gel de glicerol cu o arie de electrozi interdigitizați [7].

Vaporii de fenol sunt direct partiționați în gel și oxidați la chinonă. Amplificarea semnalului pentru a obține o sensibilitate rezonabilă s-a îmbunătățit prin amplificare redox a cuplului chinonă/catechol rezultînd o limită de detecție de 30 ppb fenol. Acest

principiu este fezabil a fi extins și la alți compuși carbonici pînă la limite de părți per trilion.

Limite de detecție ultrajoase pot fi atinse cu senzorii de afinitate cuplat cu detecția electrochimică [8] pentru a obține dispozitive senzoriale performante.

Structurile ADN au fost studiate ca posibili receptori. Structuri sandwich de dispersii de cristal lichid și complecși ADN-polication au fost studiate cu relativ succes pentru identificarea a diferiți analiți [9]. Policationul cu rol de a menține integritatea structurală a ADN-ului iar complecșii formați de ADN-protamine permit detectarea hidrolitică a enzimei tripsină la limita de detecție de  $10^{-14}$  M. Eliminarea policationului conduce la creșterea distanței dintre cele două lanțuri ADN rezultînd apariția unei benzi intense în spectrul de dicroism circular ca urmare a modificării texturii.

### **3.1.4 Stabilitate**

Practic este cel mai mare dezavantaj al complexelor biologice-instabilitatea lor inerentă. S-au abordat diferite strategii de a îmbunătăți longevitatea și a prezerva structura receptorilor biologici. Imobilizarea în matrici prin tehnica sol-gel în optode pentru senzorii de glucoză este una din strategii. În acest caz se utilizează doi indicatori de fluorescență: clorura hexahidratată de (2,2'-bipiridil) rutenium(II) și 1-hdroxipirene-3,6,8 acid trisulfonic. Pe lîngă proprietăți optice bune ale gelului s-a îmbunătățit și stabilitatea enzimei GOX [10]. Alte exemple cu succese limitate este cazul monooxigenazei utilizată în detecția hidrocarbonilor; detecția halogenurilor organice cu metaloporfirine; tetraclorura de carbon, haloalchene (percloretilena) și insecticide (DDT) [11]

### **3.1.5 Selectivitate**

Îmbunătățirea selectivității unui biosenzor poate fi abordată pe două nivele: interfațare directă traductor-receptor biologic pentru reducerea interferențelor (figurile 2.1-2.4) și noi receptori cu afinitate îmbunătățită sau cu noi capacități de afinitate. De notat că selectivitatea este un parametru cheie care impune performanțele unui senzor. Sunt cîteva strategii de îmbunătățire a acestui parametru.

Utilizarea mediatorilor pentru îmbunătățirea performanțelor unui biosenzor amperometric a devenit o strategie comună. În [12] se descrie utilizarea pirolochinonei ca mediator într-un electrod enzimă cu glucozoxidază pentru măsurarea glucozei din băuturi.

Alternativ detecția electrocatalitică a produșilor de reacție rezultați din reacțiile enzimatică poate fi îmbunătățită prin electrozi modificali chimic ca de exemplu electrozi rodinizați [13] sau electrozi de carbon modificali cu hexacianoferrat [14]. De exemplu folosirea albastrului de prusia pentru modificarea suprafeței electrodului la detecția amperometrică a apei oxigenate la ambele potențiale de oxidare și reducere pentru electrodul enzimatic în detecția lactatului [15] și a glucozei [14].

O soluție mult mai elegantă este de a căuta centrul redox a enzimei via un fir molecular pentru a se realiza transferul de electroni spre electrod. În acest sens s-a publicat mult despre enzime legate prin fire moleculare dar în general preocupările s-au axat pe mediatori imobilizați pe diferite lanțuri polimerice. Firele moleculare sunt privite ca intermediari în transferul de electroni pe distanțe lungi fiind alcătuite din grupuri de două

piridine legate de tiofene cu lungimi diferite (tienoviolagen). Firele de acest tip pot fi folosite în conjuncție cu tehnici de autoasamblare pentru a produce un electrod izolat care transferă electroni pe căi moleculare predeterminate [16]. Aceasta ar conduce la electrozi enzimatici liberi de interferențe electrochimice. Modelarea și proiectarea asistată de calculator ne permite de a modela reacțiile cu transfer de electroni, legarea receptorilor și interacțiile acestora cu o mare acuratețe. Aceasta îmbunătățește înțelegerea noastră a interfeței receptor/traductor permițându-ne astfel să dezvoltăm noi tipuri de receptori cu selectivitate mare.

Pentru a obține liganzi îmbunătățiți pentru utilizări în optosenzori cum ar fi glicohemoglobina (HbA1c), o nouă peptidă sintetică, aceasta a fost construită pe bază de librărie combinatorială chemometrică formată din 1 milion L-amino acid hexapeptid pornind de la 10 aminoacizi [17]. Librăria de hexapeptide a fost selectată și analizată în raport cu HbA1c, HbA1b, HbAF, HbA0, și găsiți liganzii secvențați. Liganzii individuali sau arii de liganzi în conjuncție cu tehnica de recunoaștere a formelor sunt domenii ce vor contribui la creșterea selectivității și stabilității.

### **3.1.6 Parametrii de caracterizare a semnalelor biosenzorilor**

Paragrafele precedente au introdus calitativ parametrii de care depinde răspunsul senzorilor în particular a biosenzorilor pentru a atinge performanțele dorite. Interacția analit-receptor este preluată de traductor și transformată într-un semnal fizic. Figura 3.1 prezintă tipurile de semnale ce pot fi preluate de la suprafața unui biosenzor ca răspuns al interacției A-R conform cu figurile 2.1-2.6. Semnalul fizic preluat de traductor este transmis spre lanțul electronic de măsură. Se observă din figura 3.1 că există o varietate foarte largă de mărimi ce pot fi colectați de la traductorii biosenzorilor și transformate în semnale fizice. Procesarea semnalelor în general este adaptată din tehnicile standard acumulate din tehnologia siliciului. Pentru măsurarea parametrilor chimici și fizici ( masă, concentrație, temperatură, indice refracție, câmp electromagnetic, curenți, potențiale etc) ca rezultat al transferului interacției A-R este necesar un traductor specific. Acesta este interfața transducerii procesele fizice, chimice și biologice care le transformă în semnale spre procesare electronică, optică, stocare, comunicații, integrare în sisteme web sau de supra-veghere.

Orice interacție A-R implică un răspuns iar pentru fiecare set de valori rezultă o curbă de răspuns specifică. Curba de răspuns este un răspuns calibrat a unui senzor ca funcție de măsurandul respectiv aplicat la intrare (ceea ce rezultă din interacția A-R).

Mărimea măsurată poate fi de orice natură dar pentru cei mai mulți biosenzori unde interfața este electrochimică sau electrooptică vom lua în considerare unul din parametrii: rezistența electrică  $R$  sau inversul ei conductanța ( $G=1/R$ ), frecvența ( $f$ )-mult utilizată în fenomenele de rezonanță; în cazul optosenzorilor, absorbanta, deplasarea frecvenței, randamentul cuantic, etc.

Pentru fiecare biosenzor vor fi analizați acești parametrii în paragrafele destinate lor.

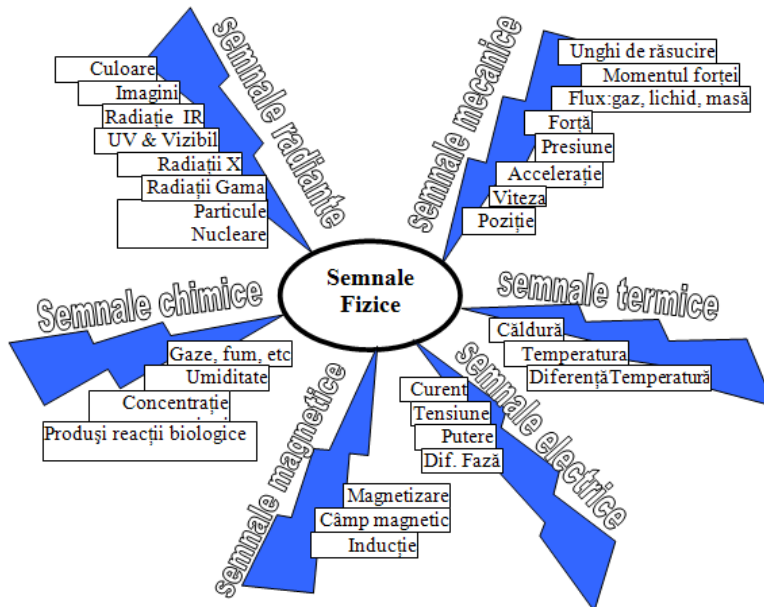


Figura 3.1 – Tipuri de mărimi ce pot fi transformate de către traductori în semnale fizice măsurabile

Este recomandat conform normelor dezvoltate în micro și nanoelectronică să utilizăm următoarele notații pentru răspunsul la ieșire [18]:

- $G$  (conductanță);
- $G/G_0$  (conductanță relativă);
- $(G - G_0)$  (conductanță, variația absolută);
- $(G - G_0)/G_0$  (conductanță, variația relativă).

În cazul în care semnalul la ieșire este frecvența, reprezentarea semnalului la ieșire este:

- $f$  (frecvență);
- $f/f_0$  (frecvență relativă);
- $(f - f_0)$  (variația absolută a frecvență);
- $(f - f_0)/f_0$  (frecvență, variația relativă).

Pentru comunicații și integrarea sistemelor senzoriale spre telemedicină, securitatea și controlul de la distanță a modificărilor mediului sau controlul degradării mediului, în lanțul de măsură trebuie introduse sensibilitățile blocurilor electronice sau a altor mărimi, figura 3.2

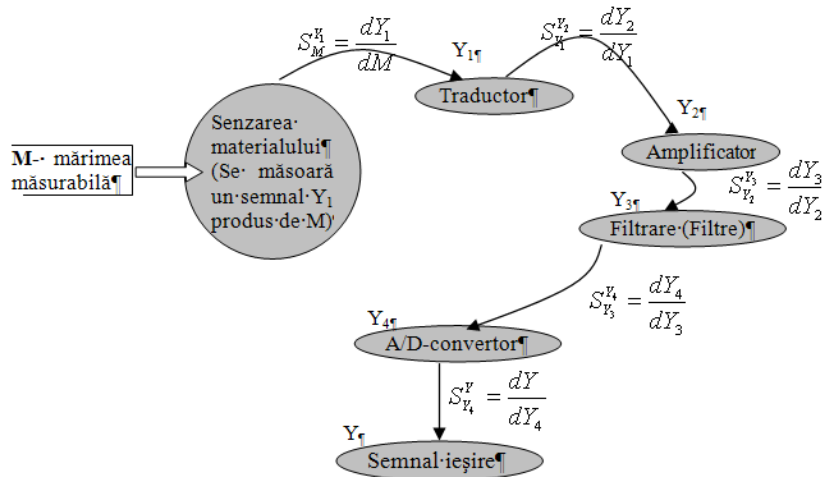


Figura 3.2 - Schema unui senzor complex. M- mărimea rezultată din interacția (măsurandul) A-R,  $Y_1$ - semnalul electric obținut la traductor,  $Y_i$ - semnalele rezultate din lanțul de măsură. S-sensibilitățile pentru fiecare verigă din lanțul de măsură

Cu definițiile din figura 3.1 și 3.2 sensibilitatea, introdusă calitativ în paragraful 3.1.3, capătă semnificații măsurabile. Sensibilitatea, S, este definită ca derivata răspunsului ( ce este o funcție de punctul și momentul de măsură) în raport cu măsurandul M.

Pentru cazul conductanței G avem patru cazuri de definiție a sensibilității:

$$\begin{aligned}
 S &= \frac{dG}{dM}; \\
 S &= \frac{d(G/G_0)}{dM}; \\
 S &= \frac{d(G-G_0)}{dM};
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

Cazul ideal pentru care răspunsul senzorului este liniar expresia sensibilității se simplifică, relațiile 3.1 luând forme ușor prelucrabile și adaptabile la o largă serie de convertoare analog digitali (ADC). În tabelul 3.1 sunt prezentate expresii des utilizate în evaluarea biosenzorilor în condiții de offset nul. Pentru alți parametri măsurabili de un biosenzor cum ar fi frecvența sau absorbanta expresiile din tabela 3.1 se modifică doar prin înlocuirea mărimii măsurate de traductor.

Tabela 3.1- Expresii ale sensibilității pentru biosenzori cu răspuns liniar în conductanță electrică

Răspuns liniar cu offset nul	Răspuns liniar pe porțiuni a curbei de răspuns
$S = \frac{G}{M};$	$S = \frac{\Delta G}{\Delta M};$
$S = \frac{G - G_0}{M};$	$S = \frac{\Delta(G - G_0)}{\Delta M};$
$S = \frac{(G - G_0)/G_0}{M};$	$S = \frac{\Delta[(G - G_0)/G_0]}{\Delta M};$

Cu referire la figura 3.2 se observă că introducerea în lanțul de măsură a o serie de componente electronice acestea la rândul lor contribuie cu sensibilitatea și nivelul de amplificare specific. Propagarea sensivității în lanțul de măsură se descrie simplu ca un produs de sensibilități.

$$\begin{aligned}
 S^i &= \frac{dY_1}{dM} - S \text{ interna;} \\
 S^T &= \frac{dY_2}{dY_1} - S \text{ traductor;} \\
 S^A &= \frac{dY_3}{dY_2} - S - \text{amplificator (I,V,G,R,etc);} \\
 S^F &= \frac{dY_4}{dY_3} - S - \text{filtru;} \\
 S^{A/D} &= \frac{dY_{ies}}{dY_4} - S - \text{convertor analog-digital;}
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

Sensibilitatea generală a biosenzorului se estimează astfel:

$$\begin{aligned}
 S &= \frac{dY_{ies}}{dM} = \frac{dY_1}{dM} \times \frac{dY_2}{dY_1} \times \frac{dY_3}{dY_2} \times \frac{dY_4}{dY_3} \times \frac{dY_{ies}}{dY_4} \\
 &= A^i \times A^T \times A^A \times A^F \times A^{A/D}
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

Unele din aceste definiții se vor utiliza pentru cazuri specifice de clase de biosenzori.

### 3.1.7 Zgomot, rezoluție, drift

**Zgomotul** este un factor important ce afectează sensibilitatea, selectivitatea și rezoluția biosenzorilor. În situații practice sunt prezente diferite tipuri de zgomote care sunt legate de modul de operare sau de punctul de măsurare a biosenzorului: zgomote termice, electrochimice, de contact electric, fluctuații, generare-recombinare sarcini electrice, bariere de potențial aleatorii. Toate aceste tipuri de zgomote nu sunt generate simultan într-un biosenzor, ele sunt dependente de natura interacției A-R și de lanțul de mă-

sură în care este integrat traductorul. Orice tip de zgomot este caracterizat prin densitatea spectrală și descris printr-o funcție  $S(f)$  ce reprezintă pătratul tensiunii de zgomot la o frecvență dată.

Pentru un domeniu de măsură unde se realizează înregistrarea semnalului și pe o gamă de frecvențe de interes ( $f_1$ - $f_2$ ) unde se manifestă zgomotul atunci se estimează valoarea medie a pătratului tensiunii de ieșire:

$$V^2 = \int_{f_1}^{f_2} s(f)df$$

cu

$$s(f) = 4kTR, \text{ pentru zgomot termic}$$

$$s(f) = 2qI, \text{ pentru acumulari/descarcari spontane de sarcina}$$

3. 4

$$s(f) = kV^2 / f^\alpha, \alpha \cong 1; \text{ pentru fluctuatii de sarcina}$$

$$s(f) = \frac{k_1 k_2}{1 + \omega^2 \tau^2} \text{ pentru generare-recombinare sarcini}$$

parametrii reprezentând caracteristicile fiecărui proces ce produce un anumit tip de zgomot:  $k$ -constanta Boltzman,  $q$ -sarcina electrică,  $I$ -curent,  $R$ -rezistența electrică,  $V$ -tensiunea de zgomot,  $\tau$ - timp de recombinare

**Rezoluția** este definită ca fiind cantitatea de măsurand care produce un semnal de zgomot pentru o tensiune de ieșire. Definiția rezoluției se exprimă:

$$R = \frac{\text{tensiune zgomot}}{S}$$

3. 5

unde  $S$  este definit în 3.2. Se observă că senzorii cu sensibilități mai mari ce produc zgomote egale reprezintă o soluție practică importantă. În practică relația 3.5 se reconsideră acceptând zgomote de 3, 6, 9 ori mai mari față de relația de evaluare teoretică 3.5.

Aceasta este în funcție de nivelul de precizie al măsurătorilor ce trebuie realizate cu un senzor.

**Driftul** reprezintă deplasări fluctuante, nepredictibile, a semnalului la ieșire. Nu are semnificație statistică. Prezența sa poate fi redusă printr-un design adecvat al componentelor biosenzorului. Driftul se accentuează pe măsura îmbătrînirii componentelor biosenzorului. Analize detaliate asupra rolului acestor parametri se pot găsi în diferite referințe specifice microtehnologiei semiconductorilor. Particular pentru senzori și biosenzori se pot consulta [19, 20,21, 22].

### 3.2 Componentele biologice ale biosenzorilor

În capitolul 2 s-a prezentat evoluția noțiunii de senzor cu o largă extindere spre inter și transdisciplinaritatea domeniului. În această secțiune se vor descrie succint componentele biologice ale biosenzorului ca element activ imobilizat pe membrană (fig 2.3) și proprietățile specifice cerute în contextul general al parametrilor de caracterizare și componentelor sale. Deși această parte este bine dezvoltată în domeniul științelor vieții



iar celelalte componente constituie arsenalul micro și nanotehnologiilor considerăm oportun o succintă prezentare a elementelor necesare pentru dezvoltarea conceptelor ulterioare.

Vom accepta ca o definiție generală: un senzor ideal este un dispozitiv care va detecta un “analit”, ținta supusă analizei și care este prezentă într-o probă dată. Majoritatea probelor conțin și alți “analizi” care pot interfera cu răspunsul biosenzorului. Acesta trebuie să posede o *selectivitate specifică* pentru a identifica “analitul” țintă. Prin urmare este necesar să se proiecteze biosenzori cu selectivitate pentru un “analit” cu capacitatea de discriminare a interferențelor produse de ceilalți componenți din proba analizată.

Capacitatea de identificare și selectivitate specifică reprezintă componenta cheie a *recunoașterii moleculare*.

Recunoașterea moleculară se realizează prin componenta din senzor formată din o *moleculă gazdă* (de exemplu, host-*chemoreceptor*) ce se leagă selectiv cu “analitul” (guest) țintă (molecula/ complexul molecular „oaspete”) ce necesită a fi identificat.

Pentru fiecare sistem „host-guest” (gazdă-oaspete) întotdeauna există o reacție chimică specifică din multitudinea canalelor de reacție posibile. Când ansamblul host-guest-reacție specifică a fost identificat atunci molecula gazdă se imobilizează sau încorporează în senzor, de regulă pe o membrană ce interfațează traductorul sau un electrod de contact. În final, trebuie găsit un mod de a semnaliza că evenimentul de legare/ recunoaștere a avut loc (transducția spre traductor). Figura 2.3 schițează toate aceste aspecte într-un concept unitar

### **3.2.1 Principiile recunoașterii moleculare**

Una din cerințele cheie pentru recunoașterea moleculară este existența grupărilor sau de centrii cu reactivitate specifică din molecula gazdă care pot “închide” sau lega ioni, atomi, molecule, biomolecule. Exemple pentru acest fel de sisteme gazdă-oaspete cu capacități de recunoaștere pot fi văzute în procesele din viața cotidiană. Toate organismele vii folosesc enzime, care sunt proteine ce conțin “buzunare”, centre active, proiectate să recunoască un analit specific. Acest lucru înseamnă că numai un analit specific este capabil să intre în buzunarul enzimei.

Enzimele pot fi folosite în biosenzori ca elemente receptoare gazdă cu capacitate de recunoaștere moleculară, dar sunt în general instabile[23,24].

Este astfel necesar să se sintetizeze clase noi de macromolecule/ biomolecule care sunt capabile să joace rolul de molecule *gazdă-receptoare*. Pentru a proiecta molecule gazdă ce pot fi folosite într-un biosenzor sunt luate în considerare următoarele criterii:

- Molecula gazdă trebuie să fie stabilă la condițiile în care va fi folosită
- Trebuie să fie capabilă să lege selectiv analitul din probă
- Trebuie să fie capabilă să fie imobilizată într-un film/membrana care este în contact cu proba.
- Trebuie să semnaleze că un eveniment de legare gazdă-oaspete a avut loc
- În mod ideal trebuie să elibereze analitul după detectare astfel încât gazda să fie liberă pentru a fi reutilizabilă.

### Receptori Sintetici

Receptorii biologici includ: anticorpi, receptori membranari, enzime, ribozomi, lectine etc. Ei leagă analiții utilizând mecanisme de recunoaștere moleculară de tipul "lock-and-key" (cheie-lacăt, identificare-immobilizare), figura 3.3.

Receptorii biologici în general nu sunt soluții practice pentru multe aplicații deoarece specificitatea, sensibilitatea și stabilitatea nu pot fi optimizate. Receptorii artificiali sunt medii de immobilizare care pot fi optimizați prin proiectare moleculară pentru orice tip de aplicație.

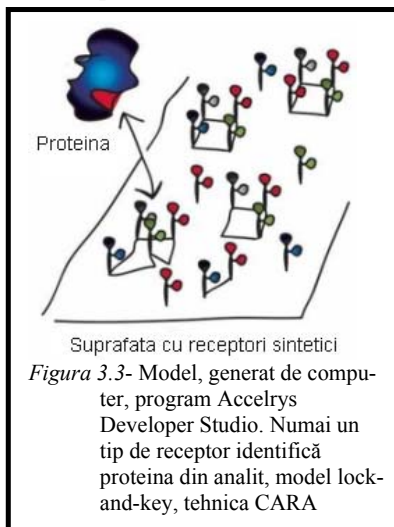
Figura 3.3 arată pe un model generat că numai un tip de receptor are specificitate și reacționează la un analit-proteină, ceilalți rămân neutri.

Proiectarea și sinteza receptorilor sintetici se bazează pe instrumentele dezvoltate de proteomică și ingineria genetică producând componente de recunoaștere ce pot răspunde la apariția și identificarea unor boli necunoscute, în bioteorism, la dezvoltarea de medicamente anticancer, antivirale, kituri de testare rapidă, diagnostice clinice și veterinare.

În prezent se dezvoltă platforme și arii de receptori artificiali fundamentate pe tehnici de matematică combinatorială, biologia interfeței, chimia suprafețelor. Acestea au indus dezvoltarea de diverse medii de receptori artificiali cu capacitate de selecție rapidă și diversificată pentru orice analit țintă.

Tehnica actuală de producere a receptorilor sintetici se numește CARA- combinatorial array of receptor analysis. Se vor prezenta câteva exemple de recunoaștere moleculară pe structuri relativ simple de receptori sintetici, macrocicluri cu capacitate de immobilizare și identificare pentru ioni metalici. Aceste exemple vor crea o bază mai profundă de a înțelege mecanismele implicate în biosenzori cu enzime, anticorpi, celule etc., unde joacă un rol important de sisteme receptor. Chimia supramoleculară a dezvoltat o gamă variată de macrocicluri [25, 26, 27] cu rol de receptori sintetici. În figura 3.4 sunt descrise clase variate de macrocicluri. Cea mai comună caracteristică pentru clasele de macrocicluri este că ele conțin cavități ce se comportă ca buzunare gazdă pentru moleculele oaspete. Selectivitatea gazdelor poate fi realizată în modul de „citire” prin variația mărimii cavităților preformate.

De exemplu, 12-crown-4 are o cavitate mică ideală pentru legarea ionilor mici cum ar fi  $\text{Li}^+$ , în timp ce 18-crown-6 are o cavitate mare care se potrivește mai bine ionilor mari cum ar fi  $\text{K}^+$ . Este evident că mărimea cavităților este importantă pentru selectivitatea gazdei, dar rămâne întrebarea ce anume atrage un ion sau moleculă într-o cavitate preformată și ce factori stabilizează complexul gazdă-oaspete [28].



În enzime, interacțiile necovalente slabe (legătura de hidrogen, electrostatică, dipol-dipol, van der Waals,  $\pi$ - $\pi$ ) sunt folosite să lege oaspetele în buzunarul enzimei.

Aceste interacții stabilizează interacția gazdă -oaspete. Macrociclurile descrise în figura 3.4 conțin funcționalități polare care sunt capabile de interacție cu oaspeții prin legătura de hidrogen, interacții electrostatice și interacții dipol-dipol. Este de asemenea de dorit ca legarea din cavitate să nu fie prea puternică, pentru că este important ca analitul, oaspetele, să fie eliberat din gazdă după ce a fost detectat și măsurat. Eterii crown și calixarenele sunt ideali pentru legarea cationilor metalici, lucru bazat pe mărimea cavității lor dar și pe densitatea mare de electroni prezentă pe atomii de oxigen din cavitate.

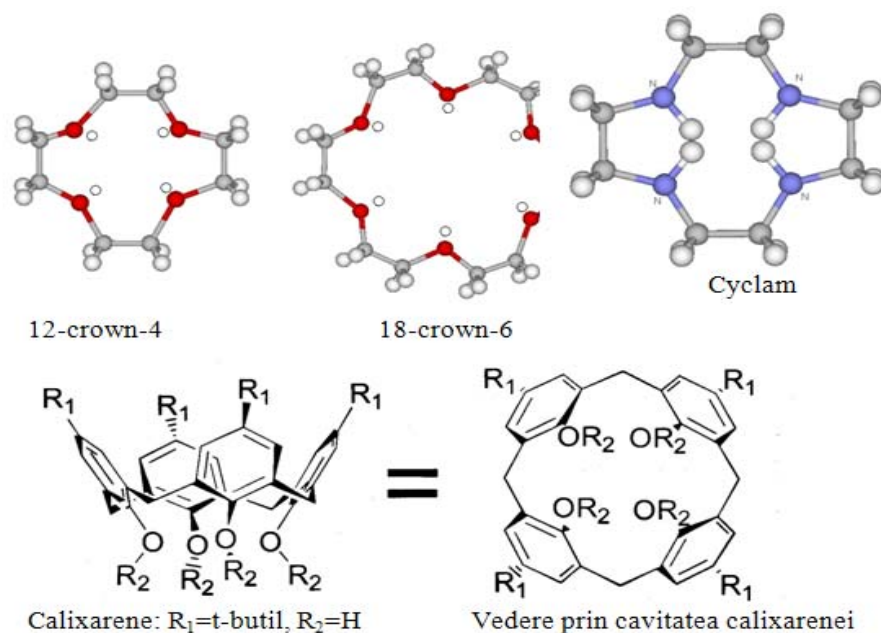
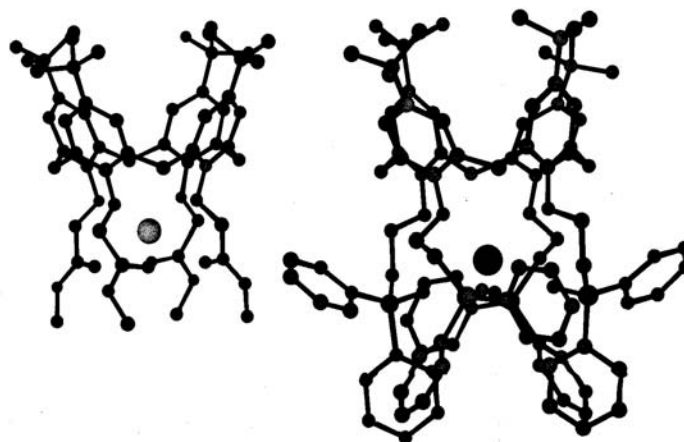


Figura 3.4- Clase de macrocicluri cu cavități de diametre diferite și reactivități specifice

În figura 3.5 este prezentată structura tetraetilestercalix[4]arena. Acest compus a fost preparat din macrociclul de bază calix[4]arena prezentată în figura 3.4. Deși compusul de bază leagă selectiv  $\text{Li}^+$  față de alți cationi metalici [29, 30, 31], versiunea modificată a macrociclului de bază are o selectivitate foarte bună pentru  $\text{Na}^+$ . Astfel prin modificare sintetică este posibil să se mărească capacitatea cavității gazdei și pot fi introduse funcționalități noi care vor favoriza legarea unor molecule și ioni specifici. Alt exemplu de calixarene modificate, care demonstrează mai mult acest principiu, este grupul de tetrafosfinoxid de calix[4]arena (figura 3.5).



Tetraetilestercalix[4]arena

Tetrafosfin oxid de calix[4]arena

*Figura 3.5*-Cavitatea tetraetilesterului este selectivă pentru sodiu în timp ce cavitatea oxidului tetrafosfinic este selectivă la calciu

Schimbând grupurile de legare asupra aceluiași șablon calix[4]arena din esteri în oxizi de hidrogen fosforat, se schimbă selectivitatea de la  $\text{Na}^+$  la  $\text{Ca}^{2+}$ . Mărind numărul de unități repetabile în esteri și oxizi de hidrogen fosforat la șase, crește capacitatea cavității iar selectivitatea se schimbă în favoarea cationilor mai mari cum ar fi  $\text{Cs}^+$  și respectiv  $\text{Pb}^{2+}$ .

Acest tip de senzori a fost folosit la detectarea cationilor metalici de interes biomedical și pentru mediul înconjurător. Unii compuși gazdă au fost dezvoltati de asemenea pentru detectarea selectivă a moleculelor neutre mici fără sarcină. S-a decoperit că structurile de calixarene au aplicație largă în acest domeniu [5,6]. Un exemplu implică folosirea amidei de tetra-(S-propanol) calix[4]arena ce conține patru jumătăți chirale laterale pentru diferențierea selectivă dintre enantiomerii de fenilalaninol. Structura acesteia este prezentată în figura 3.6

Alte tehnici ale chimiei supramoleculare pot fi angajate în sinteza de receptori sintetici ce simulează proprietățile enzimelor. Amintim structuri de bază ce pot fi modificate: porfirinele, polimerii semiconductori din clasa tetrahialofulvenelor, poliacene, PPV (poliparafenilvinilidene). Alte șabloane pot fi considerate polizaharidele modificate. Un arhetip liniar sunt polianilinele ce conțin cele două tipuri de stări redox

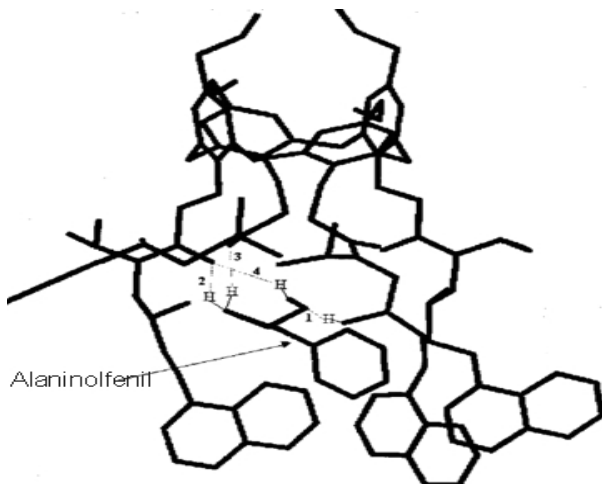


Figura 3.6-Model, vedere laterală, a complexului format de S-fenilalanilol și amida de S-propanalol calix[4]arena (model generat cu MacroModel v 6.0)

#### Bazele moleculare ale interacțiunii Ag-Ac

Dintre multiplele clasificări ale biosenzorilor cei de bioafinitate au o largă gamă de aplicații iar interacțiunile antigen-anticorpi (Ag-Ac) joacă un rol important și din ce mai mult sunt considerate un important instrument în dezvoltarea principiilor de recunoaștere moleculară. Prezentăm în continuare noțiunile strict legate de biosenzori.

Interacțiunile Ag-Ac, *in vivo* sunt întotdeauna reversibile. Factorii care condiționează interacțiunea Ag-Ac sunt:

- *Complementaritatea structurală* dintre determinantul antigenic și situsul de combinare al anticorpului. Acesta este factorul exclusiv al specificității reacției. Complementaritatea structurală presupune adaptarea conformațională a celor două grupări reactante și a fost gândită în termeni structurali, pe principiul cheie-lacăt similar cu mecanismul descris anterior
- *Complementaritatea chimică* a grupărilor reactante este consecința complementarității structurale și semnifică intrarea în acțiune a unor forțe intermoleculare care stabilizează și consolidează interacțiunea celor două grupări. Formarea legăturilor intermoleculare necesită existența unor grupări atomice suficient de apropiate pe cele două molecule. Distanța dintre ele este invers proporțională gradului de complementaritate.

Deși complementaritatea structurală nu este strict obligatorie, o potrivire spațială cât mai înaltă este mai favorabilă interacțiunii. Ea se exprimă prin congruența suprafețelor de contact care furnizează forțe de atracție intermoleculară ce stabilizează complexul.

La interacțiunea Ag-Ac participă următoarele tipuri de legături necovalente: *legăturile de H, forțele electrostatice, legături van der Waals și legături hidrofobe*. Toate sunt forțe nespecifice cu valoare mică și natura lor face ca reacția să fie reversibilă.(figura 3.7)

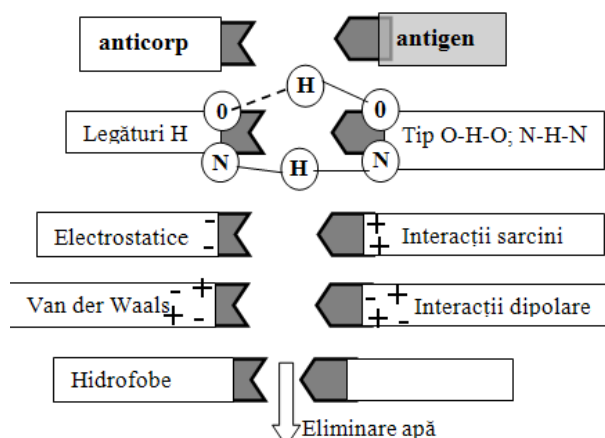


Figura 3.7- Interacții specifice Ag-Ac

Legăturile de H se formează când doi atomi au în comun un nucleu atomic de H (un proton). Protonul comun se găsește între doi atomi de N sau de O sau între unul de N și unul de O. Nucleul de H este legat covalent de unul dintre cei doi atomi (de N sau de O). Legătura de H are energia de legare de 3-7 kcal/mol.

*Forțele* intermoleculare implicate în formarea complexului Ag-Ac. Acțiunea acestor forțe necesită un contact strâns între cele două grupări reactante.

*Legăturile de H* rezultă prin formarea unei punți de H între doi atomi apropiați.

*Forțele electrostatice* se datorează atracției grupelor ionice cu sarcini opuse situate la periferia celor două lanțuri proteice.

*Forțele Van der Waals* rezultă prin interacțiunea între diferiți nori electronici, reprezentați sub forma dipolilor oscilanți. Legăturile van der Waals, cele mai slabe forțe de interacțiune, sunt active pe distanțe foarte mici dintre grupările reactante. Energia de legare este de 1-2 kcal/mol.

Legăturile Van der Waals nu se bazează pe o separare permanentă a sarcinilor electrice, ci pe fluctuații ale acestora, induse de apropierea moleculelor. La o distanță intermoleculară limită se formează câmpuri electrice instantanee, cu efect polarizant asupra moleculelor învecinate.

Între atomii suficient de apropiați, apare o forță de atracție reciprocă indusă de sarcina dipol fluctuantă, pe care un dipol o induce în dipolul învecinat. Aceste forțe se mai numesc și *forțe de dispersie*. Intensitatea lor depinde de distanța dintre grupările implicate și este invers proporțională cu puterea a 7-a a distanței. Valoarea lor este optimă la 1-2 Å.

*Legăturile hidrofobe*, care pot contribui cu jumătate din forța de legare Ag-Ac, sunt produse prin asociația grupărilor nepolare și hidrofobe, de unde moleculele de apă sunt excluse. Distanța optimă dintre grupările reactive variază cu tipul de legătură.

*Forțele electrostatice* (coulombiene sau ionice) sunt rezultatul atracției dintre atomi sau dintre grupe de atomi cu sarcină electrică opusă, situate pe cele două grupări reactante: de exemplu, între un cation ( $\text{Na}^+$ ) și un anion ( $\text{Cl}^-$ ) sau între  $\text{COO}^-$  și  $\text{NH}_3^+$ .

Energia de legare a acestor forțe este semnificativă la distanțe foarte mici (sub 100 Å) dintre grupările reactante. Juxtapunerea exactă a ionilor favorizează acțiunea acestor forțe. Energia de legare este de 5 kcal/mol și variază invers proporțional cu pătratul distanței dintre cele două grupări reactante ( $1/d^2$ ).

*Legăturile hidrofobe* (sau apolare) apar între grupări nepolare (neionizate) în soluții apoase și sunt consecința tendinței de excludere a rețelei ordonate de molecule de apă, dintre molecula de antigen și cea de anticorp. Aceste legături sunt favorizate de aminoacizii cu grupări apolare, care au tendința de asociere, diminuând numărul moleculelor de apă din vecinătatea lor. Prin eliminarea moleculelor de apă dintre grupările reactante, distanța dintre situsurile active scade foarte mult și crește valoarea forțelor stabilizatoare.

Complementaritatea spațială sau forțele intermoleculare nu sunt, fiecare în parte, suficiente pentru a forma legături stabile. Pentru stabilitatea interacțiunii Ag-Ac sunt necesare ambele condiții. Cu cât energia de legare a reactanților este mai mare, cu atât complexele Ag-Ac sunt mai stabile.

Interacțiunea grupărilor reactante ale antigenului și anticorpului este definită de doi parametri: *afinitatea și aviditatea anticorpilor*.

Măsurarea afinității anticorpilor se poate realiza prin dializa la echilibru (figura 3.8). Interacțiunea Ag-Ac este reversibilă. În interiorul sacului de dializă, haptena este parțial sub formă liberă și parțial legată cu anticorpul, în funcție de afinitatea anticorpilor. Prin membrana sacului de dializă poate difuza numai haptena liberă și concentrația sa externă va egala concentrația haptenei libere din interiorul sacului. Măsurarea concentrației haptenei în sacul de dializă permite calculul cantității de haptene legată de anticorpi.

Reînnoirea constantă a tamponului duce la disocierea totală și la pierderea haptenei din sacul de dializă, ceea ce denotă natura reversibilă a legăturii Ag-Ac [32].

*Afinitatea* anticorpilor măsoară *forța de legare* dintre un determinant antigenic și situsul complementar de legare la un anticorp specific. Afinitatea este rezultanta forțelor de atracție și de respingere care mediază interacțiunea celor doi reactanți.

Tăria acestor interacțiuni se măsoară în reacția dintre un antigen monovalent ( haptene) cu anticorpii specifici. O interacțiune cu afinitate înaltă presupune structuri complementare perfecte în timp ce complementaritatea imperfectă a grupărilor reactante determină o afinitate scăzută, deoarece forțele de atracție sunt active numai pe distanțe foarte mici și

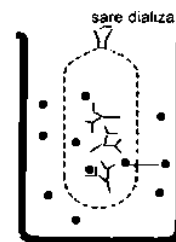


Figura 3.8-aranjament experimental pentru măsurarea prin dializă a interacțiunii  $A_g-A_c$

sunt diminuate de forțele de respingere. Complexele Ag-Ac formate de anticorpi cu afinitate mică, persistă în circulație și se depun pe membrana bazală a glomerulilor renali.

Complexele formate de anticorpii cu afinitate mare se elimină rapid din circulație, fără efecte defavorabile asupra funcției renale.

Interacțiunea Ag-Ac este caracterizată permanent prin formarea și anularea diferitelor tipuri de legături intermoleculare. *In vivo*, probabil toate reacțiile Ag-Ac sunt reversibile, dar reacțiile secundare, *in vitro* (aglutinarea, precipitarea), în condițiile echilibrului reactanților, sunt ireversibile.

### **3.2.2 Imobilizarea moleculelor gazdă**

O dată ce un compus receptor a fost dezvoltat pentru identificarea unui analit specific este necesar ca acesta să fie imobilizat în dispozitivul senzorial. Cea mai folosită metodă este incorporarea moleculei gazdă în membrane flexibile de polimeri fixate pe suprafața senzorului. Majoritatea membranelor sunt formate fie turnate din soluție de polimeri sau polimeri plastifiați și preformați în filme subțiri. Polimerii utilizați sunt în general solubli în solvenți organici uzuali. Este esențial ca receptorul-molecula gazdă să fie solubilă într-o varietate de solvenți organici. Aceasta se obține prin introducerea de grupări lipofile cum ar fi t-butil în calixarene.

Problemele acestor metode de imobilizare apar când membrana intră în contact cu proba (care este de obicei apoasă). S-a constatat că moleculele gazdă se filtrează în timp din membrane micșorând astfel perioada de viață a senzorului.

O modalitate de a evita această problemă este să se lege covalent molecula gazdă în polimerul membranei. Această abordare poate fi destul de greoaie din punct de vedere sintetic pentru că trebuie încorporate unitățile reactive în molecula gazdă, care poate afecta selectivitatea. În cazul în care grupările reactive au fost introduse în moleculă acestea pot fi folosite să lege covalent gazda în polimeri și la suprafețele substratului (de exemplu silice) cu cuplare simultană la electrod (platina). Detalii asupra tehnicilor de imobilizare sunt descrise în [33].

Alte tehnici de imobilizare abordate în prezent sunt: ink-jet printing, polimerizările în plasmă, transport electroforetic, electro-polimerizările, fiecare cu avantaje specifice.

### **3.2.3 Transducția semnalului**

Așa cum a fost menționat anterior, este esențial ca evenimentul de legare dintre gazdă și oaspete (interacțiunea receptor-analit, R-A) să fie detectat. Este astfel necesar să fie disponibil un mod de identificare și transducție a semnalului provenit de la evenimentul interacției receptor-analit spre exterior pentru a fi prelucrat sau procesat. Acesta este în termen general definit ca *traductor*. Prin urmare traductorul trebuie să fie în contact intim cu receptorul sau membrana ce a imobilizat receptorul.

Electrozii, interacțiile interfaciale sunt determinante în captarea semnalului de la o interacție R-A și transformarea acestuia în semnal electric sau fonic. Există diverse moduri de identificare a evenimentului R-A, colectare de semnal și transducția lui spre exterior ca semnal electric. Modul de identificare a semnalelor și de transducție a acestora definește tipul de biosenzor. De exemplu dacă interacția R-A este identificată prin metode



electrochimice atunci biosenzorul se va numi „Biosenzor electrochimic”. Aceasta semnifică imobilizarea receptorului pe un traductor electrochimic care măsoară un curent ( metoda amperometrică) sau o tensiune (potențiomtric) între doi electrozi.

Dacă R este imobilizat pe un component optic atunci vom defini biosenzorii optici. ( cu fibră optică, de fluorescență, de absorbție, de rezonanță plas-monică -SPR).

Aceste metode de măsurare și transducție a semnalului induce și clasificarea biosenzorilor ce va fi prezentată în detaliu în capitolele următoare. În continuare se va prezenta câteva din aspectele generale legate de metodele de încorporare a elementului de transducție în gazdă (elementul receptor). Pentru detecție, la majoritatea biosenzorilor electrochimici, este necesar ca membranele ce conțin molecula gazdă să fie plasate pe o suprafață a unui electrod care la legarea oaspetelui conduce la un răspuns electrochimic (figura 2.2, 2.3). Această abordare funcționează foarte bine când analiții țintă sunt specii încărcate cum ar fi cationii metalici.

Din păcate moleculele neutre nu pot fi detectate din punct de vedere al transducției electrochimice. Pentru a evita această problemă s-au folosit cu succes metodele optice de detectare. De exemplu o gazdă chirală în calixarene ce conține unități de naftil, fluorescențe. La legarea cu oaspetele are loc atenuarea fluorescenței ca rezultat al interacției dintre grupurile naftil–fenil din gazdă respectiv analit. Atenuarea fluorescenței este proporțională cu concentrația de analit. Metodele optice sunt deseori folosite pentru că ele oferă o sensibilitate mai mare decât tehnicile electrochimice O calixarenă ce prezintă fluorescență la legarea cu un analit este prezentat în figura 3.9 [34]. În absența analitului oaspete acest compus nu prezintă fluorescență pentru că substituentul pirenice nu poate veni în contact cu substituentul nitrofenil învecinat (iar atenuarea fluorescenței are loc datorită interacției lor). Totuși în prezența ionilor  $\text{Na}^+$  este observată fluorescența, pentru că ionul  $\text{Na}^+$  intră în cavitate și se leagă cu oxigenii din grupările fenoxi și carbonil din gazdă.

Această legare induce o conformație mai rigidă îndepărtând grupările de nitrofenil de pirene prevenind atenuarea fluorescenței.

### 3.2.4 Tipuri de componente biologice

Din cele prezentate anterior rezultă că biosenzorul este un sistem de analiză, bioelectronic care combină un *traductor* cu un *component biologic* ce se află într-o interdependență specifică. Biosenzorii utilizează sisteme biologice cu diferite nivele de recunoaștere ale substanțelor ce vor fi determinate. Primul pas în această interacție este formarea complexului specific al substanței biologice active, imobilizate, R (receptorul, substratul cu componenta biologică sensibilă) cu analitul A ( definit adeseori ca semnalul chimic). În tabelul 3.2 sunt prezentate succint scheme specifice după care este conceput

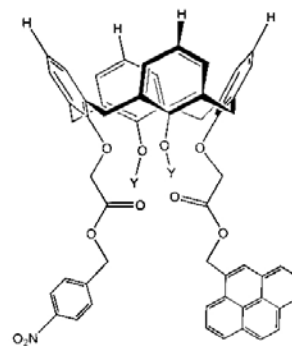


Figura 3.9- Calixarenă fluorescentă, grupările pirenice atașate sunt suficient de libere pentru a permite atenuarea fluorescenței la legarea  $\text{Na}^+$ . [29]

un biosenzor în relație cu natura receptorului și a semnalului chimic/ biochimic. Se constată că există două clase generale de biosenzori care sunt bazați pe răspunsul datorită bioafinității dintre R cu A ce modifică distribuția de sarcini electrice ce poate fi măsurată cu traductori specifici, fie de consumarea substratului printr-o reacție specifică a acestuia.

Tabela 3.2- Clasificare biosenzori după activitatea biologică

1. Biosenzori de bioafinitate		2. Biosenzori metabolici	
$A + R \rightleftharpoons AR$		$A + R \rightleftharpoons AR \rightarrow P + R$	
Modificarea densității electronilor		Consumarea substratului și formarea produsului	
Receptorul R	Semnalul chimic A	Receptorul R	Răspunsul chimic A
1. Colorant	1. Proteine	1. Enzime	1. Substrat
2. Lectina	2. Zaharide	2. Microorganisme	2. Cofactor
3. Apoenzima	3. Glicoproteine	3. Microbi	3. Inhibitor
4. Anticorp	4. Substrat Inhibitor	4. Tesut Striat	4. Activator
5. Sistem de trans-port	5. Grup Prostetic		5. Activitatea enzimei
	6. Antigen		
	7. Hormon		
	8. Substrat Analog.		

Componenta biologică din care este alcătuit elementul de recunoaștere moleculară (R) este reprezentată prin diferite specii active ce pot fi: enzime sau sisteme enzimatic, anticorpi (Ab) sau antigeni (Ag), receptori, populații de bacterii sau celule eucariote, fragmente de țesuturi, uneori chiar celule embrionare. Analizii sau substanțele ce pot fi analizate (A) sunt: glucoza sau alte zaharuri, aminoacizi, alcooli, lipide, nucleotide. Ei pot fi identificați prin interacția lor specifică sau poate fi măsurată concentrația lor prin diverse metode. Atât R cât și A reprezintă specii moleculare distincte, cu înaltă specializare macromoleculară (anticorpi, antigene, enzime, receptori, etc), sau sunt sisteme complexe (celule, țesuturi, chisturi de protozoare, ouă de paraziți intestinali).

Din cele prezentate mai sus și din tabela 3.2 observăm că biosenzorii se pot clasifica în general în două grupe după componenta biologică. *Senzori catalitici* ce utilizează enzime, microorganisme sau celule pentru a cataliza o reacție cu o substanță țintă.

*Senzorii de afinitate* ce utilizează anticorpi, receptori și acizi nucleici ce se leagă de o substanță țintă. Reacțiile sunt cuantificate prin traductori electrochimici, optici, evanescenti etc

După componenta biologică activă ei pot fi subclasificați după cum urmează:

**1. Biosenzorul enzimatic.** Enzimele sunt proteine cu înaltă energie, caracterizate prin funcția lor catalitică. Moleculele de substrat modificate conduc la reacții de oxidare, reducere, hidroliză, ce pot fi măsurate cu ajutorul biosenzorului enzimatic. Biosenzorul enzimatic produce un răspuns linear în funcție de concentrația substratului.

**2. Imunosenzorul.** Anticorpii sunt glicoproteine produse de sistemul imunitar la intervenția unei substanțe din exterior, antigenul. Teoretic este posibilă producerea de anticorpi și fără să se identifice un antigen. Imunosenzorul este un senzor de mare sensibilitate. Principiul de funcționare se bazează pe interacțiunea Ag-Ac, descrisă la paragraful anterior, de recunoaștere moleculară (3.2.1)

### 3. Biosenzorul cu receptori

Normalitatea proceselor biologice este asigurată de procese moleculare de sensibilitate mare bazate pe specializarea unor proteine structurale, numite receptori capabile de a recunoaște un număr de semnale fiziologice. Este și cazul neurotransmițătorilor, a căror acțiune este mediată prin prezența unor receptori în membrana plasmatică, în situsuri sau ținte celulare. În acest caz activarea situsului biologic activ se face prin canalele ionice. Receptorul pentru acetilcolina este primul receptor cunoscut în fenomenele de neurotransmisie. (*Un excelent studiu a fost prezentat de Costa M, Department of Physiology and Centre of Neuroscience, School of Medicine, Flinders University, Adelaide Australia, NATO-ASI, Il Ciocco, Italy Biosensors 2005, „Advances In Sensors; The Lessons From Neurosciences”*). Acest domeniu este în stadiu de laborator cu rezultate notabile [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]

### 4. Biosenzorul bazat pe celule sau țesuturi

Măsurarea speciilor moleculare în acest caz nu se rezumă la interacția cu compușii de analizat, transformările ce au loc pot fi măsurate ca produși rezultați. Este de dorit să se opereze cu populații de celule a căror căi metabolice principale să fie cunoscute. Un relevant exemplu este oferit de biosenzorul L-arginina, care asociază populații de celule bacteriene de *Streptococcus faecium* în combinație cu un electrod pentru amoniac. Arginina este metabolizată de microorganisme, după schema din figura 3.10 [47]

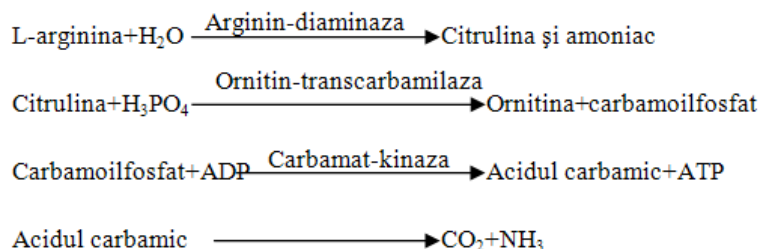


Figura 3.10-Mecanismele pentru transformarea L-argininei prin intermediul *Streptococcus faecium*

Este dificil de obținut asemenea complexe de reacții în afara structurilor celulare. Asemănător cu utilizarea populațiilor celulare ca elemente senzitive se pot folosi fragmente sau părți de țesuturi, vegetale sau animale. În acest caz, avantajul este mai mare, deoarece nu se fac eforturi suplimentare pentru menținerea celulelor viabile, într-un aranjament natural. Pentru biosenzorul de adenzină a fost propus un element biosenzitiv tisular, obținut din mucoasa intestinului subțire de la un soarece. Pentru biosenzorul de dopamina, specialistii s-au orientat la pulpa fructului de banana, având în vedere că aceasta are proprietăți biocatalitice remarcabile.

**5. Biosenzori cu proteine redox.** Proteinele redox sunt implicate în procese biochimice precum respirația celulară și reacțiile caracteristice sistemului de fotosinteză.

Principalele tipuri de proteine redox implicate și cunoscute sunt:

1. **CITOCROMII**, conțin ionii de fier în grupul prostetic, iar citocromul “c” este implicat în transferul de electroni în mitocondrie.

2. FEREDOXINELE, conțin ioni de fier și sulf, în combinații dimerice ale cloroplastelor (2Fe-2S) feredoxina și combinații tetramerice din feredoxina bacteriană 2 (2Fe- 2S), implicate în procesele de fotosinteză și respectiv de transferul ionilor fixați de azot.
3. PROTEINELE ALBASTRE, conțin cupru legat de cel mai mic rest de cisteină, implicat într-o structură tetraedrică, cum ar fi plastocianina și azurina, ce mediază transferul de electroni în fotosinteză și posibil în reducerea nitriților.
4. FLAVOPROTEINELE, conțin un grup prostetic și un cunjugat organic, sunt implicate în transferul proteinelor ca de exemplu flavotoxinele.

Aceste proteine au un rol important în natură, datorită localizării pe suprafața lor a centrilor redox. Arhitectura subtilă a moleculelor oferă selectivitate și specificitate acestor molecule în interacția lor cu alte proteine sau enzime, ca de exemplu structura citocromului "c". Fierul porfirinic (hemul), este situat în centrul moleculei și bine învelit sau ascuns, el este expus solvenților într-o mica proporție de 0,06%, din totalul suprafeței moleculare. Proteina suportă un potențial pozitiv de +9mV datorită excesului de resturi lizinice, bazice. Se manifestă un moment de dipol de 324 Debye, ce produce un dezechilibru în balanțul distribuției spațiale a lanțurilor acide. Un număr de resturi de lizină se distribuie în jurul solventului la care este expus centrul hemului ce interacționează cu proteinele redox [48].

### **3.2.5 Integrarea componentelor biologice în biosenzori**

Recunoașterea specifică a analitului, transformarea semnalului fizico-chimic produs de interacțiunea cu receptorul într-un semnal electric, procesarea și amplificarea semnalului au fost descrise pe larg în secțiunile anterioare, ele constituind elementele principale din alcătuirea oricărui tip de biosenzor. Biosenzorii descriși în literatura de specialitate se subdivid în trei generații (figura 3.11). La senzorii din prima generație, biocatalizatorul este prins la suprafața membranei și apoi acest aranjament este fixat pe suprafața traductorului (fig 3.11a). Adsorbția sau fixarea covalentă a componentului biologic activ la suprafața traductorului permite eliminarea membranei semipermeabile, care este a doua generație (fig.3.11b). Legarea directă a biocatalizatorului la dispozitivul electronic care traduce și amplifică semnalul, cum ar fi tranzistorul cu efect de câmp, stă la baza miniaturizării biosenzorilor care este a treia generație (fig.3.11c). În funcție de natura imobilizării și a interacției dintre cele trei componente A-R-membrană-contact cu electrozii spre traductor și procesele din biosenzor au evoluat în funcție de generație.

Deși numărul și varietatea metodelor utilizate în cazul construcției biosenzorilor este foarte mare, totuși câteva principii fundamentale sunt în general valabile pentru toate tipurile. În primul rând, specificitatea și selectivitatea este dominată de componenta biologică și este direct legată de natura ei: enzimele, anticorpții, microorganismele. Specificitatea derivă din legarea analitului la componentul biologic folosit ca receptor.

La baza acestei secvențe dominante este reacția biochimică A-R și procesul de ciocnire dintre A și R. În al doilea rând, transportul analitului spre și prin suprafața considerată spre R constituie de asemenea un factor important. Acest proces este legat de transportul unei mărimi fizice prin mecanisme tipice de difuzie, migrație, convecție.

În al treilea rând, semnalul senzorului este dependent reacției A-R presupus a fi la o viteză constantă. Stările tranzitorii și condițiile de pseudoechilibru biochimic, sunt dominate de cinetica reacțiilor, natura transportului care la rândul lor sunt cuplate cu reacțiile de interfață A-R –substrat de imobilizare. Chiar și în cazul unui echilibru real, viteza

reacției în apropierea stării de echilibru va fi importantă în determinarea timpului de răspuns. În acest caz, cinetica acestor procese necesită considerarea unor condiții suplimentare. Clasificarea din figura 3.11 sumarizează stadiul integrării biosenzorilor cu microtehnologiile secolului XX. Mileniul III a produs, o dată cu dezvoltarea nanotehnologiilor și a instrumentelor de manipulare a atomilor (microscopia de forțe atomice), o adevărată revoluție în medicină. Noile tipuri de materiale la scală nanometrică cu diferite nivele de biocompatibilitate, noua generație de celule de biocombustie fundamentată pe o mai bună înțelegere a metabolismului, manipularea informației stocate la nivel molecular au condus la o generație de biosenzori cu un înalt nivel de integrare. Informația moleculară stocată inițial în componentele moleculare de bază poate fi exprimată dirijată la un nivel superior numit "supramolecular" în care interacțiunile dintre molecule se realizează după algoritmi prestabiliți, putând conduce la materiale adaptative, funcționale și inteligente. Mai precis, se construiesc materiale pe baza unor principii moderne de concepție, supramoleculare și combinatoriale. Sunt dezvoltate tehnici separative, de stocare și detecție utilizând membrane "biomimetice" care funcționează după modele biologice sau după principii fizicochimice precise. Prin urmare avem posibilitatea explorării diversității moleculare, supramoleculare și combinatoriale în scopul elaborării de materiale adaptative cu proprietăți optime sau funcții multiple. Aceste concepte sunt utilizate de natură, de exemplu, din milioane de conformații pe care le poate adopta o proteină numai una prezintă activitate enzimatică foarte precisă. Prin astfel de exemple, natura ne învață să optimizăm explorând diversitatea. În acest context se explorează sisteme integrate de nivel nanometric format din senzori, surse de energie (celule de biocombustie- adeseori denumite gastroboți) ce utilizează metabolismul corpului uman, manipuloare pentru chirurgie nanometrică,

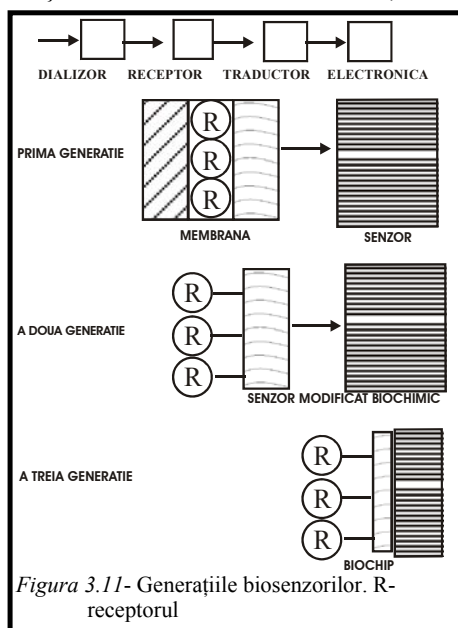


Figura 3.11- Generațiile biosenzorilor. R-receptorul

rezervoare de medicamente înglobate în polimeri inteligenți. Toate acestea au dimensiunea unui virus. Termenul astăzi este din ce mai mult utilizat: Nanomedicină [49].

Pentru a realiza avansurile de integrare ne vom limita la prezentarea schematică a unui biosenzor de ultimă generație bazat pe ADN, structuri de nanotuburi și polimeri semiconductori [50]. Figura 3.12 descrie principial secvențele de formare a unui senzor cu ADN. Biosenzorul electrochimic cu ADN din figura 3.12 este rezultatul cerințelor diagnosticului medical de a determina rapid și cu acuratețe segmentele din secvența unui ADN. Rezultatele din genetică, biologia moleculară preluate pe suportul nanotehnologiilor au condus la una dintre cele mai precise metode de detecție: senzor electrochimic cu ADN (combinarea principiului senzorului ISFET cu fire moleculare din nanotuburi). Principiul de funcționare prezentat în figură constă în colectarea de semnal între doi electrozi – unul electrod de lucru și altul de referință. Electrozii auxiliari au la rândul lor un rol bine precizat.

Mecanismul de senzare constă în modificarea caracteristicii I-V (curent – tensiune) în prezența unei molecule țintă. Nanotuburile de carbon sunt excepționali pentru electrodul de lucru având viteză de transfer de electroni mare și o rezoluție spațială excelentă.

Numai capetele nanotuburilor sunt active electrochimic, părțile laterale fiind inerte, aceasta oferă un avantaj excepțional și anume electrozii de CNT pot fi fixați într-un strat izolator lăsând numai capetele expuse spre mediul electrochimic. Ținta în senzorul ADN este o secvență necunoscută de ADN (sau oligonucleotide) atașată prin funcționale la grupările carboxilice sau aminice de CNT.

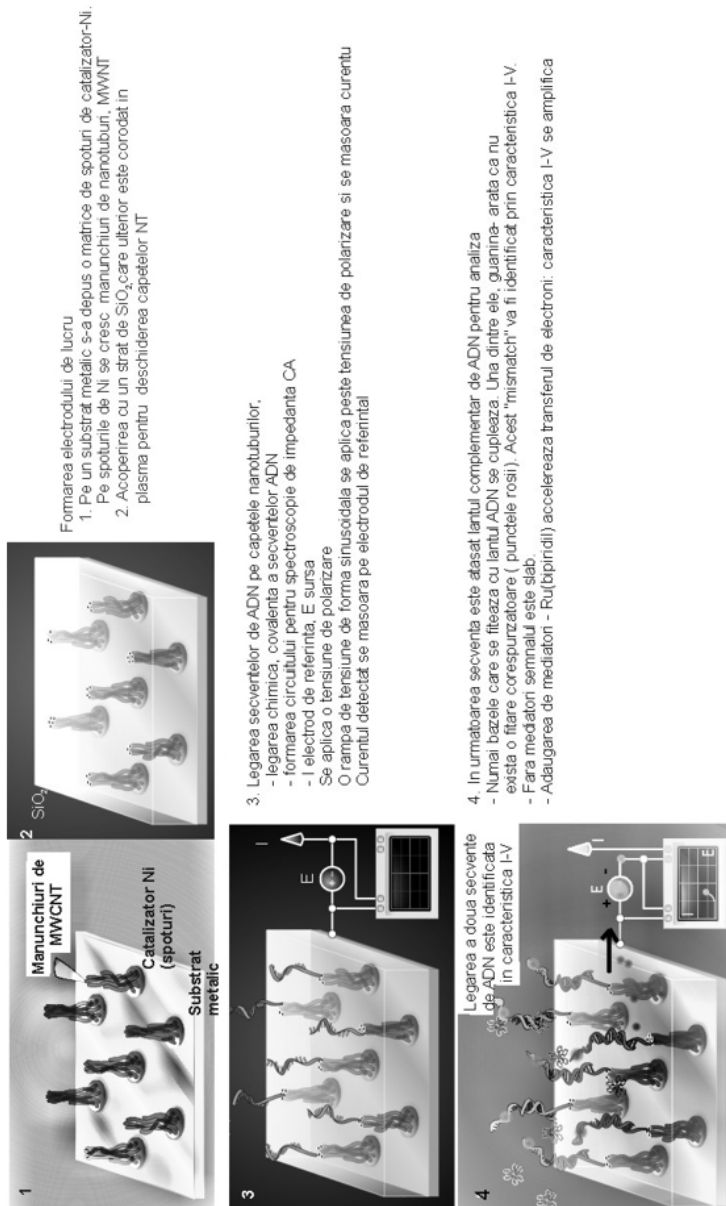


Figura 3.12- Principiul de construcție a unui biosenzor tip FET realizat prin funcționizare nanotuburilor cu ADN





### 3.3 Traductori și electrozi

Din paragrafele precedente rezultă că orice eveniment al interacției R-A este identificată și transdusă spre traductori prin intermediul electrozilor. Prin urmare traductorul transformă detecția indusă de variația fizico-chimică din elementul sensibil al biosenzorului într-un semnal, de regulă electric care este amplificat de un circuit electronic (vezi figura 2.1). Traductorul este în contact intim prin intermediul electrozilor cu materialul biologic iar activitatea acestor componente poate fi măsurată cu un sistem electric, termic sau optic. Traductorii sunt necesari pentru transformarea mărimii primare de intrare într-o mărime electrică, și reprezintă unul din elementele cheie al întregului sistem. Principalele tipuri de traductori folosiți în măsurarea interacției R-A sunt [51]:

**Traductori de tensiune sau de curent** ce măsoară între doi electrozi o diferență de potențial sau un curent electric. În acest caz electrozii nu reprezintă un traductor în adevăratul sens al cuvântului, deoarece nu transformă o mărime de altă natură într-una electrică, ci doar intermediază preluarea și transmiterea semnalelor electrice dintr-un mediu cu proprietăți fizico-chimice aparte, mediul biologic spre exterior.

Pot fi traductori cu electrozi de suprafață (în contact) sau de volum (imersați în mediu). Electrozii sunt în general mini sau microminiaturizați

#### **Traductori de temperatură**

- *prin contact:*
  - termistorii,
  - termocupluri,
  - joncțiuni semiconductoare,
  - tranzistori,
  - circuite integrate specializate.
- *prin radiație termică:*
  - detectori semiconductori,
  - bolometre rezistive,
  - bolometre piroelectrice.

#### **Traductori de debit :**

- mecanici
- optici, prin efect Doppler,
- ultrasonici, prin efect Doppler,
- magneto-electrici, bazați pe tensiunea electromotoare produsă de particule încărcate care se mișcă într-un câmp magnetic folosiți pentru măsurarea debitului de aer, sânge, fluide biologice în general cu aplicații în micro și nanofluidica sistemelor biologice

#### **Traductori de presiune:**

- manometre clasice, cu membrană și traductor de deplasare
- piezoelectrice, piezorezistivi, inductivi,
- cu semiconductori, circuite integrate

#### **Traductori de deplasare.**

- potențiometrici,
- optici.

#### **Traductori pentru măsurarea concentrațiilor (pH-metre)**

- semiconductori cu proprietăți de suprafață, dependente de concentrația diferitelor substanțe,
- traductori spectrometrici

#### **Traductori de radiație**

- ecrane fluorescente,
- scintilatori,
- semiconductori.

### **3.3.1 Electrozi**

#### **Tipuri de electrozi :**

- A. electrozi externi**, sau de suprafață, sunt în general electrozi metalici, care fac contact cu componenta bioactivă din senzor fie în mod direct (electrozi uscați sau solizi), fie prin intermediul unei soluții electrolitice (electrozi lichizi). Electrozii solizi sau uscați sunt realizați în general din argint, platină, aur, sau nichel. Pentru cazul în care avem contact direct cu epiderma va trebui să se ia în considerare că suprafața pielii nu este în general uscată sau inertă chimic, ci există poluări electrochimice care au ca principală componentă clorura de sodiu. În momentul în care un electrod metalic vine în contact cu soluția electrolitică va apărea un schimb de ioni între metal și electrolit. Ionii metalici, în măsura în care sunt solubili în soluția electrolitică vor migra în electrolit, în timp ce ionii negativi a electrolitului vor migra către electrodul metalic, recombinaându-se cu ionii metalici pentru a forma o sare a metalului din care este format electrodul. Această migrare a ionilor în direcții opuse echivalează cu un transfer de sarcină ce duce la apariția unui potențial de electrod. O condiție pe care trebuie să o îndeplinească electrozii este aceea că metalele din care sunt confecționați să nu fie solubile în electrolitii prezenți pe suprafața pielii, sau dacă sunt solubile, reacțiile chimice apărute să fie total reversibile la aplicarea unui potențial electric pe electrozi.

În această clasă de electrozi numiți și reversibili intră:

- electrozii din metal în contact cu un electrolit ce conține proprii săi ioni,
  - electrozii nemetalici în contact cu un electrolit,
  - electrozii compuși dintr-un metal și o sare greu solubilă a acestui metal în electrolitul cu anion comun cu sarea metalului.
- B. Electrozi interni**, sunt în general realizați din fire foarte subțiri, dintr-un metal rezistent: oțel inoxidabil, platină, wolfram. Porțiunea activă a electrodului poate fi acoperită cu un strat metalic bun conducător (aur, argint) iar cea inac-

tivă cu un strat izolator, de exemplu un polimer sau o peliculă subțire de sticlă. Suprafețele de contact cu componenta activă din senzor au totuși dimensiuni mari în comparație cu dimensiunile celulare, de aceea se folosesc pentru înregistrări extracelulare.

C. **Microelectrozii**, sunt tot electrozi interni, însă sunt astfel construiți încât să poată măsura potențialele în contact direct cu receptorul din biosenzor. Suprafața de contact cu R are dimensiuni micronice.

Microelectrozii pot fi :

- **solizi**, compuși, care pot fi realizați prin depunerea unui strat conductor (platină, aur,) pe un suport de sticlă având un vîrf deosebit de subțire. O altă variantă constructivă constă în inserarea unui conductor metalic sau din fibră de carbon într-un suport de rășină epoxidică amestecată cu o pastă conductoare.
- **lichizi**, sunt folosiți în prelevările celulare și constau dintr-o pipetă de sticlă având un vîrf de dimensiuni micronice, umplută cu o soluție electrolică conținând în general clorură de potasiu. În soluția de electrolit este cufundat un fir conductor, pentru a prelua potențialul electric.

### 3.3.2 Electrozi în senzori electrochimici

**Electrodul de aur** . Mulți ani s-a crezut că nu este posibil transferul direct al electronilor între electrod și proteine, datorită denaturării lor.

Cîteva considerente de ordin practic au dus la concluzia că centrul activ din hem este adsorbit ireversibil atunci cînd rezultă denaturarea proteinelor în contact cu electrodul. Modificarea suprafeței electrodului de aur prin adsorbția pe suprafața lui a 4,4'-bipiridil, a dus la modificarea configurației suprafeței electrodului pentru interacția cu citocromul "c"[59]. Este important de subliniat că 4,4'bipiridil nu este o substanță electroactivă, în regiunea de potențial și deci nu joacă rol de mediator. Această achiziție în domeniul electrochimiei a fost posibilă datorită legării cvasireversibile a citocromului "c" de electrodul modificat, de aur, cu 4,4' bipiridil, din acest demers rezultînd că legăturile de hidrogen din resturile de lizină s-au legat de azotul din piridil care a modificat suprafața electrodului. Tranzitul prin proteine-electrod complex, orientează rapid transferul de electroni, care se realizează după următoarea schemă:

- difuzia citocromului "c" pe electrod,
- legarea proteinelor pe suprafață,
- transferul de electroni,
- desorbția proteinelor.

Urmînd acest procedeu au fost posibile mai mult de 60 de modificări de suprafețe pentru electrochimia proteinelor și a electrodului de aur. Prin urmare folosind un reactiv bifuncțional (X-Y), în care grupul X este electrodul legat cu azot (N), fosfor (P) sau sulf (S) și grupul Y, ce trebuie să fie legat prin legături slabe de proteine. Rezultatele din electrochimia proteinelor s-au extins și la aminoacizi și peptide.

**Electrodul de grafit.** Electrochimia proteinelor a fost extinsă și la electrodul de carbon. Formele de carbon- grafitul pirolitic, carbonul vitros, mezocarbonii, sunt structuri în care planele grafenice, se aranjează ordonat în rețele hexagonale de tipul ABABA..sau dezordonat luând diferite forme turbostratice Planul grafenic bazal este hidrofob dar defectele existente sau induse conduc la legături C-C libere și se produce o creștere a legăturilor C-O prin oxidare (detalii în cap 9). Electrochimia directă a proteinelor încărcate pozitiv poate prin urmare să fie efectuată pe marginile planurilor grafitice ale electrodului de carbon. Transferul direct al electronilor pentru proteinele încărcate negativ, cum ar fi plastocianina cu electrodul de grafit (marginile sau muchiile planelor), poate fi ajutată cu cationi de mangan, calciu, crom, complexați cu compuși amino, Cr (Am6)<sup>3+</sup>, folosiți ca promotori al reacțiilor. În acest context promotorii sunt specii redox inactice în soluții dar care dau posibilitatea să se facă transferul electronilor la proteinele redox.

Electrozii de Au și grafit și tehnicile de microminiaturizare pînă la dimensiuni de 10<sup>Å</sup> sunt discutați în detaliu în referințele [52, 53]. Electrozii microminiaturizați prezintă avantaje specifice printre care amintim îmbunătățirea polarizării, contacte cu materialul biologic la nivelul situsurilor active. Electrozi pentru variate sisteme de pH metre, ISE au fost analizați pentru variate sisteme de analiză de către IUPAC [54, 55, 56].

### 3.4 Fenomene de transport

Specificitatea și selectivitatea sistemului considerat depind de componentul biologic receptor al biosenzorului și de afinitatea lui pentru analit. Afinitatea este o caracteristică specifică enzimelor, anti-bioticele și receptorilor fiind folosită în multe funcții din organismelor vii. Afinitatea se bazează pe cuplajul chimic dintre un component și partenerul său complementar. În cazul componentelor cu afinitate mare, procesul de difuzie este foarte rapid, conducînd la formarea complexului ca exemplu cel de tipul antigen-anticorp (figura 3.12).

Reacția de asociere specifică recunoașterii moleculare va fi caracterizată prin constanta ratei de reacție care în general este de ordinul întâi. În măsurătorile cu biosenzori este esențial să considerăm concentrația unui component constantă iar pe a celuilalt, variabilă. Cu această condiție, suma concentrațiilor anticorpilor liberi și a celor legați la echilibru va fi constantă și independentă de concentrația antigenului adăugat. O discuție de detaliu asupra cineticii antigen-anticorp se poate găsi în orice monografie de biochimie, cu particularitate pentru aplicații în biosenzori pot fi recomandate referințele [57, 58, 59, 60]

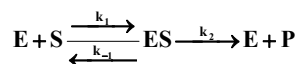
### 3.4.1 Cinetica Enzimelor

Adăugarea enzimelor în soluții conținând molecule de substrat este condiția esențială în reacțiile de cataliză a enzimelor. O discuție de detaliu asupra cineticii enzimelor și a mecanismelor enzimatică este practic imposibilă într-un paragraf. Mai mult extragerea informației necesare din știința enzimelor pentru a fi aplicate la dezvoltarea de senzori cum ar fi electrodul enzimatic este o sarcină extrem de dificilă.

Se va utiliza referințele [61,62] pentru a schița câteva din proprietățile enzimelor necesare descrierii senzorilor enzimatici.

Considerăm o reacție simplă, cu un singur substrat S, care se combină cu enzima E pentru a forma complexul intermediar enzimă – substrat, ES. Acest complex fiind instabil suferă o nouă reacție în urma căreia se obține produsul P.

Schematic aceste reacții se pot scrie:



unde:  $k_1$  -constanta ratei reacției de formare a complexului ES;  $k_{-1}$  -constanta vitezei de reacție de consumare (dispariție) a complexului;  $k_2$  -constanta vitezei de reacție de obținere a produsului P

Vitezele de formare și de consumare a complexului sunt egale. Imediat ce E și S intră în reacție, sistemul se dezechilibrează, concentrația complexului va fi zero și viteza de formare a complexului este cu mult mai mare decât viteza consumării lui. Pe măsură ce reacția se desfășoară, ES crește și implicit crește viteza dispariției complexului în raport cu rata formării lui. Se observă că, inițial excesul substratului determină consumul enzimei iar în timpul desfășurării reacției începe regenerarea constantă a enzimei ajungându-se la atingerea stării de echilibru.

Din analiza acestor reacții rezultă două concluzii importante :

- La o concentrație mică a substratului: rata reacției este proporțională cu concentrația substratului și invers proporțională cu constanta ratei reacțiilor de formare și de dispariție a complexului sau rata reacției de disociere în reactanții inițiali plus rata reacției de descompunere în produși.
- La o concentrație mare a substratului: viteza maximă este limitată de concentrația enzimei. Astfel cele două secvențe corespund celor două procese care pot controla viteza totală a reacției.

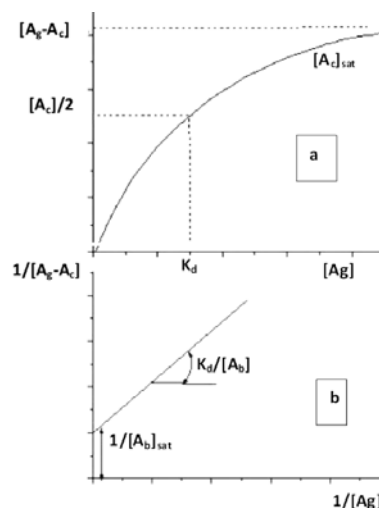


Figura 3.12- Cinetica interacției Ag-A<sub>c</sub>, reprezentare generală. [A-A] reprezintă concentrațiile reactanților. K<sub>d</sub>-constanta de reacție. a) Curba generală a răspunsului interacției funcție de concentrația de antigen A<sub>g</sub>. b) Reprezentarea în valori reciproce conduce la liniarizarea procesului și determinarea constantei de reacție (prelucrare după [53-56])

O detaliere asupra proprietăților și caracteristicilor catalitice a enzimelor precum și o sinteză asupra tehnicilor de imobilizare sunt prezentate în [56,57]

### **3.4.2 Fenomene de transport**

Cînd reacția are loc în soluții omogene, cu o viteză uniformă, aceeași în tot mediul, este necesar să considerăm modificarea în timp a concentrației componentilor. Dacă reacția se produce la suprafață, concentrația reactanților și produșilor prezintă modificări locale. Variația în funcție de distanță a concentrației este semnificativă la scară moleculară. Transportul de la regiuni cu concentrații mai mari spre cele cu concentrații mai mici este un factor important în controlul vitezei reacțiilor. Trei mecanisme ale transportului de masă au loc în soluție: difuzia, convecția, migrația .

#### *Difuzia*

Considerăm că moleculele din soluția studiată prezintă mișcare browniană suferind ciocniri cu solvenții. În acest caz, probabilitatea ca o moleculă să se miște într-o direcție va fi egală cu probabilitatea ca orice altă moleculă să se miște în altă direcție. Punînd condiția egalității probabilităților pentru fiecare moleculă, probabilitatea netă a mișcării globale a moleculelor dintr-un element de volum dat din soluție spre altul alăturat, este dependentă de numărul de molecule din fiecare element de volum al soluției. Rezultă că mișcarea speciilor chimice se face din regiunile cu concentrație mai mare spre cele cu concentrație mai mică cu o viteză dependentă de diferența de concentrație dintre cele două regiuni, ajungînd la echilibru cînd această diferență devine egală cu zero. Timpul necesar ajungerii sistemului la echilibru reprezintă timpul de răspuns și reprezintă un criteriu important pentru stabilirea performanței biosenzorului. Determinarea timpului de răspuns în funcție de membranele permeabile este necesară în operaționalizarea aplicațiilor biosenzorilor. Grosimea membranei trebuie să fie atent aleasă, astfel încît difuzia să conducă la sensibilitatea optimă și la cel mai stabil răspuns.

#### *Convecția*

Convecția se referă la mișcarea soluției în întregime sub acțiunea unor forțe mecanice externe. Cînd reacția se produce la suprafața membranei, convecția este folosită pentru sporirea vitezei transportului de masă, prin înlocuirea soluției în contact cu membrana cu alta nouă. Menținerea reacției la o viteză constantă este importantă pentru controlul difuziei și determinarea sensibilității. Vîscozitatea reprezintă mărimea fundamentală care controlează fluxul și ea reflectă rezistența soluției la mișcarea de alunecare reciprocă a straturilor. Această rezistență este descrisă formal de legea lui Newton. Pentru o forță dată, fiecare subsecvență a stratului de soluție se mișcă în raport cu secvența anterioară, astfel încît viteza soluției, în raport cu subsecvența staționară, crește constant cu creșterea distanței față de ea. Cînd reacția are loc la suprafața membranei și speciile sunt generate sau consumate, ele trebuie să difuzeze prin stratul staționar, numit strat de difuzie.

#### *Migrația*

Migrația se referă la mișcarea speciilor cu sarcina electrică într-un mediu în care există un gradient de potențial. În sistemele electrochimice, ea reprezintă mecanismul de menținere a echilibrului între sarcinile create și distruse de electronul de transfer, datorat curentului dintre cei doi electrozi. În orice caz, contribuția migrației la viteza globală a

transportului de masă, la generarea speciilor electrochimice, este ne semnificativă și nu prezintă prea mare importanță. De notat că literatura de specialitate surprinde foarte puține aspecte asupra modelării și simulării fenomenelor de transport și a reacțiilor chimice de interfață într-un biosenzor.[63]





## 4. Biosenzori electrochimici

Un *biosenzor electrochimic* este un dispozitiv integrat, autonom, capabil să furnizeze informații analitice cantitative sau semicantitative specifice folosind ca element de recunoaștere moleculară un *receptor biochimic* (element de identificare biologică), care se află în contact spațial direct cu un traductor electrochimic. Datorită abilității lor de a fi calibrați în mod repetitiv *un biosenzor electrochimic se distinge de un sistem bioanalitic* care necesită pași adiționali de procesare, ca de exemplu adiționarea de reactiv.

Biosenzorul disponibil pentru un singur tip de măsurătoare, sau incapabil să monitorizeze continuu concentrația sau să nu fie regenerat rapid și reproductibil este definit a fi de „unică folosință”. Din prezentările anterioare s-a arătat că biosenzorii sunt clasificați în funcție de specificitatea lor biologică – cu referire la mecanismul, sau la modul de interpretare a semnalului fizico-chimic (traductorul). Biosenzorii electrochimici se disting numai prin natura traductorului indiferent de natura componentei biologice conform cu clasificarea din tabelul 4.1 Elementul de recunoaștere biologică are la bază o reacție chimică catalizată sau o reacție de echilibru cu macromolecule ce au fost izolate în prealabil sau sintetizate în mediul lor biologic original. În cazul reacțiilor reversibile starea de echilibru poate fi în general atinsă dacă nu mai există un consum net de către agentul biocomplexului imobilizat și incorporat în senzor. Biosenzorii electrochimici pot fi clasificați în funcție de analizele și reacțiile pe care le monitorizează: monitorizare directă a concentrației analiților sau a reacțiilor producătoare sau consumatoare a acestora; alternativ, o monitorizare indirectă a inhibitorului sau activatorului elementului de recunoaștere biologică (receptorul biochimic). O proliferare rapidă a biosenzorilor electrochimici și a diversității lor a condus la o lipsă de rigoare în definirea criteriilor de performanță. Cu toate că fiecare biosenzor poate fi evaluat pentru o anumită aplicație, este util să se stabilească o serie de protocoale standard pentru stabilirea criteriilor de performanță conform normelor și criteriilor IUPAC [64]. Aceste criterii includ caracteristicile de etalonare (sensibilitate, domeniul de liniaritate și operațional al concentrației, limitele determinării cantitative și detecția specifică), selectivitate, starea de echilibru și timpul de răspuns, reproductibilitate, timp de viață, stabilitatea.

### 4.1 Senzori chimici vs senzorii biochimici

Un senzor chimic este un dispozitiv ce transformă informația chimică într-un semnal electronic sau fonic raportând concentrația unui compus specific identificat la proba analizată [65, 66]. Senzorii chimici de obicei conțin două componente de bază: un receptor = un sistem de recunoaștere chimică (moleculară) și un traductor fizico-chimic.

Senzorii biochimici (biochemosenzorii) sunt senzori chimici, în care metoda / sistemul de identificare utilizează un procedeu biochimic.

*Senzorii biochimici sau "biochemosenzorii" sunt dispozitive care introduse într-un mediu biologic, oferă la ieșire semnale electrice măsurabile ce caracterizează acest mediu. Aceștia pot avea la bază o serie de senzori chimici, cum ar fi electrozii pH, electrozii ionselectivi (EIS) etc. Modelul schematic este similar cu cele prezentate în figurile 2.1,*

2.2, 2.3. *Biochemosenzorii convenționali utilizează un electrod electrochimic, ca element de conversie a semnalului biochimic într-un semnal electric în timp ce tipurile mai noi utilizează traductori cum ar fi: fibrele optice, dispozitivele piezoelectrice, tranzistorii cu efect de câmp (FET), SAW (unde acustice de suprafață). Biochemosenzorii detectează, practic, specii electroactive produse sau consumate într-o reacție de orice tip.*

Toți biosenzorii sunt mai mult sau mai puțin selectivi (non-specifici) pentru un anumit analit, unii sunt prin construcție și concepere doar specifici pe o anumită clasă de analiți dacă folosesc clasa enzimelor (ex: biosenzori pentru detecția fenolului) sau celule (ex: în măsurarea consumului biologic de oxigen). Noțiunea de recunoaștere este deseori folosită în biosenzori sau în sistemele biosenzoriale prin asociere cu sistemele senzoriale ale corpului uman. Simțurile ca mirosul sau gustul, sunt alcătuite din sisteme ce conțin o celulă receptoare pentru identificare cuplate cu căi neurotransmițătoare de procesare pre-lucrare semnale.

Fenomene de acest tip au loc și în biochemosenzori dar la nivel mult simplificat față de complexitatea recunoașterii moleculare din sistemele vii. Exemple de semnale de transfer simple sau multiple sunt prezentate în tabelul 4.1. Aceste exemple se limitează la principalii biochemosenzori.

Pentru tipurile de receptori prezentați în tabela 4.1 se pot selecta diferiți electrozi și metode de măsură din tabela 4.2 pentru a forma un biosenzor electrochimic. Biosenzorii sunt clasificați după elementul de recunoaștere (tabela 4.1) sau după modul de transducție (tabela 4.2). De reținut că toți biosenzorii indiferent de tipul de clasificare trebuie tratați unitar ca un microsistem, elementul de recunoaștere biologică fiind în contact direct, intim, cu elementul traductor

*Tabela 4.1* Tipuri de receptori folosiți în biosenzori cuplați cu tehnici electrochimice de măsurare pentru recunoașterea specifică de specii. Cupluri receptori biologici- tehnica de măsură electrochimică sunt indicate prin litere boldate [67]

<b>Tipul de analit</b>	<b>Receptorul/ sistemul chimic /biochimic de recunoaștere</b>	<b>Tehnica de măsurare Natura traductorului</b>
1. Ioni	Oxizi metalici multivalenti Cristale anorganice cu conducție ionică, Ioni permselectivi Ionofori biologici Enzime Sticle schimbatoare de ioni	Potentiometric Voltametric
2. Gaze dizolvate, vapori și mirosuri	Strat dublu lipidic sau membrane hidrofobe ; Electrod de metal inert Enzime Anticorpi, receptori	Amperometric Amperometric și potențiomtric Amperometric, potentiometric sau de impedanță Piezoelectric, optic
3. Substrate	Enzime	Amperometric sau potențio-metric in serie cu 1 sau 2 metale Electrozi de carbon, Conductometric, Piezoelectric, optic, calorimetric
	Celulele Membrane receptor Tesuturi de animale sau de plante	<b>idem</b>
4. Anticorp/ Antigen	Antigene /anticorpi; Duplex de oligonucleotide, Aptamer  Enzime specifice indexate Indexări fluorescență, chemiluminiscentă	Amperometric, Potențiomtric Impedanțmetrie, Piezoelectric, optic, Rezonanța plasmonilor (SPR) Optic
5. Diferite proteine, substante cu greutate moleculara mica	Liganzi specifici proteine receptor Enzime specifice fluorescenti	Idem cu 4
*Pe lângă determinarea sub raport cantitativ a analiților, biosenzorii sunt folosiți și pentru a detecta și cuantifica micro-organismele: receptorii sunt bacterii, drojdiile sau oligonucleotide cuplate cu traductori electrochimici, piezoelectrice, optice sau calorimetrice.		

#### 4.2 Biosenzor electrochimic

Un biosenzor electrochimic este un biosenzor cu traductor electrochimic (tabela 4.2). *Este considerat a fi un electrod modificat chimic (CME), ca un conductor electric ce transmite electronii din procesul de interacție spre exterior în sistemul electronic de măsurare. Electrocul poate fi metal, semiconductor sau material cu conductivitate ionică acoperit cu un film biochimic sau bioactiv [68 ,69, 70].* Biosenzorul electrochimic este un microsistem integrat receptor - traductor, capabil să dea informații analitice selective, cantitative sau semicantitative folosind un element de identificare biologică. El poate fi folosit pentru a monitoriza atât elemente biologice cât și nebiologice. De notat că senzorii chimici care încorporează componente nebiologice ca receptor, deși este folosit la monitorizarea proceselor biologice (ex: pH sau senzorii de oxigen) nu sunt biosenzori. Totuși ei, de exemplu electrodul Clark, sunt de o importanță majoră în lanțul biosenzorial de măsură. Similar senzorii fizici utilizați în medii biologice cum ar fi cei ce măsoară presiunea arterială etc, nu sunt considerați biosenzori

Tabela 4.2 Tipuri de traductori electrochimici, tipul de măsurătoare și analitul corespunzător [62]

<b>Potențiomtric</b>	Electrod ion-selectiv (ISE);	K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , F <sup>-</sup>
	Electrod de sticlă	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> . . .
	Electrod gazos	CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
	Electrod metalic	Reacții redox
<b>Amperometric</b>	Electrod metalic Electrod-carbon Electrozi modificați chimic (CME),	O <sub>2</sub> , Zaharuri, alcoolii: zaharuri, alcoolii, fenoli, oligonucleotide
<b>Conductometric, Impedanțometric</b>	Electrozi tip pieptene Electrozi metalici	Uree, Oligonucleotide
<b>Tranzistori cu efect de câmp (FET)</b>	Tranzistor cu efect de câmp cu selectivitate ionică (ISFET) FET cu sensibilitate la Enzime (ENFET)	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> . . .
* Biosenzorii utilizează și alte tipuri de traductori non-electrochimici.: a) biosenzori piezoelectrics b) biosenzori-SAW, traductorul măsoară unde acustice de suprafață într-un circuit de rezonanță (shear and surface acoustic wave); c) biosenzori calorimetrici (elementul activ este cuplat cu un termistor sau cu un termocuplu); d) biosenzori optici, utilizează fenomene optice cum ar fi fibra optică și fenomenele de reflexie, refracție, interferență; biosenzori cu fluorescență, chemoluminescență, absorbția luminii e) biosenzori SPR ce folosesc interacția analit-receptor imobilizat pe un film metalic depus pe o prismă optică măsurând variația indicelui de refracție datorită modificărilor induse în sarcina electrică a metalului.		

#### 4.3. Clasificare

Biosenzorii electrochimici după terminologia stabilită în tabela 4.1 și 4.2 pot fi clasificați în funcție de *specificitatea lor biologică, după mecanism sau modul de transmite a semnalului* sau, alternativ, combinația acestora două. Ei pot fi: amperometrici, potențiometrici, cu efect de câmp (FET) sau senzori conductometrici (măsurarea conductivității

electrice) respectiv de impedanță (impedanțmetrici). Alternativ pot fi numiți de exemplu: senzor amperometric enzimatic [71] pentru a specifica natura receptorului și a traductorului. Primii biosenzori ce au fost studiați sunt cei enzimatici și imunosenzorii.

#### 4.4 Receptorul

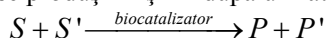
##### *Element de recunoaștere biocatalitic*

În acest caz, biosenzorul are la bază o reacție catalizată de biomacromolecule, prezente în mediul biologic original și care sunt izolate în prealabil sau sunt obținute pe cale sintetică. Reacția este monitorizată de un detector integrat (traductorul) ce măsoară stărilor staționare sau de tranziție ori produsul final de reacție prin intermediul biocatalizatorului imobilizat în biosenzor.

Tipuri de biocatalizatori frecvent utilizați:

1. Enzime (simple sau complexe enzimatiche)- cel mai des folosite ca sisteme de recunoaștere
2. Celule, microorganisme (ex: bacterii, fungi, celule eucariote sau drojdii), organele sau componente celulare (pereți celulari, mitocondrii)
3. Țesuturi (secțiuni din țesuturi de plante sau animale)

Biosenzorii cu elemente de recunoaștere cu biocatalizatori sunt cei mai cunoscuți și studiați, încă de la începutul abordării lor de Clark și Lyons . Unul sau mai mulți analiți, de obicei numite substraturi S și S', reacționează în prezența uneia sau mai multor enzime, celule etc, obținându-se produșii P și P' după următoarea schemă de reacție:



Există patru strategii prin care traductorul asociat poate monitoriza consumul de analit S prin reacția biocatalitică:

1. Detectarea consumului co-substratului S', ex: diminuarea oxigenului prin lanțul de reacții indus de oxidaze, bacterii sau drojdii. Semnalul măsurat reprezintă diminuarea consumului de co-substrat față de valoarea inițială.
2. Reciclarea produsului de reacție P cum ar fi: peroxihidrogen, H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>., în scheme de reducere prin oxidoreducăță, hidroliză, liază etc. Semnalul de la traductor se va amplifica.
3. Detecția centrilor activi din biocatalizator: redox, co-factori, grupuri prostetice ce evoluează în prezența substratului S prin folosirea unui mediator imobilizat. Acesta reacționează rapid cu biocatalizatorul și este ușor de detectat în lanțul de transducție. Diferiți derivați ferocenici, tetrathia-fulvalene, tetracianochinodimetan (TTF<sup>+</sup> TCNQ<sup>-</sup>), săruri organice, chinone, coloranți chinonici, complexe de Ru sau Os în matrici polimere pot fi folosiți ca mediatori.[72]
4. Transfer direct de electron dintre situsul activ al reacției redox enzimatică și traductorul electrochimic.

A-3-a strategie elimină, parțial sau total, dependența răspunsului senzorului de concentrația cosubstratului, S', descrește influența interferenței dintre specii. Aceasta se realizează printr-o viteză de reacție mai mare pentru cuplul mediator- biocatalizator imo-

bilizat pe substrat față de reacțiile cosubstrat- biocatalizator. O altă alternativă este restricționarea analitului să reacționeze localizat pe un film. În acest caz analitul difuzează restrictiv printr-o membrană a cărei permeabilitate favorizează transportul cosubstratului [73,74]. Utilizarea mediatorilor conduce la diminuarea concentrației substraturilor împreună cu lanțurile de reacții prin utilizarea unei membrane cores-punzătoare, a cărei permeabilitate să favorizeze transportul cosubstratului.

Cînd enzimele sunt imobilizate în cadrul acelorași lanțuri de reacție, se poate îmbunătăți performanța și abilitățile biosenzorului. Trei posibilități sunt frecvent folosite:

1. Unele enzime facilitează identificarea biologică prin convertirea secvențială a produșilor seriilor de reacții enzimatică într-o formă finală electroactivă: acest mod permite o plajă mai largă de analiză a biosenzorului [75]
2. Complexul enzimatic, aplicat în serie, poate regenera co-substratul primei enzime și amplifică semnalul de ieșire al biosenzorului prin regenerarea unui alt cosubstrat al primei enzime.
3. Complexul enzimatic, aplicat în paralel, îmbunătățește selectivitatea biosenzorului prin scăderea concentrației locale a substratului electrochimic de interferență: această secvență este o alternativă a utilizării unei membrane permselective sau a unei metode secvențiale (ex: interpretarea unui semnal de ieșire generat de un biosenzor și de un senzor de referință, fără a exista element de recunoaștere biologică).[76 ]

#### *Element de recunoaștere pe bază de biocomplexare sau de bioafinitate*

Operarea biosenzorului se bazează pe interacția dintre analit cu macromolecule sau cu ansamble moleculare organizate [77]. La atingerea echilibrului nu mai există consum de analit de către agentul de biocomplexare imobilizat în substrat. Răspunsul la reacția analit-agent de biocomplexare este monitorizat de un detector integrator. În unele cazuri reacția de biocomplexare se automonitorează printr-o reacție biocatalitică complementară. Detectorul integrator monitorizează stările staționare sau tranzitorii.

1. *Interacția anticorp-antigen* (detalii asupra interacției Ac-Ag sunt prezentate în secțiunea 3.2). Cele mai relevante exemple de biosenzori ce folosesc receptori de biocomplexare au la bază reacții imunochimice, ex: legarea unui antigen (Ag) cu anticorpul caracteristic (Ac). Complexele formate de Ac-Ag trebuie să fie detectate cu condiția ca celelalte reacții non-specifice să fie minimizate. Pentru fiecare determinare de Ag corespunde un anumit Ac ce trebuie produs izolat, purificat etc. Unele studii recente au analizat monitorizarea directă a formării complexului Ag-Ac utilizînd tranzistori cu efect de cîmp cu selectivitate ionică (ISFETs). Creșterea sensibilității senzorilor imunologici se realizează prin adăugarea de enzime specifice la cupluri Ag-Ac însă aceasta necesită pași adiționali de sinteză. Cum tăria legăturii sau constanta de afinitate variază în limite largi aceste sisteme operează ireversibil (biosenzor de unică folosință) sau dacă sunt cuplate în sisteme analitice de injecție a fluidelor (FIA) atunci Ac se poate regenera din disocierea complexului cu agenți cum ar fi glicin-HCl la pH 2.5

2. *Receptor: antagonist/agonist*. Recent s-au folosit ca sisteme de recunoaștere moleculară în analiza conductometrică, ISFET sau senzorii optici cu receptori cu canale ionice, membranari sau structuri proteice [78]. De exemplu, o proteină transportoare, lactoz- permeaza (LP), poate fi încorporată într-un bistrat lipozomic ce permite transportul protonic de glucid cu un raport stoichiometric de 1:1. Acest mecanism a fost identificat prin fluorescență dependentă de pH a unui fluorofor imobilizat în lipozomi [79]. Lipozomi cu LP au fost încorporați într-un bistrat lipidic depozitat pe un ISFET sensibil la pH. Rezultatele preliminare arată că acest ISFET modificat e capabil să detecteze ireversibil, lactoza dintr-un sistem FIA. Biosenzorul cu receptor proteic a fost descoperit de curând [80]. Legarea analiților, numiți aici agoniști, de proteine receptoare imobilizate este monitorizată prin schimbarea fluxului de ioni prin aceste canale. De exemplu, glutamatul, ca agonist, poate fi determinat în prezența altor agoniști ce pot interfera prin determinarea fluxurilor de  $\text{Na}^+$  sau  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizând metoda conductometrică sau electrozi ioni-selectivi. Datorită dependenței canalului ionic de natura legăturilor aceasta produce o independență de natura enzimelor pentru a se atinge sensibilitatea dorită.

Evoluția actuală de integrare a biochemosenzorilor pe cipuri a făcut din metodele electrochimice un instrument puternic de determinare și detectare a legării oligonucleotidelor și a indexării secvenței genetice (modulele de nanoelectrochimie ce dotează în prezent microscopia de forțe atomice). S-au abordat două metode. Prima se referă la intercalarea în duplexul de oligonucleotide, în timpul formării structurii dublu helix a ADN-ului a unei molecule care este electroactivă. A doua metodă este detecția directă a guaninei care este electroactivă.

În concluzie, deși cercetările au avansat rapid nu cunosc încă o dezvoltare similară cu cea a **biosenzorilor bazați pe biocatalizatori** unde cercetările au produs o largă cunoaștere a domeniului. Aceste tipuri având la bază monitorizarea reacțiilor de echilibru ce au un domeniu de liniaritate restrâns nu pot monitoriza continuu concentrația analiților. O parte din acești biosenzori nu pot opera prin intermediul unor membrane de separare analit - element sensibil. Stratul sensibil adeseori trebuie să fie în contact cu mediul biologic unde se află analiți.

#### **4.5 Moduri de transducție electrochimică**

##### *Amperometria*

Metoda amperometrică se bazează pe măsurarea curentului electric în procesele de reducere sau oxidare a speciilor electroactive. Metoda constă în menținerea unui potențial constant al electrodului de lucru (Au-, Pt-, C) în raport cu un electrod de referință, care poate servi și ca electrod auxiliar, și măsurarea curentului care este de ordinul  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  A.

Curentul electric este direct corelat cu concentrația speciei electroactive sau a vitezei de consum a substratului biocatalitic. Cum vitezele de reacție biocatalitice sunt ade-

sea alese pentru a fi de ordinul întâi la fel și curenții sunt de obicei proporționali cu concentrația analitului.

### *Potențiometrie*

Măsurătorile potențimetrice constau în determinarea diferenței de tensiune dintre doi electrozi (fie doi electrozi de referință sau unul de lucru –unul de referință) separați printr-o membrană permselectivă. Traductorul poate fi un electrod ion-selectiv (ISE), care este un senzor electrochimic ce are la bază un film subțire sau o membrană permselectivă ca element de recunoaștere [17, 81]. Cele mai cunoscute dispozitive potențimetrice sunt electrozii pH; însă și alți electrozi selectivi la ioni ca :  $F^-$ ,  $I^-$ ,  $CN^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ , sau gaze ( $CO_2$ ,  $NH_3$ ) pot fi folosiți.

Diferențele de potențial dintre indicator și electrodul de referință sunt proporționale cu logaritmul activității ionice sau fugacitatea gazului (sau concentrația), descrise de ecuația Nernst-Donnan. Acesta este doar cazul în care:

- Membrana sau stratul selectiv sunt infinite și concentrația altor ioni neglijabilă
- Diferențele de potențial la diferite suprafețe de separare a fazelor sunt fie constante, fie neglijabile, față de potențialul principal de măsură dintre membrană și soluția de analizat.

Pentru orice biosenzor cu substrat biocatalitic, acesta este adiacent cu detectorul potențimetric, trebuie luate în considerare următoarele etape:

1. Transportul substratului de analizat spre suprafața biosenzorului,
2. Difuzia analitului spre stratul de reacție,
3. Reacția analitului în prezența biocatalizatorului
4. Difuzia produsului de reacție înspre suprafața senzorului sau volumul soluției fie spre recirculare fie spre eliminare.

Răspunsul senzorului biocatalitic potențimetric descrie fie o stare cuasistaționară sau tranzitorie. Situația este mai complexă în cazul senzorilor imunoenzimatici cu toate că complexul Ac-Ag atinge o stare de echilibru prin reacțiile sale, reversibile sau ireversibile, activitatea enzimelor asociate complexului este măsurată prin consumul de analit în starea staționară.

Un alt aspect important al biosenzorilor cu ISE, este dependența mare a răspunsului lor de pH și de tăria ionică.

### *Detecția acumulării de sarcină superficială ( tranzistorii cu efect de câmp-FET)*

Este un principiu de transducție care determină concentrațiile ionilor prin metoda efectului de câmp indus de o sarcină superficială, al unui tranzistor care poartă aceeași denumire. ISFET – tranzistor cu efect de câmp ion selectiv este denumirea generală a acestei metode de transducție [82]. Principiul constă în controlul unui curent electric sub influența unui potențial aplicat direct pe un electrod-poartă. Când ISFET este cuplat cu un strat biocatalitic sau cu un biocomplex ei devin biosenzori și se numesc ori cu efect de câmp enzimatici (ENFET) sau imunologici (IMFET). Indiferent de cazul particular prin-



cipiul este același curentul dintre drenă și sursă este controlat de mărimea unui potențial electric (FET).

#### *Conductometrie, impedanțometrie*

Multe reacții ale enzimelor, ca de exemplu ureaza, și mulți receptori ce sunt membrane biologice pot fi monitorizate prin conductivitatea ionică sau prin variația impedanței utilizând microelectrozi interdigitali (pieptene intercalat) [83]. Sensibilitatea măsurătorilor este dependentă și de conductanța altor ioni din soluția de investigat. În această situație măsurătorile se realizează în montaje fie diferențiale sau în punte unde una dintre probe este senzorul cu enzima iar cealaltă este de referință fără enzimă.

#### **4.6 Analizi, reacții monitorizate.**

Biosenzorii se pot clasifica fie în funcție de analizi sau de reacțiile care le monitorizează. Între monitorizarea indirectă a inhibitorilor și monitorizarea directă a analizilor (sau a activității biologice) există o imensă diferență.

*Monitorizarea directă a analizilor sau a activității biologice cu consum sau producere de analizi.* Monitorizarea directă a analizilor sau, alternativ, a activității biologice, este indiscutabil cea mai mare aplicație a biosenzorilor. Trebuie să se țină seama de faptul că același biosenzor poate monitoriza activitatea enzimei sau a celulei vii, consumul sau producerea unui compus dat fie continuu sau secvențial

*Monitorizarea indirectă de inhibitor sau activator a receptorilor biochimici.*

Alternativ, biosenzorii au fost dezvoltați pentru monitorizarea indirectă a pesticidelor organice sau a unor compuși anorganici (metale grele, fluoruri, cianuri) [84, 85] substanțe ce inhibă proprietățile biocatalitice ale enzimelor folosite în construcția biosenzorilor. Oricum aceste dispozitive sunt de obicei ireversibile. De exemplu la imunosenzori activitatea biologică inițială se poate regenera doar prin tratament chimic și prin urmare nu fac parte din clasa biosenzorilor reconșionabili sau reutilizabili. Potențialul lor de aplicație este acela de avertizare și nu de monitorizare exactă a unui analit specific. Se recomandă ca aceștia să fie considerați de unică folosință. De exemplu, biosenzorul cu cianură ce folosește ca inhibitor citocromoxidaza care se regenerează prin spălare cu un tampon de fosfați la pH=6,3 [86].

#### **4.7 Construirea unui biosenzor electrochimic.**

##### *Imobilizarea receptorilor biologici*

Încă de la începutul cercetărilor în acest domeniu, odată cu realizarea senzorului enzimatic pentru glucoză, prima descriere aparține lui Clark și Lyons în 1962, experiment în care glucozoxidaza este imobilizată între două membrane, a apărut o bogată literatură asupra tehnicilor de imobilizare a receptorilor biologici. Enzimele, anticorpii, celule sau țesuturi cu activitate biologică mare, pot fi imobilizați într-un film subțire pe suprafața unui transductor prin variate metode [59, 61, 87, 88, 89, 90, 91, 92]. Următoarele proceduri de imobilizare ale receptorilor biologici sunt cele mai des folosite:

1. Imobilizarea pe membrană pe suprafață neexpusă la analit: o soluție enzimatică, o suspensie de celule sau de țesut se confinează între membrana permeabilă la analit și electrodul de măsură (detectorul electrochimic)
2. Reținerea receptorilor biologici într-o matrice polimerică, ca de ex: poli-acrilonitril, gel agar, poliuretanic (PU) sau alcool polivinilic (APV), hidrogeluri redox cu centrul redox ca de exemplu  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$  [93]
3. Reținerea receptorilor biologici între straturi autoasamblabile (SAM) sau în membrane din stratul dublu lipidic (BLM).
4. Legarea covalentă a receptorilor de suprafața membranelor prin intermediul grupărilor bifuncționale: glutaraldehide, carbodiimide, SAMs, avidin-biotin silanizate.
5. Modificarea structurii întregului electrod (ex: pasta de carbon modificată cu enzime sau grafit în rășini epoxi [94].)

Receptorii sunt modificați fie singuri fie în amestec cu alte proteine, ca de exemplu albumina serică bovină (BSA), fie direct pe suprafața traductorului fie în membrana de polimer. De curând, membranele preactivate pot fi folosite direct pentru imobilizarea enzimelor sau anticorpilor, fără modificări chimice.

Legarea covalentă și reticularea sunt mult mai dificile față de imobilizarea sau reținerea receptorilor pe membrană. În cazul structurilor microsenzoriale unde membrana este direct depusă pe traductor atunci legarea covalentă este mai sigură și stabilă.

#### *Membrane interne și membrane externe*

Pe lângă straturile de reacție sau membranele cu receptorii imobilizați mulți biosenzori, în special cei destinați aplicațiilor clinice sau biologice, încorporează una sau mai multe membrane auxiliare de separare interne sau externe cu trei funcțiuni importante:

1. *Barieră de protecție.* Membrana exterioară previne interferența sau intrarea în straturile de reacție a unor molecule mari (ca de ex: proteine sau celule), în același timp reduce trecerea componentelor din straturile de reacție în soluția de analizat. Aceste funcțiuni sunt foarte importante, de exemplu, pentru un senzor de glucoză implantat, eliminarea de glucoz-oxidază care nu este de origine umană poate cauza reacții imunologice. O membrană se alege pentru a conferi o permselectivitate specifică care să reducă interferențele cu alte specii în răspunsul biosenzorilor. De exemplu biosenzorii pentru glucoză *in vivo* sau *ex vivo* posedă o membrană de acetat de celuloză încărcată negativ pentru a descrește efectele de interferență cu ascorbatul sau ureatul care sunt electrochimic detectate împreună cu apa oxigenată generată enzimatic
2. *Barieră exterioară de difuzie pentru substrat.* În cazul enzimelor acestea au o cinetică ce urmează modelul Michaelis-Menten [95]. Vitezele de reacție enzimatică sunt neliniare cu concentrația. Domeniul de liniaritate dinamică poate fi larg dacă răspunsul biosenzorului este controlat de difuzia substratului prin membrană și nu de cinetica enzimei. Acest control se realizează prin implantarea unei membrane exterioare subțiri peste o enzimă cu acti-

vitare mare: cu cât este mai subțire membrana cu atât este mai scurt în timp răspunsul biosenzorului. Mai mult, bariera de difuzie exterioară induce pentru răspunsul biosenzorului o independență față de enzimele active și îmbunătățesc stabilitatea.[67,68]

3. *Suprafețe biocompatibile.* Biosenzorii sunt supuși la două seturi de modificări când sunt în contact direct cu țesuturile organice fluide sau implantate in vivo, de regulă în matrici biologice active, sau în medii de cultură:
  - Modificări ale probei biologice gazdă cauzate de reacțiile induse de biosenzor d.p.d.v a toxicității, imunogeneticii, carcinogeneticii, trombogeneticii, mutageneticii etc.
  - Modificarea proprietăților de operare ale biosenzorului de către componentele probei biologice sau de structura ei: pasivizarea suprafeței de la electrod.

Alegerea unui strat extern de protecție biocompatibil este esențial pentru stabilitatea răspunsului după implantare pentru traductorii de recunoaștere moleculară care cer un contact direct dintre probă și receptorul biologic. Toate aceste tipuri de membrane și straturi protectoare depind de diametrul senzorului iar funcție de caz se pot utiliza materiale polimerice depuse prin dip- sau spincoating (acetat de celuloză, Nafion, poliuretanic, collagen, policarbonat). Microbiosenzorii sunt de obicei realizați prin traparea enzimei printr-un proces de electropolimerizare.

*Dacă implantarea biosenzorului nu afectează funcționarea normală a mediului gazdă și invers dacă mediul gazdă nu influențează operațiile normale ale biosenzorului, atunci biosenzorul este considerat biocompatibil.*

#### **4.8 Criterii de performanță**

Pentru orice senzor construit pe principiul recunoașterii moleculare [75] este important de a-l caracteriza prin răspunsul său care este legat de parametrii de operare și de vitezele reacțiilor limitative. Precizia, acuratețea, sensibilitatea, reproductibilitatea sunt criterii de bază în estimarea performanțelor biosenzorilor [65,75]. Acești parametrii sunt în directă relație cu mecanismele de reacție, fenomenele de transport și cinetica proceselor din volum respectiv la interfață.

Cele mai multe criterii au fost elaborate pentru biosenzorii enzimatici, ei fiind și cei mai studiați în literatura de specialitate. În cazul *imunosenzorilor* elementul cheie este *capacitatea de captură* a suprafeței adică numărul de molecule de pe suprafață care sunt active. O metodă de verificare a acestui parametru este măsurarea activității specifice adică raportul dintre numărul de molecule active la numărul de molecule imobilizate.

Această estimare este dependentă de modul de imobilizare (orientarea moleculară, numărul de puncte de atașare sau situri active) iar raportul se situează între limite 0.15-0.3, foarte rar atingând unitatea.

Capacitatea de captură devine importantă când suprafața se micșorează ca în aplicații de microfluidică. O altă problemă înfîlțită la imunosenzori este aceea a regenerării suprafeței fără pierderea semnificativă a activității.

Oricum rapida proliferarea a biosenzorilor și a diversității lor a condus la o lipsă de rigurozitate în criteriile de performanță. Cu toate că fiecare senzor poate fi evaluat pentru aplicația lui particulară este util să se stabilească protocoale standard pentru evaluarea criteriilor de performanță în conformitate cu standardul și definițiile IUPAC [65]. Patru seturi de parametrii sunt descriși în cele ce urmează ca fiind cazuri particulare a criteriilor generale prezentate în secțiunea 3.1.

*Calibrarea sau etalonarea* biosenzorilor electrochimici este realizată în general prin adăugarea de soluții standard de analit și ridicarea graficului de răspuns în regim staționar,  $R_{ss}$  (steady-state response) funcție de concentrația analitului,  $c$ , sau de logaritmul,  $\log\left(\frac{c}{c^0}\right)$ , unde  $c^0$ , reprezintă o concentrație de referință. Semnalul de răspuns,

$R_{ss}$  este corectat în raport cu zgomotul de fond  $R_{bl}$  (background).  $c^0$ , concentrația de referință este de regulă estimată în mol/l deși această valoare mare nu este utilizată niciodată atunci când domeniile de măsură se raportează la 1-10 mmol/l iar în prezent s-au atins sensibilități de ordinul nmol/l și pmol/l.

*Răspunsul în regim tranzitoriu* este important pentru analiza probelor în regim dinamic și în tehnicile de eșantionare însă este mai puțin semnificativ în monitorizarea continuă. Răspunsul tranzitoriu este estimat prin panta  $(dR/dt)_{max}$  după adăugarea de analit în celula de măsură. O metodă de evaluare este de a introduce senzorul într-un sistem FIA pentru analiza secvențială de probe într-un regim hidrodinamic precizat.

*Sensibilitatea și domeniul liniar de măsură a concentrației în regim staționar* sunt determinate din reprezentare grafică:

$$\frac{R_{ss} - R_{bl}}{c} \text{ versus } \log \frac{c}{c^0}$$

sau

$$\frac{R_{ss} - R_{bl}}{\log \frac{c}{c^0}} \text{ versus } \log \frac{c}{c^0}$$

Această metodă este mult mai concisă decât curbele de calibrare curent utilizate de plotare a răspunsului corectat la linia de bază funcție de concentrație sau logaritmul ei. În același mod se determină și răspunsul în regim tranzitoriu prin:

$$\frac{\left(\frac{dR}{dt}\right)_{max}}{c} \text{ sau } \frac{\left(\frac{dR}{dt}\right)_{max}}{\log \frac{c}{c^0}} \text{ versus } \log \frac{c}{c^0}$$

În toate cazurile parametrii se estimează în domeniul de răspuns liniar al biosenzorului. Orice biosenzor electrochimic are o limită superioară de liniaritate a răspunsului.

Această limită este direct legată de proprietățile biocatalitice sau de biocomplexare a receptorului biochimic sau biologic. Mai mult în cazul biosenzorilor cu enzime această limită este semnificativ influențată de membranele și de substraturile de imobilizare unde barierele de difuzie și cinetice secundare au un rol important.

Concentrația locală a analitului în stratul de reacție poate fi cu două ordine de mărime mai mic decât în volumul soluției. Cinetica enzimatică fiind descrisă de mecanismele Michaelis –Menten și exprimată prin parametrii  $K_M$  și  $V_M$ , biosenzorii sunt adesea caracterizați prin parametrii aparenti  $K_M$  și  $(R_{ss}-R_{bl})$ :  $K_M$  reprezintă concentrația analitului la valoarea lui  $(R_{ss}-R_{bl})_{max}/2$  din curba de răspuns,  $V_M$ , viteza maximă de reacție [23,24,48,96]. Când valoarea aparentă  $K_M$  este mare raportată la activitatea enzimei în fază de soluție ( enzime solubile) atunci există o barieră de difuzie dintre probă și stratul de reacție cu enzima imobilizată sau rata de reacție a cosubstratului cu enzima este mare. De reținut că pentru cinetica enzimei în fază de soluție,  $K_M$ , este uzual determinat din reprezentarea grafică de tipul Lineweaver-Burk [96]:

$$\frac{1}{R_{ss} - R_{bl}} \text{ vs } \frac{1}{c}$$

Pentru orice biosenzor electrochimic trebuie stabilite *numărul de standarde utilizate și cum matricea de probe standard poate fi simulată sau duplicată*, ele fiind necesare pentru a specifica procedurile pentru fiecare tip de senzor legat de aplicația sa. Acestea sunt de importanță specială pentru cazul senzorilor de unică folosință ce utilizează imunoafinitatea sau reacțiile de inhibiție.

*Sensibilitatea* este panta curbei  $R_{ss} - R_{bl}$  vs  $c$  sau  $\log \frac{c}{c^0}$  și nu trebuie confundată cu limita de detecție (LOD) cuantificată în raport cu linia de bază sau cu semnalele de zgomot. Domeniul de concentrații de lucru este determinat de limitele de detecție inferioare respectiv superioare.

#### *Selectivitatea, siguranța în exploatare*

Selectivitatea și siguranța sunt determinate ca pentru orice tip de senzor amperometric sau potențiomtric [97, 98]. Ele depind de alegerea receptorului și a traductorului.

Cele mai multe enzime sunt specifice dar sunt și clase de enzime nonselective, cum ar fi, alcooloxidaze, grupul de zaharuri oxidaze, peroxidaze, lactaze, tirosinaze, ceruloplasmin, alcooldehidrogenaze, glucozdehidrogenaze, NADH-dehidrogenaze etc.

Ele au fost folosite pentru dezvoltarea de biosenzori pentru determinarea fenolilor din mediu [99, 100] sau în monitorizarea calității alimentelor. Bacteriile, drojdiile, culturile de celule sunt în mod natural nonspecifice. Pe de altă parte electrozii de oxigen, electrozii pH, ISFET-urile prezintă o selectivitate specifică pronunțată la fel și electrozii metalici care sunt sensibili la numeroase substanțe. Selectivitatea proprie poate fi modificată când acești traductori sunt asociați cu receptorii. De exemplu ENFET este pH senzitiv la soluția tampon și la protonare dar selectivitatea sa nu este modificată.

Când traductorul interferează cu alte substanțe cunoscute ca ascorbat sau urați la senzorul de glucoză bazat pe detecția peroxidului de hidrogen aceste efecte secundare pot fi restricționate prin utilizarea de membrane permselective exterioarea sau interioare.

Alternativ, se concep senzori cu și fără receptori biologici ce funcționează prin compensare - senzori diferențiali. Tipuri de senzori diferențiali sunt dezvoltați pe principiul ISFET sau ENFET. Există diferite proceduri de determinare a selectivității biosenzorului dar două sunt recomandate de normele IUPAC.

Prima constă în evaluarea răspunsului biosenzorului prin adăugarea de substanțe ce produc posibile interferențe. În acest caz se compară curba de calibrare a analitului în condiții identice de măsură. Selectivitatea se exprimă ca raportul dintre semnalele pentru analit și analit cu substanțele de interferență. A doua procedură constă în adăugarea de substanțe de interferență într-o celulă dată ce conține o concentrație de analit cunoscută.

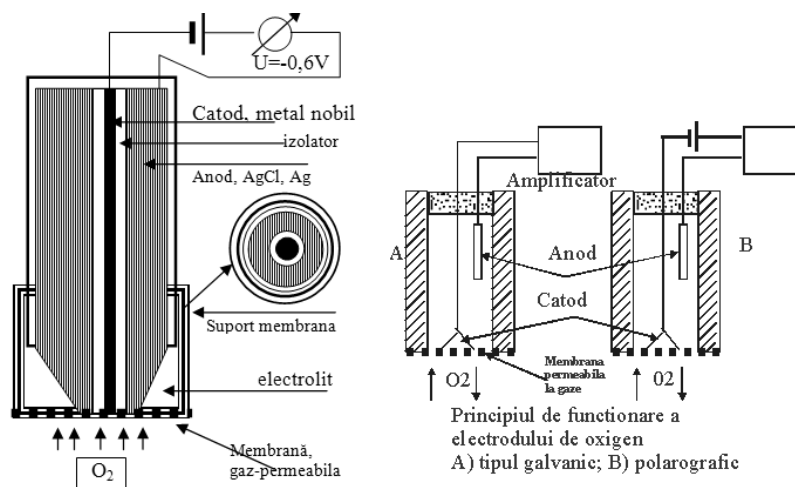
Selectivitatea este exprimată ca procentul de abatere față de curba de calibrare a analitului. Această metodă depinde de concentrația analitului. Siguranța în exploatare a senzorului depinde de selectivitatea și reproductibilitatea și de acuratețea măsurărilor.

## **4.9 Exemple de biosenzori electrochimici**

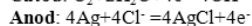
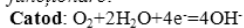
### **4.9.1 Electrocul Clark, aplicații în medicină**

#### **Principiul de construcție**

Clark a studiat electrochimic oxigenul ca un gaz reducător și platina ca un electod de metal. Platina folosită pentru detectarea oxigenului electrochimic, este recunoscută sub denumirea de " electodul Clark ". Electrocul are o membrană organică care acoperă stratul de electrolit și doi electrozi metalici. Oxigenul difuzează prin membrana și este redus electrochimic la catod. Între catod și anod se aplică o tensiune fixă, pentru care reacția de reducere a oxigenului are loc. Temperatura influențează mult viteza de reacție și solubilitatea (figura 4.1A). Acesta este un *electod polarografic* utilizat pentru măsurarea concentrației oxigenului în lichidele corpului sau în gaze. Moștra sau eșantionul de măsurat este în contact cu o membrană (polipropilenă sau teflon ) prin care oxigenul difuzează într-o cameră de măsură conținând soluție de clorură de potasiu saturată 50%. În cameră sunt doi electrozi, unul este de referință, Ag/AgCl și altul este de platină, îmbrăcat în sticlă. Curentul electric la potențialul de polarizare de - 600 mV, este proporțional cu concentrația oxigenului în soluție. Pentru polarizare inversă la +600mV se pot realiza măsurători pentru hidrogen. Reacțiile sunt foarte sensibile la temperatură și trebuie menținută la valori de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Electrocul este calibrat utilizând un amestec din cele două gaze –oxigen și hidrogen- de concentrație cunoscută. Astfel electrocul de oxigen sau electrocul Clark s-a dovedit a fi un analizor al gazelor din sânge atunci când efectuăm analize de chimie în laboratorul clinic și în general în aria îngrijirilor medicale, regim ambulatoriu sau de terapie intensivă. Clark a avut ingenioasa idee de a plasa pe suprafața electrocului de platină o enzimă care reacționează cu oxigenul. Enzimele sunt plasate într-o membrană închisă la suprafață, care poate fi recunoscut ca cel mai simplu model de biosenzor. Curba măsurătorilor concentrației de oxigen a fost proporțională cu concentrația glucozei. Acesta a fost primul biosenzor construit, care a ajutat mult la progresul analizelor de laborator. Pentru scopuri medicale detaliem câteva din etapele funcționării acestui tip de electrod. Oxigenul difuzează prin membrană și este redus electrochimic la catod. Cu cât este mai mare presiunea parțială a oxigenului, cu atât difuzează mai mult oxigen la un moment dat. Senzorii de temperatură atașați probei permit compensarea pentru membrană a vitezei de difuzie și solubilitate. Instrumentele de măsură înregistrează: curentul catodului, temperatura probei, temperatura membranei, presiunea barometrică, salinitatea. Cu aceste informații se poate calcula oxigenul conținut în probă, fie în părți per milion (ppm), sau în procente ale saturației în oxigen. Configurația geometrică a electrocului Clark, are o mare importanță. În particular, grosimea stratului electrochimic dintre catod și membrana trebuie să aibă o anumită limită, pentru a asigura liniaritatea și micșorarea driftului de curent.



Reacții generale a modului polarografic de funcționare:



**Figura 4.1-**Electrod Clark, principiu de construcție și moduri de operare galvanic (A) respectiv polarografic (B)

Calibrarea unui sistem polarografic este de strictă necesitate. În primul rând trebuie asigurată proporționalitatea dintre curent și concentrația de oxigen, cu erori sub 1% (Pentru probele biologice rolul și parametrii aerului sunt esențiale. Aerul, privit ca un amestec de gaze ce are un procent constant de oxigen, aproximativ 20,9%, când intră în contact cu apa, cantitatea dizolvată depinde de mai mulți factori: timpul optim pentru dizolvarea oxigenului, omogenitatea soluției de apă, temperatura apei, presiunea aerului, sărurile conținute în apă, alte substanțe dizolvate în apă, care sunt consumatoare de oxigen). Oxigenul conținut în apă este determinant pentru procesele biologice și chimice, de aceea măsurarea oxigenului dizolvat în apă este foarte importantă Pentru a găsi presiunea parțială a oxigenului dizolvat, el trebuie să fie saturat în apă pură la o anumită temperatură.

### Considerații practice

1. **Agitarea:** consumarea oxigenului de către proba de investigat poate cauza scăderea concentrației de oxigen la stratul de graniță dintre membrană și probă. Aceasta necesită agitarea continuă.
2. **Membranele:** se folosesc două tipuri de membrane; membrane libere, neasamblate și membrane de acoperire sau capsule. Membranele libere sunt mai ieftine, dar există dificultăți de instalare și rezultatele nu sunt repro-ductibile. Grosimea membranei determină cât de gros trebuie să fie stratul de electrolit adiacent catodului, aceasta afectând timpul de răspuns al probei. Precizia



fabricării membranei dă o grosime de electrolit cât mai reproductibilă, accelerând astfel timpul de măsurare și elimină problemele de asamblare.

3. **Electrolitul:** electrolitul în orice tip de electrod de oxigen Clark trebuie să fie schimbat periodic, altfel se pierde capacitatea de reducere a oxigenului. Timpul de menținere a electrolitului depinde de rata cu care oxigenul este redus.
4. **Calibrarea:** aer saturat cu apă. În condiții de echilibru presiunea oxigenului în apa saturată cu aer este egală cu presiunea parțială a aerului saturat cu apă, adică la o umiditate relativă de 100%. Electrocul măsoară valoarea maximă a presiunii parțiale de oxigen. Deoarece difuzia oxigenului în apă și aer sunt diferite, se aplică un factor de corecție la calibrarea apei saturate cu aer pentru a obține o valoare corectă. Când se măsoară concentrații scăzute (sub 2 ppm) este necesar un al doilea punct de calibrare, punctul pentru standard de oxigen. La concentrația de 0 oxigen (prin adăugare de sulfat de sodiu) curentul prin electrocul Clark este 0, acesta constituie al doilea punct de referință.

Aplicații ale electrocului Clark sunt la măsurarea oxigenului dizolvat: tratamentul apelor uzate, producerea vinului, bioreacții, monitorizarea apei din mediu

#### 4.9.2 Electrocul enzimatic

Electrocul enzimatic (în unele referințe cunoscut ca electrocul enzimă) este o combinație dintre o sondă electrochimică de orice tip (amperometric, potențiomtric sau conductimetric) cu un strat subțire (10-200 microni) de enzimă immobilizată. În aceste dispozitive funcția enzimei este de a furniza selectivitatea în virtutea afinității sale biologice pentru un substrat de molecule (figura 4.2). De exemplu o enzimă este capabilă de a cataliza o reacție a unui substrat dat pentru un izomer specific dintr-o mulțime de substraturi cu diverși izomeri. Tipic gradul de avansare a unei reacții enzimatice (direct legată de concentrația analitului) este monitorizat prin viteza de formare a produsului sau dispariția unui reactant. Dacă produsul sau reactantul este electroactiv atunci răspunsul poate fi monitorizat direct prin amperometrie adică variația curentului pentru un potențial aplicat dat. Metoda finală de analiză folosită va depinde în cele din urmă de proprietățile specifice ale enzimei.

Principalele considerații sunt:

1. Conține enzima grupuri redox active ?
2. Sunt electroactivi produșii reacției biochimice ?
3. Este electroactiv unul din substraturi sau cofactorii?
4. Care este viteza și timpul de răspuns?
5. Care este aplicația finală a senzorului

Răspunsul la primele trei criterii va depinde în mare parte de sistemul supus investigației. Răspunsul la ultimele chestiuni este dependent de cerințele aplicațiilor specifice.

Dacă enzima nu conține grupări redox atunci biosenzorul se rezumă la a măsura produșii sau consumul substratului prin reacția lor la electrocul de transducție. Curentul electric este direct legat de concentrația analitului.

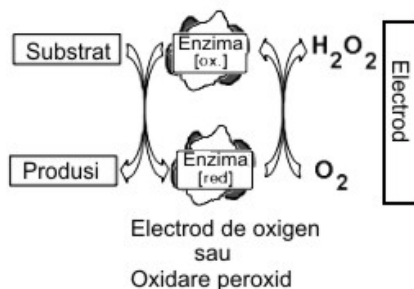


Figura 4.2- Principiul de funcționare a electro-  
dului enzimă, fără mediatori

### **Biosenzori bazați pe răspunsul electrochimic datorat $H_2O_2$**

Cele mai multe enzime comune folosite în designul de electrozi enzimă sunt celea ce conțin grupări redox ce își schimbă starea redox în timpul reacției biochimice. Enzimele redox sunt oxidazele și dehidrogenazele, pirolochinolin-chinonele (PQQ). Ele acționează prin oxidarea substratului acceptând electroni în timpul procesului iar în continuare se transformă în stare redusă. Aceste enzime revin în starea activă oxidată prin transferarea electronilor spre molecula de oxigen rezultând apa oxigenată, ( $H_2O_2$ ). Atît oxigenul cît și peroxidul fiind electrochimic activi, atunci ei continuă prin reducerea la cosubstrat (oxigenul) sau oxidarea peroxidului (produs de reacție). Metoda bazată pe reducerea oxigenului la electrodul de  $O_2$  este una din cele mai simple metode dar suferă de cîteva dezavantaje și anume- răspuns lent, dificultăți în miniaturizare, acuratețe și reproductibilitate scăzută. Măsurătorile asupra oxidării peroxidului surmontează dificultățile de mai sus și în prezent este cea mai populară metodă [101].

### **Sisteme cu mediatori**

O limitare majoră a sistemului de măsură cu apă oxigenată descris mai sus îl constituie potențialul de operare mare (circa 0,8V față de electrodul de referință Ag/AgCl) necesar pentru oxidarea peroxidului ceea ce conduce la creșterea interferențelor. Utilizarea mediatorilor (molecule care pot transporta electroni între centrul redox al enzimei și electrod) pot minimaliza acest inconvenient (figura 4.3)

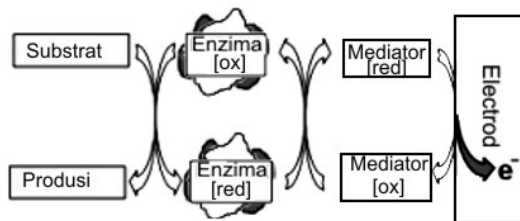


Figura 4.3- Electrod enzimatic cu mediatori. Mecanismul de intermediere a transferului de electroni de către mediatori de la enzimă la electrod

Depinzînd de natura mediatorilor potențialul aplicat poate fi redus sub limita interferențelor unor specii cum ar fi ascorbat, ureat și paracetamol. Un vast număr de compuși sunt capabili de a acționa ca mediatori în electrodul enzimatic. Dintre aceștia cei mai populari sunt complecșii metalici. Reprezentanți pentru complecșii organometalici sunt feroceni și derivații lor deoarece au o largă plajă de potențiale redox, sunt independente de pH iar schemele sintetice sunt directe fără complicații. O serie de alți mediatori prezentați în figura 4.4 au fost intensiv studiați în literatura de specialitate. Compilarea a o serie de articole de sinteză din revistele Biosensors B, Biosensors & Bioelectronics (Elsevier 1996-2004) arată ponderea tipurilor de mediatorii utilizați în biosenzorii cu enzime (procentele din figura 4.4 reprezintă ponderea apariției tipului de mediator pentru 135 articole consultate).

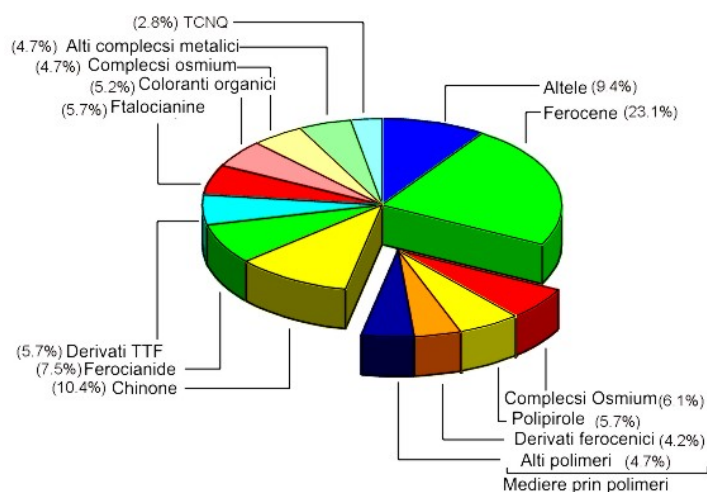


Figura 4.4- Tipuri de mediatorii utilizați în electrozii enzimă

### **Sisteme bi-enzimaticice**

Lucrări recente s-au focalizat pe comunicarea directă a transferului de electroni dintre enzime și electrozi. Succesele în domeniu sunt limitate la enzima peroxidază HRP (horse redish peroxidaza) care catalizează reducerea peroxidului de hidrogen pentru un număr de compuși organici. Când enzima este imobilizată pe electrod, necesarul de reductoare organic este prevenit de electrodul însăși care furnizează echivalenții reductoare.

Cuplarea peroxidazei cu o enzimă –oxidază permite construcția de sisteme bienzimaticice prin care peroxidul produs de oxidază este detectat de sistemul electrod-peroxidază care operează la potențiale mult mai mici în raport cu un electrod simplu de platină.(figura 4.5) De aici rezultă și minimalizarea interferențelor speciilor active.

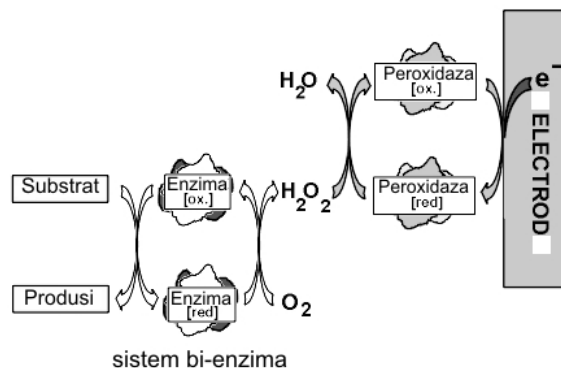


Figura 4.5 – Sisteme de senzori bi-enzimatici

### ***Mecanisme implicate în senzorul amperometric enzimatic***

Amperometria, ramură a electrochimiei, care se ocupă de fenomenele de reducere (adiție de electroni) și oxidare (eliminarea electroni), e.g fenomene redox, prin măsurarea curentului electric la potențiale constante. În teorie orice ansamblu de atomi poate fi oxidat sau redus dacă se furnizează suficientă energie. În general domeniul de energie necesar pentru procesele redox este limitat de condițiile experimentale. Moleculele ce pot fi ușor oxidate sau reduse se numesc electroactive iar potențialele la care acestea au loc se numesc potențiale redox. Oxidarea sau reducerea implică un transport de sarcină deci apare un curent electric și cum totul are loc într-o celulă electrochimică sub un potențial aplicat între electrodul de lucru și unul de referință, acesta se numește adeseori „curent Faradeic”.

Curentul Faradeic este direct proporțional cu concentrația analitului electroactiv. Transferul de sarcină ce apare în celula electrochimică este descris de ecuația generală:



unde  $n$  este numărul de electroni ( $e$ ) transferați de la oxidantul  $O$  la reducătorul  $R$ . Este un proces reversibil simplu care are loc la interfața dintre electrod (sursa de electroni) și mediul ionic conductor ce conține speciile electroactive de analit.

Curentul măsurat ( $I$ ) în timpul electrolizei este o măsură directă a ratei reacției electrochimice ce are loc la electrod:

$$I = nF \frac{dN}{dt} \quad 4.2$$

unde  $dN/dt$  reprezintă viteza de reacție la electrod (de oxidarea sau reducerea), [mol/sec],  $N$  numărul de moli,  $F$ -constanta Faraday (96,845 C/mol)

Viteza reacției la electrod este direct proporțională cu fluxul de molecule spre electrod,  $J$  (mol/sm<sup>2</sup>) și aria acestuia,  $A$ :

$$\frac{dN}{dt} = AJ \quad 4.3$$

Combinând ecuațiile 4.2 și 4.3 se obține ecuația fundamentală a tuturor proceselor implicate într-un biosenzor amperometric:

$$I = nFAJ \quad 4.4$$

Fenomene de difuzie:

Datorită naturii heterogene a proceselor viteza de reacție depinde atât de rata de transfer de electroni la interfață și de transportul de masă de analit la electrod din volumul soluției. Pentru un biosenzor amperometric, dealtfel pentru orice proces electrochimic, este necesar să se cunoască modul de transport al analitului ca specie electroactivă la suprafața electrodului. Două procese sunt importante: difuzia și convecția. Difuzia este fenomenul de transport al moleculelor dintr-un spațiu cu concentrație mare spre unul cu concentrație mică. Este o consecință a mișcării perpetue a moleculelor și a echilibrării potențialelor chimice. Fenomenul de difuzie are un rol important în procesele care stau la baza funcționării senzorului amperometric. Dacă considerăm relația (4.4) observăm că transportul de substanță electroactivă conduce la concentrarea analitului spre electrod.

Inițial concentrația de O era uniformă în tot volumul soluției. Când curentul trece prin soluție concentrația de O la suprafața electrodului devine mai mică față de volumul soluției datorită conversiei acestuia într-o formă redusă R. În acest context apare un flux suplimentar spre electrod dinspre soluție iar acest fenomen de difuzie este descris de prima lege a lui Fick:

$$J(x,t) = D_o \frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x} \quad 4.5$$

unde  $D_o$  este coeficientul de difuzie a oxidantului iar  $c_o$  concentrația acestuia în volumul soluției, x-direcția de transport spre electrod iar t-timpul, J-densitatea de flux de substanță electroactivă (O), adică numărul de moli de substanță transportați în unitatea de timp pe unitatea de suprafață.

Curentul care trece prin biosenzor este dependent de fluxul de material spre electrod adică prin introducerea ecuației 4.5 în 4.4 obținem:

$$I = nFAJ(0,t) = nFAD_o \frac{\partial c_o(0,t)}{\partial x} \quad 4.6$$

### Stratul de difuzie Nernst:

Una dintre cele mai simple căi de a înțelege efectele dependente de timp asupra curentului electric ce trece prin electrod o constituie dezvoltarea conceptului de strat de difuzie introdus de Nernst (1904). Când un electrod este polarizat la interfața sa cu fluidul au loc reacții de oxidare sau reducere care reduc la zero concentrația analitului. Pentru a compensa scăderea de concentrație are loc difuzia analitului din volumul soluției spre electrod. La echilibru dintre viteza cu care se consumă speciile la electrod și difuzia acestora din volumul soluției se stabilește un profil specific al concentrației funcție de distanța de la electrod (figura 4.6). Pe figură se observă câteva puncte cheie. Electrodul, bara neagră, este situat în partea stângă a figurii. Axa x este orientată dinspre electrod spre volumul soluției cu originea pe suprafața electrodului. Pe axa y este reprezentată concentrația analitului din soluție. Observăm două regiuni distincte în evoluția concentrației.

În volumul soluției ea este constantă și reprezentată prin linia orizontală  $c=c_0$ . A doua regiune situată lângă electrod prezintă o cădere a concentrației spre zero. Această regiune, cunoscută ca stratul de difuzie Nernst are grosimea  $\delta$ . Grosimea exactă a acestui strat depinde de natura soluției și de cinetica reacțiilor la electrod. Pentru soluții omogene care nu sunt supuse agitării sau altor factori grosimea stratului de difuzie se situează între 0,01 și 0,001 mm. O importanță presupunere a acestui model este că atunci când analitul atinge suprafața electrodului acesta se consumă instantaneu prin oxidare sau reducere. În practică aceasta este ușor realizabil prin alegerea unui potențial de polarizare convenabil. În concluzie teoria stratului de difuzie ne arată că:

- Există întotdeauna un strat subțire  $\delta$ , staționar în contact cu suprafața electrodului a cărui grosime este dependentă de procesele implicate și de natura soluției.
- În cadrul acestui strat difuzia controlează transferul de analit spre electrod prin gradientul de concentrație.
- În afara stratului limită difuzia este neglijabilă iar concentrația este menținută la valoarea  $c_0$  fie prin agitație sau convecție

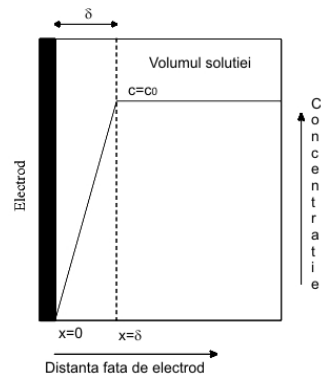
Din figura 4.6, pentru cazul ideal, gradientul descreșterii concentrației este liniar astfel încât putem să scriem:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c_0 - c_e}{\delta} \quad 47$$

Deoarece concentrația la electrod,  $c_e=0$  atunci

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c_0}{\delta} \quad 48$$

și fluxul de substanță prin stratul de difuzie conform cu 4.5 este



$$J = D_0 \frac{c_0}{\delta} \quad 4.9$$

iar curentul limită prin stratul de difuzie spre electrod devine ( 4.6):

$$I_L = \frac{nFAD_0c_0}{\delta} \quad 4.10$$

Astfel curentul electric de limitare datorită stratului de difuzie este direct proporțional cu concentrația analitului și invers proporțional cu grosimea stratului.

### ***Biosenzorul în condiții de neechilibru. Ecuația Cottrell***

Cazul prezentat anterior referitor la formarea stratului de difuzie a fost evaluat în condițiile în care soluția cu analiți era omogenă sau supusă unei agitații continue pentru omogenizare. Rezultatele au arătat un profil de difuzie staționară la suprafața electrodului (adică gradientul de concentrație nu se schimbă în timp) și de aici a rezultat un curent staționar. Se va prezenta cazul apropiat de realitate când analiții sunt în cantități foarte mici într-un volum dat de soluție nesupus agitării. Până la aplicarea potențialului pe electrod soluția și electrolitul (de regulă analitul) pot coexista fără ca o reacție chimică să aibă loc. Când un potențial este aplicat pe electrod cu o valoare suficient de mare pentru a se iniția electroliza componentei electroactive (la  $t=0$ ) atunci concentrația la suprafața electrodului ( $x=0$ ) se reduce la zero. Din acest moment se stabilește un gradient de concentrație cu o curgere de material dinspre soluție spre electrod. Întrucât soluția este staționară (fără mișcare prin agitare) stratul de difuzie nu va mai fi constant în grosime. El va crește dinspre electrod spre soluție iar gradientul de concentrație se va modifica continuu în timp rezultând un curent nestaționar pe electrod. Astfel va trebui să se dezvolte un nou tip de relații de legătură pentru acest proces de schimbare a fluxului la electrod. A doua lege a lui Fick leagă evoluția concentrației de timp și spațiu. Pentru cazul unidimensional legea a doua a lui Fick se scrie:

$$\frac{\partial c_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 c_0(x,t)}{\partial x^2} \quad 4.11$$

unde toate variabilele au aceeași semnificație uzuală. Ecuația diferențială 4.11 are soluții diferite pentru diferite condiții de graniță. Utilizând transformata Laplace pentru ecuația 4.11 se obține dependența concentrației de parametrii  $x$  și  $t$ :

$$c(x,t) = c \times \operatorname{erf} \left( \frac{x}{\sqrt{Dt}} \right) \quad 4.12$$

unde erf- reprezintă funcția eroare. Considerând derivata funcției 4.12 la interfața cu electrodul ( $x=0$ ) se obține:

$$\left( \frac{dc}{dx} \right)_{x=0} = \frac{c}{\sqrt{\pi Dt}} \quad 4.13$$

iar curentul la electrod se calculează din 4.6 cu înlocuirea expresiei din 4.13:

$$i = nFAD \frac{dc(0,t)}{dx} = nFAC_0 \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad 4. 14$$

cunoscută ca ecuația Cottrell pentru orice proces ce implică difuzia într-un spațiu unidimensional, semiinfini. În acord cu această ecuație produsul dintre curent și rădăcina pătrată a timpului este o constantă, adică nu se stabilește un curent staționar pe suprafața electrodului.

### Model matematic pentru electrodul enzimatic, regimul cinetic vs regimul difuzional

Comportarea și performanțele unui electrod enzimatic sunt strict dependente de o serie de factori (imobilizarea pe electrod, tipul de electrod, tipul de substrat de imobilizare, natura soluției cu analiți- fluidul biologic) care în final impun cinetica și transportul, elementele ce definesc parametrii de funcționare. Cu elementele de bază prezentate anterior precum și cu descrierea cineticii enzimelor se poate elabora un model de funcționare ce ne permite să stabilim parametrii de lucru a electrodului enzimatic.

Fiind un electrod cu o enzimă imobilizată pe suprafața sa cinetica reacției este dominantă la interfață iar procesele de difuzie sunt dominante dinspre volumul soluției spre electrod.

Prin urmare cele două procese sunt spațial separate (figura 4.7).

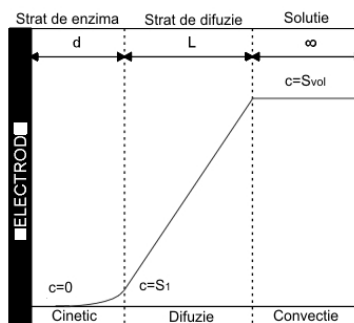


Figura 4.7-Model matematic de funcționare a electrodului enzimă pe baza a două procese concurente-cinetic și difuzional. Modelul constă din trei regiuni: **convectivă** ( $x > L$ ) unde concentrația analitului este menținută constantă la  $c=S_{vol}$ , **difuzională** ( $0 < x < L$ ) unde au loc procese de difuzie pură, **cinetică** unde la  $x=0$  au loc reacțiile controlate de enzimă

Pentru a surprinde procesele biochimice și fizice s-au impus câteva simplificări: coeficienții de activitate și partiția analitului sunt considerați unitari pentru cele trei domenii, furnizarea de orice tip de co-substrat este constantă și independentă, enzima este distribuită uniform pe toată suprafața electrodului la  $x < 0$ , semnalul dat de senzor (curentul electric) depinde numai de generarea de produși care la rândul lor sunt dependenți de fluxul de analit (substrat) în senzor. Condițiile de graniță sunt stabilite la cele două interfețe ( $c=S_1$ ) și în adâncimea stratului de enzimă spre interfața cu electrodul ( $c=0$ ).



Utilizând  $S_1$  ca referință pentru concentrația de substrat la intrarea în zona enzimei imobilizate și considerentele de cinetică enzimatică intuitiv se poate constata pentru concentrație o descreștere exponențială care se exprimă:

$$c(x) = S_1 \exp \sqrt{\frac{\alpha}{D_e}} x; \quad x < 0 \quad 4.15$$

unde  $\alpha$  este  $V_{\max}/K_M$  iar  $D_e$  reprezintă coeficientul de difuzie a substratului în stratul cu enzima imobilizată.

Răspunsul senzorului este controlat de cinetica de reacție a enzimei dacă aceasta se efectuează cu o viteză mică față de procesul general de difuzie. În aceste condiții și presupunînd că numai jumătate din produșii generați de enzime difuzează spre electrod atunci curentul ( $I_{\text{cinetic}}$ ) de electrod poate fi exprimat ca:

$$I_{\text{cinetic}} = nFAL \frac{k_2 [E][S]}{2(K_M + [S])} \quad 4.16$$

unde se observă că este direct proporțional cu grosimea stratului de enzime imobilizate, concentrația de enzime  $[E]$  și cea de substrat  $[S]$ .

Pentru cazul în care încărcarea enzimei este mare ( $K_M \ll [S]$ ) atunci se atinge un curent maxim de:

$$I_{\text{cinmax}} = nFAL \frac{k_2 [E]}{2} \quad 4.17$$

Combinînd ultimele două ecuații se obține în final;

$$I_{\text{cinetic}} = I_{\text{cinmax}} \frac{[S]}{(K_M + [S])} \quad 4.18$$

relație ce permite determinarea experimentală a parametrilor electrozului enzimă în regim cinetic de funcționare. O simplă analiză a ecuației de mai sus pune în evidență o comportare a curentului cinetic similară cu ecuația Michaelis-Menten ce descrie cinetica enzimei.

Rezultatele nu sunt surprinzătoare deoarece răspunsul este dictat în principal de reacțiile enzimaticе și nu de procesele de difuzie. Singura diferență dintre ecuațiile cinetice ale enzimei și relația 4.18 este aceea că termenul viteză de reacție este înlocuit cu expresia curentului. În consecință și forma curbelor de răspuns este identică. În cazul în care procesele din stratul enzimatic de grosime  $d$  este mai rapid decît procesele de difuzie și transport (adică concentrația  $S_1$  este aproximativ 0) atunci răspunsul senzorului este determinat de controlul transportului de analit. Concentrația  $S_1$  fiind neglijabilă atunci ea este practic zero în tot stratul unde enzima este imobilizată. Aceasta este posibil cînd parametrul adimensional  $\sigma^2$  este supraunitar:

$$\sigma^2 = \frac{\alpha d^2}{D_e} = \frac{V_{\max} d^2}{K_M D_e} \quad 4.19$$

Acest parametru compară viteza de reacție enzimatică ( $V_{\max}/K_M$ ) cu difuzia prin stratul cu enzima imobilizată ( $d^2/De$ ). Dacă  $\sigma^2 < 1$  atunci regimul cinetic este predominant iar dacă  $\sigma^2 > 1$  răspunsul este sub controlul difuziei.

Analog situației cinetice se poate deduce o expresie generală pentru senzorul operând în regim limitat de procesele de difuzie astfel:

$$I_d = \frac{2I_{\max}D_e[S]}{k_2[E]d^2} \quad 4.20$$

Comparând cele două cazuri limită se constată că  $I_d$  este dependent atât de grosimea  $d$  și de coeficientul de difuzie în timp ce  $I_{\text{cinetic}}$  este dependent de  $L$  și independent de coeficientul de difuzie. Întrucât  $S_1$  reprezintă maximum de concentrație posibilă în stratul cu enzimă atunci răspunsul liniar a senzorului va fi determinat de  $S_1$  când  $S_1 \ll K_M$ . Este posibil să determinăm o expresie pentru  $S_1$  ca funcție de  $S_{\text{vol}}$  astfel:

$$S_1 = \frac{S_{\text{vol}}}{1 + \frac{L}{D_s} \sqrt{\alpha D_e}} \quad 4.21$$

Această relație arată că  $S_1$  este dependent de coeficienții de difuzie și poate fi optimizat printr-o atentă selecție a parametrilor de difuzie  $D_s$ ,  $D_e$  (difuzia în stratul de imobilizare și în stratul limită), grosimea  $L$ . În termeni operaționali creșterea grosimii stratului de difuzie sau descreșterea difuzivității pot fi limitate prin caracteristicile de timp de difuzie prin membrana (stratul) de imobilizare.

Timpul caracteristic de transfer prin membrană ( $\tau=L^2/D_s$ ) este adesea factorul ce determină performanțele senzorilor în general și a electrodului enzimă în particular, parametrii cinetici sunt determinanți în stabilirea regimurilor de lucru ale biosenzorului electrod enzimatic.

#### 4.10 Referințe

1. Tothill, I.E., Newman, J.D., White, S.F. and Turner, A.P.F. *Enzyme and Microbial Technol.* pp296 (1996)
2. Cullen, D.C. în "*4th World Congress on Biosensors*", 29-31 May, Bangkok, Thailand. Elsevier Applied Science, Oxford, UK. p. 50. (1996)
3. Fisher, U., Alcock, S.J. and Turner, A.P.F. *Biosensors & Bioelectronics*, 23, p 10, (1995)
4. Turner, A.P.F., Newman, J.D. and Rickman, A. "*Optics for Environmental and Public Safety*", Munich, Germany, 19-23 June 1995, Europto Series, Berlin, Germany.
5. Newman, J.D., Marazza, G. and Turner, A.P.F. *Anal. Chim. Acta* vol 262, 13 (1992).
6. Saini, S. and Turner, A.P.F. *Trends Anal. Chem.*, vol14, 304 (1995)
7. Dennison, M.J., Hall, J.M. and Turner, A.P.F. *Anal. Chem.*, vol 67, 3922 (1995).
8. Alcock, S.J., White, S.F., Turner, A.P.F., Setford, S., Tothill, I.E., Dicks, J.M., Stephens, S., Hall, J.M. and Warner, P.J. British Patent Application 9416002.5, (1994)
9. Skuridin, S.G., Yevdokimov, Y.M., Efimov, V.S., Hall, J.M. and Turner, A.P.F. *Biosensors & Bioelectronics.*, 11, 903 (1996).
10. Psoma, S. and Turner, A.P.F. "*3rd World Congress on Biosensors*", 1-3 June, New Orleans, USA. Elsevier Applied Science, Oxford, UK, (1994)
11. Dobson, D.J., Turner, A.P.F. and S Saini,. *Anal. Chem.*(seriile 1990-1996)
12. Loughran, M.G., Hall, J.M. and Turner, A.P.F. *Electroanal.*7, 1 (1996).
13. Newman, J.D., White, S.F., Tothill, I.E. and Turner, A.P.F. *Anal. Chem.*, 67, 4594 (1995)
14. Jaffari, S.A. and Turner, A.P.F. UK Patent GB9402591.3 (1994) .
15. Selkirk, J.Y., Turner, A.P.F. and Saini, S. "*4th World Congress on Biosensors*", 29-31 May, Bangkok, Thailand. Elsevier Applied Science, Oxford, UK. p. 198. (1996)
16. Albers, W.M., Lekkala, J.O., Jeuken, L., Canters, G.W. and Turner, A.P.F. *Bioelectrochem. Bioenerg.* (1996).
17. Chen, B. and Turner, A.P.F. in"24th Symposium European Peptide Society", Edinburgh, Scotland, September, paper No 23 (1996)
18. D'Amico A., DiNatale C. *A Sensors Journal*, IEEE, vol11, no 3, pp:183 – 190 (2001)
19. Muller R., Kamins T., Chan M. *Device electronic for integrated circuits* JohnWiley & Sons, 3rd edition, (2003).
20. DiNatale C., Salimbeni D., Paolesse R, Macagnano A., D'Amico A.. *Sensors and Actuators B* 65 220-6. (2000)
21. D'Amico A. et al. *Sensors and Actuators B* 7 685-8. (1992)
22. Walker N.J. *Science* 296 pp. 557–559. (2002)
23. Ciucu Anton, *Biochimie analitică – Partea I*, Ed U B, pp. 144,(2000)
24. Mutihac Lucia, *Fundamentals of analytical biochemistry*, Ed UB, pg. 194 (2005).

- 
25. Dietrich B., Viout P. and Lehn J.M.: *Macrocyclic chemistry: aspects of organic and inorganic supramolecular chemistry*, Ed. Weinheim, New York : VCH, (1993).
  26. Cram D. J. and Cram J.M: *Container molecules and their guests*, (Monographs in supramolecular chemistry no. 4, Stoddart J. F. (ed.)), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1994).
  27. Zolotov Y.A., *Macrocyclic compounds in analytical chemistry* (Chemical analysis: vol.143, V.Y. Nagy and Y.A. Zolotov (eds.)), Wiley, New York (1997).
  28. Mutihac Lucia, Hans-Jürgen Buschmann, Mutihac Radu-Cristian, and Eckhard Schollmeyer, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 51, 1, 1-10, (2005).
  29. Diamond D., G. Svehla, E. Seward and M.A. McKervery, *Anal. Chim. Acta*, 204, 223-31. (1988)
  30. Diamond D. and K. Nolan: *Calixarenes*, *Anal. Chem.*, 73, pp. 22A-29A. (2001)
  31. Asfari Z., V. Bohmer, J. Harrowfield and J Vicens: *Calixarenes 2001*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, (2001).
  32. Roitt I. M. *Essential Immunology*, ninth edition, Blackwell Science (1997)
  33. Carr, P. W. and Bowers, L. D. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, Blackwell Science (2000)
  34. Kubo Y, Maseda S, Tokita S, Kubo M, *Nature* vol 382, pp522 (1996)
  35. Buck L. and R. Axel, *Cell*, 65, 175-187, (1991)
  36. Caterina E et al. *Nature* 389, 27-28 (1997)
  37. Corey D.P et al. *Nature* 432, 723-730, (2004)
  38. Fleig A and Penner R. *The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features*. *TIPS* 25 (12), (2004)
  39. Friedrich R.V. *Nature* 430, 760-768 (2004)
  40. Hallem E.A. et al. *Cell* 117, 965-979, (2004)
  41. Basbaum Julius D. *A.I. Nature* 413, 204-207 (2001)
  42. Lin S-Y., Corey D P, *Current Opinion in Neurobiology* 15:350-357, (2005)
  43. Neher E, *Nature Biotechnology* 19, 24-36 (2001)
  44. Suh G.S.B et al.. *Nature Neurosci* 431, 657-658 (2002)
  45. Sukharev S. and Anishkin A.. *Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems?* *TINS* 27(6), (2004)
  46. Voels et al., *Nature Chemical Biology* 1, 26-35 (2005)
  47. Shinichi Komaba, et al, *Sensors and Actuator B: Chemical*, 52, 1-2, 78-83 (1998)
  48. Dinischiotu Anca, Costache Marieta, *Biochimie generala, vol I, proteine, glucide și lipide*, Ed. Ars Docendi, (2004)  
Costache Marieta, Anca Dinischiotu *Biochimie generală, vol II, acizi nucleici: structură și organizare*, Ed. Ars Docendi, (2004)
  49. Freitas Robert A, *Nanomedicine*, vol 1-4, (seriile 1998, 2004), ([www.foresight.org/Nanomedicine/NanoMedTOC.html](http://www.foresight.org/Nanomedicine/NanoMedTOC.html))
  50. Hui Peng, et al, *Biosensors & Bioelectronics*, 20, 1821-1828, (2005)

- 
51. Barboricã Andrei, *Principii și sisteme de măsurare a mărimilor fiziologice*, Ed UB, 117p, (2000)
  52. Forster R.J, Chem Soc.Rev. 23, 4, pp 289 (1994)
  53. Forster R.J, in *Encyclopedia of Electrochemistry*, P.A Unwin and A.J. Bard (ed) Wiley, New York, (2000)
  54. Buck R.P, et al, *Pure and Appl.Chem*, 74, 11, pp 2169-2200 (2002)
  55. Umezawa Yoshio et all, *Pure and Appl.Chem*, 74, 11, pp 923-994, (2002)
  56. Umezawa Yoshio et all, *Pure and Appl.Chem*, 74 11, pp 995-1099, (2002)
  57. Scheller Frieder, Schubert Florian, *Biosensors*, Ed Elsevier, (1992)
  58. Freitag R, *Biosensors in Analitical Biotechnology*, UK, Ac. Press (1996)
  59. Buerk D.G, *Biosensors Theory and Applications*, Lancaster, USA, technomic Publishing Comp. Inc (1993)
  60. Hall E.A.H, *Biosensors*, UK, Open Univ. Press (1990)
  61. Cornish-Bowden, *A Principles of enzyme kinetics*. London: Butterworth. (1976).
  62. Fersht, A. *Enzyme structure and mechanism*, 2nd ed, New York: W.H.Freeman & Co.Henderson, P.J.F. (1978).
  63. Stamatin Ioan, Berlic C., Vaseashta A., *Thin Solid Films*, 495, 1-2 p 312-315, (2006)
  64. Theâvenot Daniel R, et all, *Pure Appl. Chem.*, 71,12, p. 2333-2348, (1999).
  65. Cammann K. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 287, 1 (1977).
  66. Turner A. P. F, I. Karube, G. S. Wilson (eds.) *Biosensors, Fundamentals and Applications*. Oxford University Press (1987)
  67. Bergveld P, D. R. Theâvenot. *Advances in Biosensors*, Supplement 1 (A. P. F. Turner, ed.), p. 31. JAI Press,London, UK (1993).
  68. Durst R. A, Baumner A. J., Murray R. W., Buck R. P., Andrieux C. P.. *Pure Appl. Chem.* 69, 1317 (1997).
  69. Kutner W, J. Wang, M. L'Her, R. P. Buck. *Pure Appl. Chem.* 70, 6, 1301 (1998).
  70. Ciucu Anton, *Biosensors for environmental monitoring*. Ed Niculescu, Bucuresti, pg. 352, (2000)
  71. Inczedy J, T. Lengyel, A. M. Ure (eds.). *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd edn. Blackwell Science, Oxford (1998).
  72. Bartlett P. N, P. Tebbutt, R. G. Whitaker. *Prog. React. Kinet.* 16, 55 (1991).
  73. Scheller F. W, D. Pfeiffer. *Z. Chem.* 18, 50 (1978).
  74. Bindra D. S, Y. Zhang, G. S. Wilson, R. Sternberg, D. R. Theavenot, D. Moatti, G. Reasch. *Anal. Chem.* 63, 1692 (1991).
  75. Wollenberger U, F. Schubert, F. W. Scheller. *Trends Biotechnol.* 11, 255 (1993).
  76. Theavenot D. R, P. R. Coulet, R. Sternberg, J. Laurent, D. C. Gautheron. *Anal. Chem.* 51, 96 (1979).
  77. Aizawa M. *Anal. Chim. Acta* 250, 249 (1991).
  78. Sugawara M, H. Sato, T. Ozawa, Y. Umezawa. *In Frontiers in Biosensorics, Fundamental Aspects* (F. W.Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz, eds), pp. 121-131. BirkhaEuser Verlag, Basel (1997).

- 
79. Kiefer H., B. Klee, E. John, Y. D. Stierhof, F. Jaehnig. *Biosens& Bioelectron.* 6, 233 (1991)
  80. Sugawara M., . Hirano A, Rehak M., Nakanishi J., Kawai K., Sato H., Umezawa Y. *Biosens & Bioelectron.* 12,5,425 (1997).
  81. Ciucu Anton, *Aplicațiile Analitice ale Biosenzorilor în Controlul Poluării Mediului*, Ed Ars Docendi, București, pg 175, (2000)
  82. Covington A. K. *Pure Appl. Chem.* 66, 565 (1994);  
Buck R. P, E. Lindner. *Pure Appl. Chem.* 66, 2527 (1994).
  83. Cullen D. C, R. S. Sethi, C. R. Lowe. *Anal. Chim. Acta* 231, 33 (1990).
  84. Ciucu A, C. Negulescu, R.P. Baldwin, *Biosens& Bioelectron.*,18,2-3, 293-300, (2003)
  85. Nogue T., Gradinaru A., Ciucu A., J.L. Marty, *Anal. Lett.*, 32, 1723-1738. (1999)
  86. Amine A., M. Alafandy, J. M. Kauffmann. *Anal. Chem.* 67, 2822 (1995).
  87. Guilbault G. G. *Handbook of Immobilized Enzymes*. Marcel Dekker, New York (1984).
  88. Mosbach K (ed.). *Methods in Enzymology*, vol. 137. Acad Press, N Y (1988).
  89. Cass A. E. G (ed.). *Biosensors, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford (1990).
  90. Go Èpel W, T. A. Jones, M. Kleitz, I. LundstroÈm, T. Seiyama (eds). *Chemical and biochemical sensors*. In *Sensors, A Comprehensive Survey* (W. GoÈpel, H. Hesse, J. N. Zemel, eds), vols 2 & 3. VCH, New York (1991).
  91. Blum L. J, P. R. Coulet (eds). *Biosensor Principles and Applications*. Marcel Dekker, New York (1991).
  92. Kas J., M. Marek, M. Stastny, R. Volf. In *Experimental Techniques in Bioelectrochemistry* (V. Brabec, D. Valz, G. Milazzo, eds), Chapter 6, pp. 361-447. Birkaeuser Verlag, Basel (1996)
  93. Rajagopalan R, A. Aoki, A. Heller. *J. Phys. Chem.* 100, 3719 (1996).
  94. Gorton L. *Electroanalysis* 7, 23 (1995).
  95. See J. E. and E. T. Bell, *Proteins and Enzymes*, Marcel Dekker (1988).
  96. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Claredon Press, London, (1958)
  97. McNaught A. D, A. Wilkinson. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford (1997).
  98. Umezawa Y., K. Umezawa, H. Sato. *Pure Appl. Chem.* 67, 507 (1995).
  99. Nistor C., J. Emneus, L. Gorton, A. Ciucu, *Anal. Chim. Acta*, 387, 309-326 (1999)
  100. Lindgren A., Stoica L., Ruzgas T., Ciucu A., Lo Gorton, *The Analyst*, 124, 527-532,(1999)
  101. Ciucu A., Nica A.G., Gorton L, *Rom. J. Biochem.*, 39 (1-2), 55-62. (2002)

## 5. Biosenzori microbieni

Există două clase de biosenzori microbieni ce folosesc același principiu: măsurarea activității metabolismului în prezența analitului.

Prima clasă utilizează microorganisme imobilizate de la care se măsoară producția rezultată din metabolism. Această clasă a devenit comun definită ca biosenzori microbieni.

A doua clasă măsoară activitatea electrică a metabolismului microorganismelor atunci când consumă un „biocombustibil”, de exemplu glucoza. Această clasă este cunoscută sub denumirea generică de celule bioelectrochimice sau celule de biocombustie.

Fiind dezvoltată ca un domeniu separat al celulelor electrochimice generatoare de energie electrică, pe baza consumului de biocombustibili, s-a neglijat aspectul capacității acestora de a fi adevărați biosenzori. Vom trata aceste două clase separat punându-le în evidență performanțele și capacitățile lor din punct de vedere al cerințelor de a fi biosenzori. Biosenzorii microbieni conțin microorganisme imobilizate și un lanț de transducție mult mai diversificat (figura 5.1). În general sunt utilizați pentru un singur proces biochimic [1].

*Senzorii microbieni prezintă următoarele avantaje:*

- Sensibilitate mai mică la inhibare sau impurificarea analitului;
- Au o toleranță mai mare în ceea ce privește valoarea pH-ului și a temperaturii;
- Au un timp de viață mai lung decât electrozii enzimatici;
- Sunt mai ieftini față de electrozii enzimatici;
- Variabilitate mare pentru că se adaptează ușor la condiții specifice de mediu;
- Independență la cofactori;
- Răspuns fiziologic la producția toxică;
- Preparare ușoară deoarece cultivarea microorganismelor este simplă;

*Dezavantajele acestor dispozitive sunt următoarele:*

- Au un timp de răspuns mai mare decât electrozii enzimatici;
- Reutilizarea lor într-o nouă măsurătoare necesită un timp mai mare;

În principiu schema unui senzor microbial este identică cu cea a unui biosenzor enzimatic. Schema constă în imobilizarea celulelor intacte în contact intim cu un traductor specific care convertește producția sau efectele metabolismului într-un semnal biochimic (figura 5.1).

Senzorii microbieni și-au găsit o serie de aplicații industriale în procesele biochimice și microbiologice în domenii precum producerea medicamentelor, industria alimentară, tratamentul apelor reziduale și producerea de energie unde reacțiile de fermentație și transfer de electroni au un rol important. În domeniul laboratoarelor clinice –microbiologie, parazitologie– unde intensiv se utilizează medii de cultură senzorii microbieni pre-

zintă un potențial important pentru implementare. Cele mai multe materiale din mediile de cultură nu pot fi determinate prin metode spectrofotometrice fiind optic inactive sau netransparente. O combinație mediu de cultură-substraturi de imobilizare cu o cupla-re adecvată spre un traductor ca în figura 5.1 este fezabilă cu avantaje asupra reducerii timpilor de investigare și răspuns la un diagnostic specific. Monitorizarea continuă, rapidă, sensibilă și controlul factorilor variabili deja menționați permit evaluarea substraturilor și produșilor de metabolizare, a numărului de celule viabile prezente în culturi, a tipurilor de microorganisme.

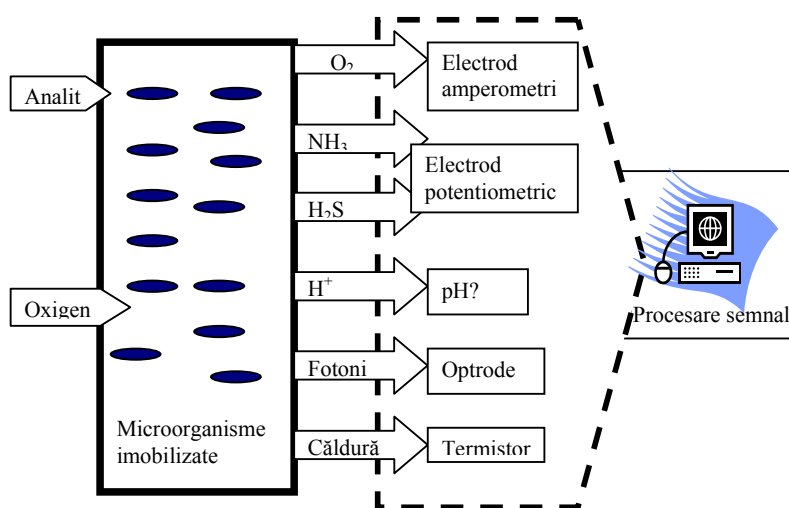


Figura 5.1 Schema de principiu a senzorului microbian

## 5.1 Principiu de funcționare

### 5.1.1 Biosenzori microbieni electrochimici

Biosenzorii microbieni conțin microorganisme imobilizate într-o membrană și un dispozitiv electrochimic. Clasificarea lor se realizează după tipul activității respiratorii măsurate sau după tipul activității electrochimice, metabolice, optice etc. În cazul modificării activității respiratorii a microorganismelor, imobilizate într-un substrat, aceasta este detectată de un electrod de oxigen (fig.5.2 a). Prin măsurarea activității respiratorii sau a consumului de oxigen se estimează concentrația substratului. În cazul măsurărilor de produși de metabolizare se folosesc alte metode electrochimice (figura 5.2.b). Senzorul microbian electrochimic prezintă importante diferențe față de senzorul enzimatic. El este alcătuit din componente vii ce produce un răspuns fiziologic, în timp ce senzorul enzimatic include alterarea analitului. Microorganismele utilizate în acest caz sunt aerobe.



Senzorul se introduce într-o soluție tampon saturată cu oxigen. După adăția la substrat, activitatea respiratorie a microorganismelor crește, producând scăderea concentrației oxigenului în apropierea membranei. Folosind electrodul de oxigen, concentrația substratului poate fi măsurată prin detectarea scăderii concentrației oxigenului.

Un alt tip de biosenzor microbial detectează activitatea metabolică, electrochimic, cum ar fi: hidrogenul, dioxidul de carbon, amoniacul și acizii organici, care sunt secretați de microorganisme (figura 5.2b). Se pot utiliza atât microorganisme aerobe cât și anaerobe.

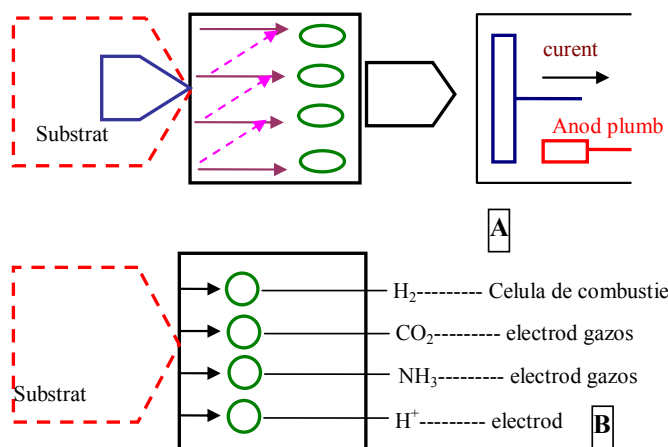


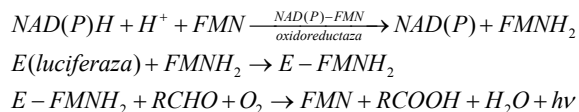
Figura 5.2- Principiul de funcționare a senzorului microbial electrochimic a) Măsurarea activității respiratorii, catod Pt b) Biosenzor microbial ce măsoară alți metaboliți

Cei mai mulți biosenzori microbiali se bazează pe măsurarea activității respiratorii și folosesc activitatea microorganismelor aerobe. Traductorul acestui tip de biosenzor poate fi: electrochimic (potențiomtric, amperometric), fotodetector, termistor, ISFET.

### 5.1.2 Biosenzori fotomicrobieni

Se bazează pe fenomenele optice ce le pot avea microorganismele în procesele metabolice: fotoluminescență, electroluminescență, chemoluminescență, activitate optică specifică (polarizare dependentă de chiralitate, indice de refracție, absorbanță, etc). De exemplu intensitatea luminescenței fotobacteriilor (luminobacterii) este dependentă de activitatea metabolică. Este astfel posibil de a construi biosenzori microbiali puternic sensibili prin combinarea acestor fotobacterii cu un fotodetector.

Luminescența in vivo a fotobacteriilor se produce prin următoarele reacții enzimatice:



unde RCHO=aldehidă alifatică și RCOOH=acid gras, FMN (flavin mononucleotid).

Luminescența este puternic afectată de modificările condițiilor externe pentru bacterii care pot conduce ulterior la acumularea accidentală a concentrațiilor intracelulare de NAD(P)H, FMN, H<sub>2</sub>, ATP și aldehide (sinteza enzimatică a aldehydelor necesită cofactor ATP). Utilizând acest principiu pot fi detectate hrana acestor microorganisme (ex. glucoză și aminoacizi) și inhibitorii lor (ex. toxine și metale grele). Intensitatea luminescenței în general este un parametru mai sensibil pentru activitatea metabolică decât pentru activitatea de generare a căldurii. Mai mult chiar, răspunsul metabolic al celulelor poate cauza luminescența la fotobacterii.

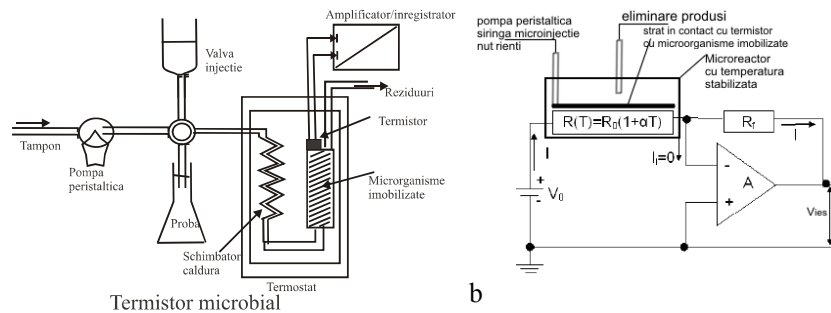
### 5.1.3 Termistor microbial

Biosenzorii microbieni pot fi construiți prin plasarea microorganismelor imobilizate în imediata vecinătate a unui termistor care măsoară căldura metabolică absorbită sau cedată produsă de aceștia (Fig. 5.3). Acest tip de senzor se bazează pe principiul general al măsurării schimbului de entalpie. Deoarece multe reacții metabolice sunt însoțite de o evoluție considerabilă a căldurii, calorimetria se poate aplica pentru a măsura o largă varietate de analiți. Lipsa specificității datorate principiului de detecție în general este compensată adecvat prin utilizarea biocatalizatorilor specifici, imobilizați. Oricum, partea cea mai mare a căldurii eliberată în reacțiile metabolice poate fi pierdută în soluție fără a fi detectată de termistor și limitează sensibilitatea acestei tehnici.

Tipuri de măsurători: entalpia reacțiilor metabolice, călduri specifice, latente. Termistorii, elementul de transducție, sunt cei mai utilizați ei fiind realizați de obicei din materiale semiconductoare (în majoritate materiale oxidice și au în general un coeficient de temperatură negativ). Deși au fost raportate foarte multe cazuri de aplicații ale calorimetriei în analizele biochimice, ea nu poate fi folosită ca o analiză de rutină datorită costurilor ridicate ale instrumentelor sensibile și complexe ce trebuie folosite pentru acest tip de măsurători. Ca exemplu, gelul de drojdie de bere este introdus în coloana separatoare de sticlă care constituie ieșirea termistorului. Soluția ce trebuie analizată este pompată printr-un schimbător de caldura ce se află în baia de apă, controlată termostatic și apoi prin coloana de sticlă. Prin acest procedeu se poate măsura glucoza, fructoza și caseina.

Recent microminiaturizarea și introducerea elementelor de microfluidică a condus la o nouă generație de termistori microbieni care pot senza efecte termice de la un număr relativ mic de microorganisme.

Un microtermistor microbial consă din asamblarea tuturor componentelor direct pe suprafața semiconductoare a oxidului respectiv (figura 5.3b).



**a**  
 Figura 5.3 Tipuri de termistori microbieni,  
 a) cu reactor termostatat

**b)** Cu microreactor construit pe termistor

## 5.2 Răspunsul fiziologic al senzului microbial

Acesta include o serie de factori:

- Substratul este absorbit prin membrana celulară;
- Respirația;
- Luminiscenta și electrochimismul metabolismului bacteriilor;
- Secreția sau separarea produșilor metabolici de cei nemetabolici;
- Modificările sau degradările intracelulare ale substratului prin secvențe metabolice sau enzime ce nu participă la proces;

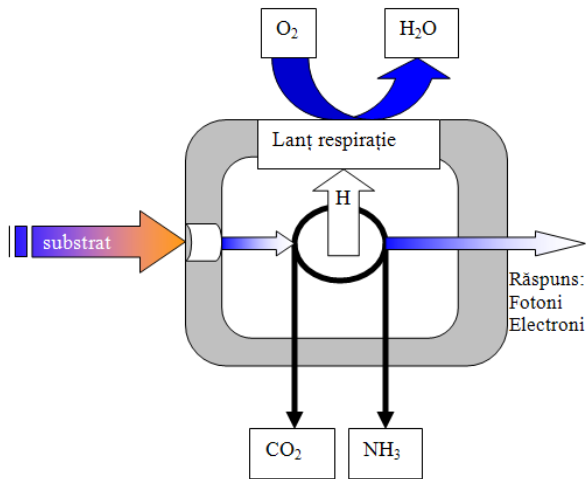


Figura 5.4 Răspunsul fiziologic al senzului microbial

Comportamentul microorganismelor este dat de starea fiziologică a lor și aceasta este dată de limitarea extremă a nutrienților. Metabolismul este o condiție ce asigură supraviețuirea celulelor [1]. Prima condiție critică pentru formarea unui semnal la senzorul microbial este utilizarea substratului (figura 5.4). Solutul poate intra în celule prin sistemul de translocare specific, întâi prin transport activ sau prin difuzie forțată.

Transportul pasiv realizat numai prin difuzie datorită gradientilor de concentrație de oxigen și nutrienți este de mică importanță. Transportul activ asigură acumularea substanțelor nutritive în substrat în sensul gradientului de concentrație. Aceasta face ca în substrat să se acumuleze proteine cu o înaltă specificitate care se consumă în metabolismul energetic. De asemenea cuplajul celulelor cu sistemul de transducție a fenomenelor energetice, în special în lanțul respirator este un important aspect al transportului activ, fiind crucial pentru formarea semnalului în senzorul microbial, de exemplu folosirea glucozei, sucrozei, și a altor oligopeptide. După utilizarea substratului el este degradat specific de secvențele enzimatiche prezente și care imobilizează celulele. Potrivit condițiilor aerobice, se consumă oxigenul. Astfel acizii organici cum ar fi lactic și piruvații, dioxidul de carbon, ionii de amoniu și hidrogenul sulfurat, sunt secretați și se acumulează în produși ai metabolismului celular. Este bine de amintit importanța fierului în biologia bacteriilor, în general și mai ales la cele Gram pozitiv, în special.

Multiplacarea eficientă a bacteriilor patogene în țesuturile organismului gazdă este condiționată de prezența obligatorie a fierului feric, într-o formă accesibilă metabolismului lor. Fierul este necesar pentru anumite reacții enzimatiche esențiale pentru creștere dar este și un component cheie al catenei de transport al electronilor în membrana celulei - respirație celulară[2]. Prin urmare microorganismele cultivate pentru prepararea unui biosenzor microbial trebuie să provină din culturi pe medii echilibrate metabolic în ceea ce privește fierul feric, care să asigure o bună respirație celulară microorganismelor și o bună funcționare a electrodului Clark. Se pot folosi și alte tipuri de electrozi, în biosenzorii microbiali, combinație cu electrozi pentru  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ . Ei au o plajă mai mare de măsurare, răspund la alte contaminări și au limite de detecție și sensibilitate mult mai mari față de electrodul Clark.

La o temperatură și presiune constantă, standard, proporția de oxigen din aer, în volum, este de 20.9%. În soluție apoasă și în echilibru cu aerul atmosferic, proporția de oxigen este tot de 20.9%, din totalul gazelor dizolvate. În amândouă cazurile în aer și în soluție, balanța azotului este mai mare decât balanța dioxidului de carbon. Concentrația gazelor dizolvate în soluție variază cu temperatura, și poate fi afectată de solut sau alți solvenți prezenți în soluție. De exemplu, o soluție caldă reține mai puțin oxigen decât o soluție rece. Prezența etanolului mărește semnificativ capacitatea unei soluții apoase de a reține oxigen. În studiile de specialitate se arată că micile diferențe de temperatură pot afecta echilibrul mediului cu aerul din cameră, la fel și unii reactivi pe care îi adăugăm în celula de lucru (de exemplu etanol).

Selecția dispozitivului de transducție este dată de fiziologia celulelor pe care le utilizăm în structura senzorului (respirația, fotoluminescența, gravimetria). Cel mai utilizat este tipul amperometric sau potențiomtric, electrodul Clark și electrozii ion selectivi

de tipul ISFET. Se mai poate utiliza microbalanța cu cristal piezoelectric, detector optoelectronic, termistori, sau ISFET dar electrodul de oxigen predomină în senzorii microbieni. Producții metabolice ca lactatul sau piruvatul, dioxidul de carbon, ionii de amoniu și de hidrogen sulfurat sunt determinați potențiomtric cu electrozi ion selectiv (ISE). Combinația directă a microorganismelor cu un tranzistor cu efect de câmp (FET) a fost dezvoltată pentru estimarea glucozei a alcoolului cu Acetobacter și a xilozei bazată pe celule de Gluconobacter oxidans. S-a constatat că o serie de mediatori solubili cu potențial redox, cum ar fi etosulfatul de fenazina, fericianida sau fericianida în combinație cu benzochinona, au posibilitatea măsurării directe a electronilor urmărind activitatea metabolică a celulelor. Recent au fost utilizați mediatori insolubili cum sunt feroceni, tetrahiatfulvalenele și tetracianochinodimetanul, care au fost incorporate în paste de carbon în contact cu Paracoccus denitrificans (figura 5.5).

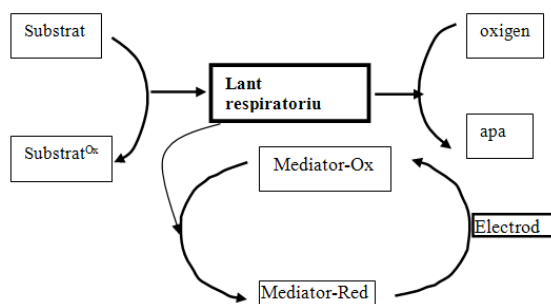


Figura 5.5- Schema de funcționare a biosenzorului microbial cu mediatori

O altă tehnică interesantă de biosenzor microbial a fost creată prin luminiscenta fotobacteriilor conectate cu un detector optic. Astfel a fost creat și descris un senzor microbial pentru determinarea ionilor de metal și a ionilor aromatici. Prin inginerie genetică genele ce răspund de emiterea luminii de la fotobacteria Vibri au fost transferate în structura genetică a bacteriilor Escherichia coli sau Seratia marscescens. Viitorul traductorilor în biosenzorii microbieni îl dețin însă cristalele piezoelectrice, microbalanțele cu cuarț cu unul din electrozi funcționalizați.

Prin combinarea microorganismelor cu enzime este posibil să crească selectivitatea senzorului microbial. Aceste combinații sunt capabile să determine biopolimeri, cum ar fi amidonul, proteinele și lipidele, ce nu pot fi apreciați cu ajutorul microorganismelor.

Pentru aceasta microorganismele au fost combinate cu hidrolaze. A rezultat astfel un senzor hibrid, amperometric, pentru determinarea NAD<sup>+</sup>, ce are la bază celule de E. coli și NADase. Ureea și creatinina s-a determinat utilizând o combinație de bacterii nitrificatoare și urează sau creatinază. Din experimente cu senzorul BOD s-a ajuns la concluzia că se pot combina mai multe specii de microorganisme și se pot utiliza mai multe substraturi în același experiment. Un alt exemplu tipic de biosenzor conținând populații mixte din specii diferite de microorganisme având capacități metabolice specifice îl reprezintă biosenzorul cu bacterii nitrificatoare. Acest senzor care a fost dezvoltat în special

pentru investigarea apelor uzate conține culturi mixte din specii de Nitrosomonas sp. și Nitrobacter sp. În acest caz s-a folosit un sistem amperometric de măsurare pentru determinarea amoniacului. Controlul oxigenului prin senzorul de oxigen este necesar pentru măsurarea concentrației de amoniac în eșantionul de măsurat.

Pentru că biosenzorul reacționează și cu alți nitriți sau uree, de obicei se însumează cantitățile de substanțe nitrificatoare. Principalul impediment este surplusul de substrat (amoniac sau uree). Acest procedeu, al combinării diferitelor specii de microorganisme, este folosit cu succes și în domeniul toxicologiei. De obicei se poate folosi un inhibitor atunci când concentrația substratului este prea mare. O posibilitate este folosirea membranelor de dializă, atunci când substratul este în exces.

#### Senzor electrochimic – microbial: detector de gaze.

Acest tip de senzori este ușor de fabricat și utilizat, deoarece obținerea unui semnal electro- chimic este cea mai răspândită metodă de obținere a semnalului de răspuns.

Dispozitivele potențiometrice măsoară densitatea de sarcină acumulată la suprafața unui electrod. Un exemplu de senzor care utilizează voltametria ciclică este senzorul cu gaz. Senzorul CO<sub>2</sub> folosește bacterii autotrofe. Este cel mai răspândit din punct de vedere comercial, dar prezintă dezavantajul că diverșii acizi ionici și acizi organici sau anorganici volatili afectează potențialul din interiorul celulei, pH-ul și membrana gaz permeabilă ce acoperă electrodul. Bacteria autotrofă, Pseudomonas S-17, care se poate dezvolta numai în prezența carbonaților, este sursa de obținere a carbonatului. Ea este incubată în condiții aerobe la 30<sup>0</sup>C, timp de o lună și este imobilizată pe vârful electrodului de oxigen.

Pentru mărirea domeniului de selectivitate celula se acoperă cu o membrana semipermeabilă de PTFE. Sensibilitatea măsurătorilor se obține folosind o soluție tampon, saturată în oxigen cu pH=6,5, conținând ioni metalici și 20 μmoli de glucoză. Timpul de viață al senzorului este mai mare de o lună. Fiind un senzor micro-bian, se utilizează la testarea alimentelor.

#### Aplicații ale biosenzorilor microbieni

S-au construit multe tipuri de biosenzori microbieni ce sunt utilizați în monitorizarea virusurilor și în industria alimentară [3]. În tabela 5.1 sunt prezentate câteva din multitudinea aplicațiilor biosenzorilor microbieni.

Tabela 5.1- Aplicațiile biosenzorilor microbieni

SENZOR	Microorganismul imobilizat	Dispozitiv	Timp de raspuns min	Domeniu De masura mgx $dm^{-3}$
Zahar asimilat	Brevibacterium lactofermentum	Electrod O <sub>2</sub>	10	10-200
Glucoza	Pseudomonas fluorescens	Electrod O <sub>2</sub>	10	2-2510
Acid acetic	Trichosporon brassicae	Electrod O <sub>2</sub>	10	3-60
Etanol	Trichosporon brassicae	Electrod O <sub>2</sub>	10	3-25
Metanol	Unidentified bacteria	Electrod O <sub>2</sub>	10	5-2510
Acid formic	Citrobacter freunca	Celula combustie	30	10-10 <sup>3</sup>
Metan	Methylomonas flagellata	Electrod O <sub>2</sub>	2	0-6,6 <sup>a</sup>
Acid glutamic	Escherichia coli	Electrod O <sub>2</sub>	5	8-800
Cepholosorin	Citobacter freunda	Electrod pH	10	100-55*10 <sup>2</sup>
BOD	Trichosporon cutaneum	Electrod O <sub>2</sub>	15	3-60
Lisina	Escherichia coli	Electrod O <sub>2</sub>	5	10-10 <sup>7</sup>
Amoniu	Nitrilying bacteria	Electrod O <sub>2</sub>	10	0,05-1
Dioxid de azot	Nitrilying bacteria	Electrod O <sub>2</sub>	3	0,51-255 <sup>b</sup>
Nistatin	Saccharomices cerevisiae	Electrod O <sub>2</sub>	1h	0,5-0,54 <sup>c</sup>
Acid nicotinic	Lactobacillus araboesis	Electrod pH	1h	10 <sup>-5</sup> -5
Vitamina B <sub>1</sub>	Lactobacillus fermenti	Celula combustie	6h	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>
comunitate microorganisme	-----	Celula combustie	15	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup> <sup>d</sup>
mutageni	Bacillus subtilis ree	Electrod O <sub>2</sub>	1h	1,6-2,85*10 <sup>3</sup>

Nota: a-mmol; b-p.p.m ; c- unit/cm3; d-număr/cm3

### 5.3 Referințe

---

- <sup>1</sup> De Anthony P. F. Turner, Ursula Bilitewski, *Biosensors for Environmental Monitoring*, pp421, Ed Taylor &Francic, (2000)
- 2 Veronica Lazar, *Microbiologie medicală*, Ed. Univ. Bucureti, (2001)
- 3 Y. Lei et al., *Analytica Chimica Acta* 568 200–210, (2006)



## 6. Senzori pe structuri semiconductoare FET

### 6.1 Tranzistori FET, ISFET, CHEMFET, REFET

Tranzistorul cu efect de câmp (FET) este adesea folosit ca traductor pentru senzorii și biosenzorii electrochimici. FET este un traductor ce poate converti o informație chimică într-un semnal electric. FET are un răspuns rapid și selectiv pentru analit, un timp de viață de ordinul lunilor și permite un înalt nivel de integrare și miniaturizare. Din principiul de funcționare FET-urile sunt capabile să măsoare conductanța unui semiconductor funcție de un câmp electric perpendicular pe suprafața oxidului de la poartă. În cea mai simplă versiune (ex.: MOSFET – metal –oxid-semiconductor FET) el este alcătuit dintr-un substrat de siliciu dopat tip p ce conține două regiuni de difuzie de tip n (sursa și drenea). Dacă substratul este dopat n atunci poarta și drenea sunt dopate cu acceptori p. Structura este acoperită cu un strat dielectric de bioxid de siliciu pe care este depus un electrod de metal ( figura 6.1). Când un potențial este aplicat la electrodul poartă purtătorii minoritari din substrat sunt atrași la suprafața semiconductorului. Astfel, conducția electrică dintre sursă și drenă este modificată funcție de potențialul aplicat dintre poartă și substrat [1-5]. În cazul ISFET (ion-selective field effect transistor), electrodul de metal de la poartă al MOSFET-ului este înlocuit de o soluție de electrolit care este în contact cu electrodul de referință și cu bioxidul depus pe poartă. SiO<sub>2</sub> (figura 6.1b). Electrodului de referință poate fi considerat ca poartă pentru MOSFET.

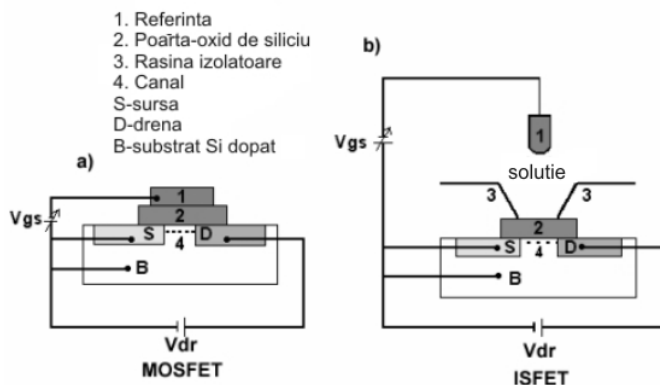


Figura 6.1 Schema reprezentativă a structurilor a) MOSFET, b) ISFET

În ISFET, curentul electric  $I_d$ , curge de la sursă la drenă printr-un canal. Ca în MOSFET, rezistența canalului depinde de câmpul electric perpendicular pe direcția curentului. Deasemenea, depinde de diferența de potențial de la poartă oxid-electrolit. În consecință conducția electrică a canalului nu este direct influențată de tensiunea aplicată pe

poartă datorită acumulărilor de sarcină la interfața oxid-electrolit. Când  $\text{SiO}_2$  este utilizat ca dielectric, natura chimică a oxidului de la interfață este reflectată în mărimea curentului sursă – drenă. Suprafața oxidului de la poartă conține grupe funcționale  $-\text{OH}$ , care se află în echilibru electrochimic cu ionii din soluția probei ( $\text{H}^+$  și  $\text{HO}^-$ ). Grupele hidroxil de la suprafața oxidului de la poartă pot accepta sau ceda protoni iar o schimbare de pH va modifica potențialul de la suprafața  $\text{SiO}_2$ . Cinetica disocierii locale descrie traducerea semnalului în funcție de starea de ionizare a grupelor  $\text{SiOH}$  de la suprafața amfoterică.

Valorile standard ale sensibilității pH măsurate cu ISFET- $\text{SiO}_2$  sunt 37 – 40 mV/unitate pH. Selectivitatea și sensibilitatea ISFET sunt controlate complet de proprietățile la interfața electrolit/dielectric. Alte materiale anorganice de poartă pentru senzorii pH ca  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  au proprietăți mai bune decât  $\text{SiO}_2$  la răspuns în pH, histerezis sau drift mai mic. ISFET-urile au fost alese ca elemente transductoare pentru că suprafața de  $\text{SiO}_2$  conține grupe reactive  $\text{SiOH}$  care pot fi folosite pentru atașări covalente ale moleculelor organice și polimerilor [6-10].

#### MEMFET, SURFET

ISFET-ul poate fi modificat cu o membrană sensibilă, ce conține ionofori. Dacă oxidul este acoperit cu o membrană sensibilă la ioni, acest lucru este cunoscut sub denumirea de MEMFET. În acest caz, stratul este penetrabil pentru ionii specifici iar potențialul membranei se modifică fiind detectat de structura FET. Un FET sensibil la ionii de potasiu  $\text{K}^+$  a fost obținut prin acoperire din solvenți cu o membrană PVC plastifiată conținând valomicina la suprafața oxidului de la poarta. SURFET este un ISFET cu un strat ce blochează anumite specii de ioni, sensibili la pH-ul dielectricului porții. La suprafața acestui strat, potențialul de suprafață este stabilit de asocierea selectivă a ionilor. Un exemplu de SURFET este ISFET-ul cu poartă de perilenă cu molecule benzo 18-crown-6 ionofore ce selecționează ionii de potasiu. În contrast cu MEMFET, unde coeficientul de asociere al ionoforilor cu ionii recunoscuți de membrană determina selectivitatea, în SURFET este același proces dar faza apoasă (electrolitul) controlează selectivitatea.[7-12,18,21]

#### CHEMFET

ISFET-urile modificate cu membrane plastifiante PVC sunt lipsite de o interfață bine definită. Studiile au arătat că schimbări în concentrațiile de dioxid de carbon influențează puternic măsurătorile. Acest lucru a fost atribuit difuziei dioxidului de carbon prin membrană cu formarea acidului carbonic la interfața dintre membrană și oxidul de la poartă. Consecutiv, concentrația protonilor, care determina potențialul la interfața membrană-dielectric, prezintă variații mari. Acest fenomen se explică prin existența unei cantități mari de apă în PVC în consecință și o concentrație apreciabilă de  $\text{H}^+$ . Rolul de interpunere a  $\text{CO}_2$ , duce la necesitatea unei mari cantități de apă din interiorul matricei membranei, în consecință un nou tip de membrană se impune. După mai multe încercări descrise în literatura de specialitate, s-a găsit soluția de a modifica direct suprafața oxidului prin atașarea de grupe funcționale sau de membrane funcționalizate cu 3-(trimetoxi-silil) propil metacrilat. Noile tipuri de senzori se numesc CHEMFET (chemically modified

FET) care pare să rezolve în mare măsură problemele. Suprafața modificată cu metacrilat poate mai departe reacționa cu monomerii vinil, metacrilil sau prepolimeri.

Utilizarea monomerilor fotopolimerizabili hidroxietil metacrilat (HEMA) este avantajos din punct de vedere al producției a CHEMFET-urilor, care este în general bazată pe fotolitografie. Introducerea unui asemenea strat de hidro-gel, în care o soluție apoasă tampon de săruri poate fi absorbită, între oxidul de la poartă și membrană elimină interferența  $\text{CO}_2$  la răspunsul CHEMFET. Mai mult, acesta stabilizează potențialul dezvoltat în membrana senzitivă (figura 6.2). Răspunsul pentru diferite valori de pH respectiv pentru diferite potențiale de referință sunt prezentate în figura 6.3.

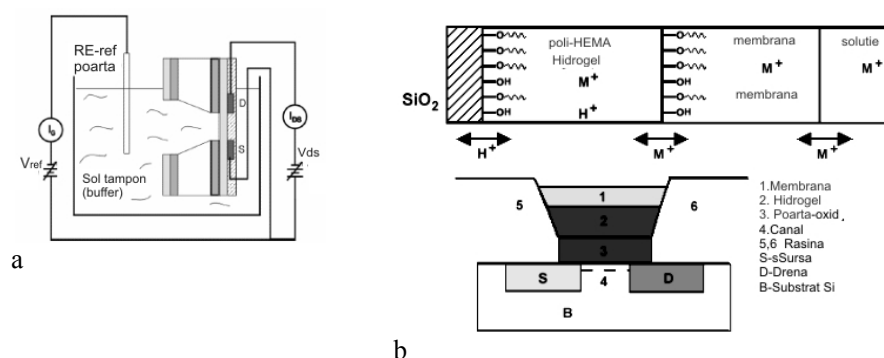


Figura 6.2 – a) Model de senzor CHEMFET, cu electrodul de referință (RE) în soluție tampon b) Reprezentarea schematică a dispunerii în CHEMFET a straturilor de polimer modificat pe poarta de  $\text{SiO}_2$ . Rolul hidrogelului HEMA și a membranei modificate chimic de selectare ioni și transfer de ioni

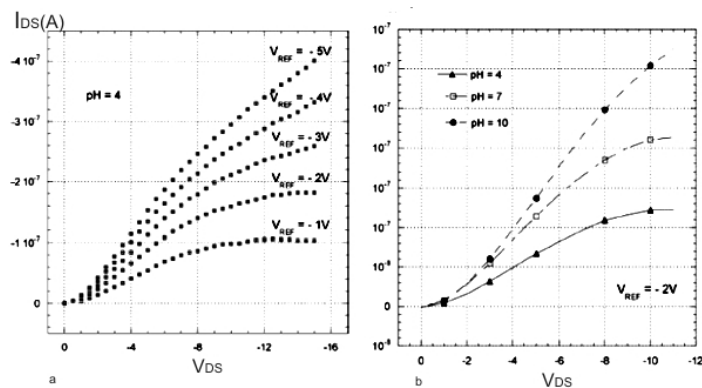


Figura 6.3 - a) Caracteristici ale sistemului CHEMFET –electrod de referință Ag/AgCl- înregistrate pentru o soluție tampon cu pH=4, b) Curentul de drenă ,  $I_{ds}$ , în diferite soluții tampon (pH=4, pH=7, pH=10) pentru același potențial  $V_{ref} = -2V$

Problemele interfeței membrană/poartă, au fost rezolvate prin funcționalizare HEMA cu funcțiuni hidroxietil astfel asigurându-se atașări chimice a gelului poli (2 hidroxietil metacrilat) (poliHEMA) între membrana hidrofobă și stratul de oxid de la poarta.

Aceasta nouă arhitectură a FET-urilor ne permite să facem noi senzori chimici cu membrane polimerice ce conțin receptori moleculari. Au fost dezvoltati câțiva tranzistori CHEMFET selectivi la  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ag^+$ , cationi a metalelor tranziționale ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) și la anioni ( $NO_3^-$ ). Senzorii prezintă un timp de viață limitat din cauza extragerii prin dizolvare a componentilor electroactivi, adică liganzii și locurile ionice. Componentii electroactivi cu lipofilia crescută pot fi aplicați pentru a crește durabilitatea senzorului, dar o metodă mai eficientă este bazată pe ancorarea covalentă a acestor componente la matricea membranei.

Utilizarea membranelor ce conțin legături covalente ionofore și locuri ionice dispuse la legături covalente îmbunătățesc semnificativ durabilitatea CHEMFET-urilor [8-16]

#### REFET

Utilizarea electrozilor convenționali de referință limitează în mare măsură aplicațiile ISFET-urilor în domeniile unde se cer dimensiuni reduse ale acestora. Dezvoltarea unui electrod de referință miniaturizat (**REFET – reference field effect transistor**) este de mare interes pentru acești senzori. Una dintre încercările de a rezolva problema este fabricarea electrozilor prin ink-jet sau screen printing (serigrafie) din Ag/AgCl ce includ o cavitate umplută cu gel și un tampon poros de siliciu. Toate construcțiile au dezavantajul unei cavități interioare umplute cu lichid, ceea ce înseamnă un timp de viață limitat din cauza lipsei soluției de referință. O mai bună rezolvare a problemei electrodului de referință poate fi utilizarea a două ISFET-uri chimice diferite, ce operează diferențial cu un electrod de cuasi-referință (QRE) comun (ex.: metal conductor, Pt) care poate fi integrat cu ușurință pe un cip. Acest dispozitiv are avantajul adițional că poate reduce perturbările externe ce influențează ambele ISFET-uri (ex: lumina și temperatura). Suprafața oxidului de la poartă are sensibilitate la pH datorită prezenței grupelor hidroxil care se pot disocia și pot accepta protoni. S-a găsit că eliminarea totală a grupelor sensibile la pH nu poate fi realizată prin modificarea chimică a monostratului. Sensibilitatea la pH poate fi diminuată atașând la suprafața porții un strat polimer hidrofob blocator de ioni. În această modificare polimerul este chimic legat la suprafața porții, ceea ce se traduce printr-un timp de viață îndelungat. Pentru straturile blocatoare de ioni, o atașare stabilă a fost realizată prin depunere în plasmă. Oricum, au fost observate variațiile potențialului cu compoziția electroliților pentru REFET-uri modificate.

Depunerea de straturi polimerice foarte subțiri este limitată din cauza diminuării sensibilității electrice (transconductanța cește cu grosimea dielectricului).

În contrast cu polimerii blocatori de ioni, modificarea REFET-ului cu polimeri ne-blocatori de ioni (conductivi) au avantajul unei trans-conductanțe echivalente a REFET-ului cu ISFET-ul. Asemenea membrane hidrofobe nebloatoare de ioni dau senzorului un timp de viață mai scurt dacă nu sunt ancorate chimic la suprafață. Două tipuri de structuri REFET pot fi distinse ce rezolvă problema penetrării ionilor în stratul polimer rezultând din două mecanisme diferite de operare. Într-o structură REFET nebloatoare de ioni există schimb de ioni între soluție și polimer iar la echilibru termodinamic dintre ionii din soluție și cei din polimer conduce la potențial electric al membranei. Într-o structură blo-

catoare de ioni REFET, schimbul de ioni este neglijabil și în acest caz potențialul electric măsurat este potențialul suprafeței rezultate din reacțiile reversibile ion-complecși de la interfața polimerului [8-20].

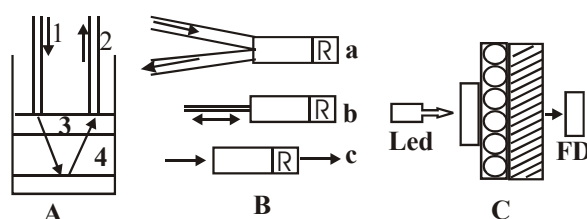
## 6.2 Referințe

1. Bergveld P., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-17**, 70 (1970).
2. Sze, S. M., *Physics of Semiconductor Devices*, Wiley, New York 431, (1981)
3. Dolocan V., *Fizica electronica a starii solide*, Ed. Academiei 1(1984)
4. Munteanu I., *Fizica solidului*, Ed Credis, (2005)
5. Bousse L., and Bergveld P., *Sens. Actuators*, **6**, 65 (1984).
6. Van den Berg A., Bergveld P., Reinhoudt D.N., and Sudholter E.J.R., *Sens. Actuators*, **8**, 129 (1985).
7. Bousse L., de Rooij N.F., and Bergveld P., *IEEE Trans. Electron. Devices*, **ED- 30**, 1263 (1983).
8. Sibbald A., *IEE Proc.*, **130**, 233 (1983).
9. Blackburn G.F., and Janata J., *J. Electrochem. Soc.*, **129**, 2580 (1982).
10. Van der Wal P., Skowrońska-Ptasińska M., van den Berg A., Bergveld P., Sudholter E.J.R., and Reinhoudt D.N., *Anal. Chim. Acta*, **231**, 41 (1990).
11. Sudholter E.J.R., van der Wal P., Skowrońska-Ptasińska M., van den Berg A., Bergveld P., and Reinhoudt D.N., *Anal. Chim. Acta*, **230**, 59 (1990).
12. Fiedler U., and Ruzicka J., *Anal. Chim. Acta*, **67**, 179 (1973).
13. Mascini M., and Palozzi F., *Anal. Chim. Acta*, **73**, 375 (1974).
14. Brzózka Z., Holterman H.A.J., Honig G.W.N., Verkerk U.H., van den Vlekkert H.H., Engbersen J.F.J., and Reinhoudt D.N., *Sens. Actuators*, **18-19**, 38 (1994).
15. Reinhoudt D.N., Engbersen J.F.J., Brzózka Z., van den Vlekkert H.H., Honig G.W.N., Holterman H.A.J., and Verkerk U.H., *Anal. Chem.*, **66**, 3618 (1994).
16. Van der Wal P.D., Sudholter E.J.R., and Reinhoudt D.N., *Anal. Chim. Acta*, **245**, 159 (1991).
17. Cobben P.L.H.M., Egberink R.J.M., Bomer J.G., Bergveld P., Verboom W., and Reinhoudt D.N., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10573 (1992).
18. Cobben P.L.H.M., Egberink R.J.M., Bomer J.G., Haak J.R., Bergveld P., and Reinhoudt D.N., *Sens. Actuators*, **6**, 304 (1992).
19. Dumschat C., Fromer R., Rautschek H., Muller H., and Timpe H.-J., *Anal. Chim. Acta*, **243**, 179 (1991).
20. Smith R.L., and Scott D.C., Proc. of the Symposium on Biosensors, *IEEE 84*, CH-2068-5, 61 (1984).
21. Smith R.L., and Scott D.C., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, BME 33, 83 (1986).
22. Kuisl M., and Klein M., *Messtechnik*, **36**, 48 (1983).
23. Bergveld P., van den Berg A., van der Wal P.D., Skowrońska-Ptasińska M., Sudholter E.J.R., and Reinhoudt D.N., *Sens. Actuators*, **18**, 307 (1989).
24. van den Berg A., van der Wal P., Ptasiński D., Sudholter E.J.R., Reinhoudt D.N., and Bergveld P., *Proc. of the 2nd International Meeting on Chemical Sensors*, Bordeaux, , 419. (1986)

## 7. Biosenzori cu fibră optică

Biosenzorii optici corelează variația concentrației masei, cu modificarea unor parametri caracteristici luminii: lungimea de undă, indicii de refracție, polarizarea, absorbanța, extincția, fluorescența, chemiluminiscenta, rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR)

Există câteva configurații tipice de biosenzori pe fibră optică, ele fiind sistematizate în figura 7.1



Senzori optici:

A- principiu de funcționare: 1-fibra optica incidenta

2-radiatia reflectata, 3-fereastra, 4- reactiv -R

B- tipuri de senzori: a-cu fibra optica bifurcata,

b- monofibra cu separare radiatie incidenta/reflectata

c- transmisie

C- senzor otic pentru determinarea albuminei

O-film albumina, ///-membrana bromcrezol,verde

FD- fotodiada

Figura 7.1 – Trei tipuri de biosenzori cu fibră optică. Principii de funcționare

Ei încorporează una sau două fibre optice. Dacă este folosită doar o fibră optică, este necesar ca cele două radiații luminoase: cea incidentă și cea de referință, să se modifice în timp și de asemenea să își modifice lungimea de undă. Lumina incidentă trebuie să fie în limitele unghiului de reflexie totală, deci forma geometrică a suprafeței senzorului are o importanță esențială (figura 7.1 A). Cel mai important domeniu de aplicație al unui asemenea tip de senzor este determinarea fluorescenței celulei, care depinde de raportul NADH/NAD intracelular, obținând astfel o măsurare precisă a stării celulei.

Senzorii optici prezintă următoarele avantaje:

- Nu sunt perturbați de câmpul electric,
- Pot fi utilizați în măsurători repetate în măsurători repetate,
- În timpul măsurătorilor proba rămâne neschimbată, din punct de vedere chimic și fizic
- Se folosește cu protecție la întuneric; lumina diurnă influențează procesele de măsurare.

Pe lângă fibra optică, acești senzori mai conțin o sursă de lumină și un traductor de semnal. Principiul de funcționare se bazează pe dependența dintre concentrația substratu-

lui și absorbția luminii sau variația oricărui tip de proprietate optică. Membrana sau suportul sensorului, acoperită cu conținut de oxigen sau cu alți indicatori de pH, markeri fluorescenți, prezintă reacții de cuplaj cu diferite enzime cum ar fi conversia glucozei, lactozei, etanolului și complexului antigen – anticorp.

Senzori optici cu oxidanți imobilizați pentru determinarea glucozei, acidului uric și penicilinei au fost obținuți de Kobayashi [1]. În acest caz măsurarea semnalului se face prin chemiluminiscență care depinde de conversia peroxidului de hidrogen la luminol. Semnalul de răspuns al suprafeței respective la lumina transmisă de fibră, sub acțiunea peroxidilor permite măsurarea peroxidului de hidrogen, ATP-ului și NADH-ului [2]. În figura. 7.1.C este prezentat senzorul optic pentru determinarea albuminei serului uman.

Schimbarea culorii bromcrezolului verde este folosită pentru măsurarea semnalului. Schimbarea polarizării luminii sau a grosimii substratului ne dau informații asupra cuplajului molecular când nu intervin reacții auxiliare. Prin această metodă, formarea complexului de molecule mari antigen- anticorp absorbit de o suprafață reflectantă de siliciu poate fi sesizată direct ( figura 7.2)

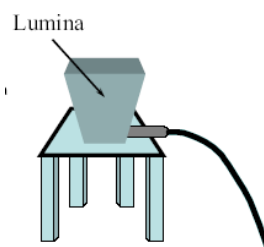
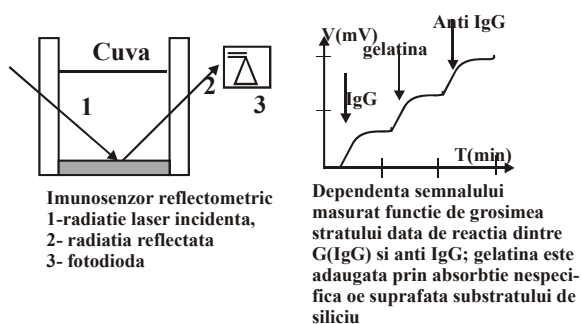


Figura 7.2- Principiul de funcționare a imunosenzorilor reflectometrici      Figura 7.3 – Experimentul Tyndall

### 7.1 Fibre optice, caracteristici generale

În 1870 Tyndall (figura 7.3) a demonstrat că lumina se poate propaga într-un jet de apă curbat. Acesta poate fi considerat ca primul pas spre comunicații prin medii optice

- Spre sfârșitul secolului, Alexander Graham Bell a fost primul care a încercat să transmită informații în sensul modern, folosind lumina. Dispozitivul său se numea fototelefon și era folosit pentru a transmite voce cu ajutorul luminii solare pînă la distanța de 200 m. Lumina solară era modulată de emițător cu ajutorul unei diafragme acționată de microfon. Receptorul capta lumina emisă de emițător și o concentra pe o rezistență de seleniu prin care trecea un curent, proporțional cu fluxul luminos care cădea pe rezistență
- În anul 1934, americanul Mormon French a patentat un dispozitiv numit telefon optic, dispozitiv care unea ideile lui Bell și Tyndall. Patentul descria un aparat care transmitea vocea cu ajutorul luminii, ca mediu de comunicație fiind folosit un cablu optic



- În anul 1964, Premiul Nobel a fost atribuit inventatorilor laserului într-un articol publicat în anul 1966 în Anglia Charles Kao și George Hockham susțineau că fibra optică putea fi folosită pentru a transmite informații; totuși, exista o problemă: pentru a putea face posibil transferul prin fibra optică, aceasta trebuia să aibă o atenuare mai mică de 20 dB/km, comparată cu 1000 dB/km obținuți în acel moment.
- În anul 1970 compania Corning Glass Works din Statele Unite a reușit să obțină o atenuare mai mică de 20 dB/km cu fibră optică multimod step index la 633 nm
- În anul 1972 se fabricau fibre optice multimod cu index gradient ce aveau o atenuare de 4 dB/km.
- În prezent, atenuarea unei fibre optice monomod cu index treaptă este mai mică de 0,20 dB/km la lungimea de undă de 1550nm.

Fibra optica este un mediu de comunicație folosit pentru a transmite semnalele luminoase. În termeni științifici, fibra optică este un ghid de unda pentru radiațiile electromagnetice. Avantaje ale fibrei optice asupra tehnologiilor convenționale:

- Distanțe mari între repetoare (peste 120 km comparat cu 2 km la sistemele bazate pe pulsuri electrice mare importanță pentru comunicațiile de date și pentru aplicațiile industriale o are faptul că transmisiile prin fibra optică sunt imune la interferențe exterioare
- Distanțele mari între repetoare la fibră optică sunt posibile datorită atenuării mici a semnalului; fibrele optice singlemode au o atenuare mai mică de 0,20 dB/km, ceea ce înseamnă că după 40 de km parcuși în fibră, 10% din semnal rămîne

Tehnicile de măsurare optică au aparut de mai mult de un secol, dar actualul reviriment în domeniul detecțiilor cu fibra optică a început în deceniul 7, odată cu dezvoltarea conecticii pe baza de fibra optica pentru industria de telecomunicații. Anterior, cu câteva mici excepții, măsurătorile precise cu ajutorul fibrelor optice erau efectuate în laboratoarele metrologice. La sfârșitul anilor 1970, a devenit tot mai evident că fibrele optice ar putea fi utilizate pentru a conecta sursa optica și aparatura electronică de detecție pentru măsurători, permițînd chiar folosirea celor mai sensibile tehnici interferometrice în medii ostile precum tuneluri de vînt și în mediul submarin. Cercetările inițiale s-au axat pe folosirea senzorilor cu fibră optică pentru monitorizarea parametrilor fizici precum temperatura și presiunea, dar în deceniul 8 s-a constatat ca exista un potential real în domeniul chimic și medical. Un fapt important a intervenit în anul 1989 cînd s-a inventat o tehnică simplă de producere a fibrelor optice cu rețele Bragg. Figura 7.4 arată construcția unei fibre optice tipice din silice (bioxid de siliciu). Un miez cilindric din sticlă este înconjurat de către un înveliș construit dintr-o sticlă cu un indice de refracție mai mic.

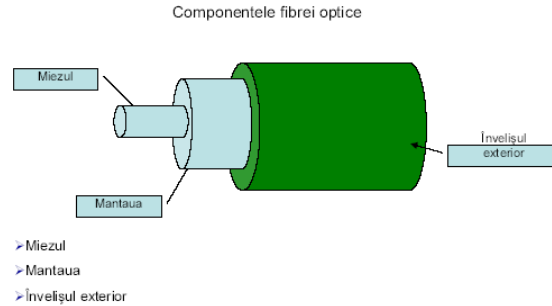


Figura 7.5- Elementele constructive ale fibrei optice

Pentru protecție sunt adăugate mantale de plastic. Fibrele optice pot fi într-o varietate de mărimi, dar un înveliș obișnuit are un diametru de 125 micrometri, în timp ce miezul variază de la câțiva micrometri până la 50 micrometri. Proprietățile de bază privind propagarea luminii pot fi înțelese din punct de vedere conceptual prin principiul reflexiei interne totale [3], care se referă la incidența unei unde de lumină la contactul dintre două materiale cu indici de refracție diferiți. Când fasciculul de lumină trece dintr-un mediu cu indice de refracție mare într-un mediu cu un indice de refracție mai mic, acesta apare la un unghi  $r$  mai mare decât unghiul de incidență  $i$  (Figura 7.5a). Aceasta înseamnă că, în cazul creșterii unghiului  $i$ , se va ajunge ca unghiul  $r$  să fie de  $90^\circ$ , cunoscut ca unghi critic ( $i_c$ ) (Figura 7.5b). Dacă unghiul de incidență este mai mare de  $i_c$ , atunci radiația luminoasă este reflectată, învelișul exterior comportându-se ca o oglindă (Figura 7.5c). În cazul unei fibre optice, atît timp cît fasciculul este incident pe suprafața de contact dintre înveliș și miez, la un unghi mai mare decît cel critic, acesta va fi reflectat și deci confinat în miez.

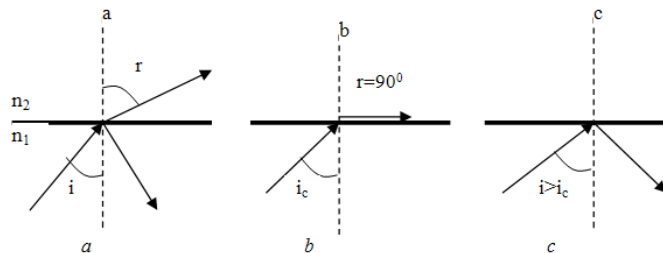


Figura 7.5- Ilustrare a propagării luminii dintr-un mediu cu indice de refracție  $n_1$  într-un mediu de refracție cu  $n_2$  ( $n_1 > n_2$ ) și a fenomenului de reflexie totală, principiu de bază a propagării luminii într-o fibră optică.

Recent, au început să fie produse fibre optice avînd în componența lor goluri de aer dispuse axial, de diferite forme. Prima categorie se compune din fibre în care zona conductoare este formată dintr-un defect constînd dintr-un gol de aer într-o structură omogenă (Figura 7.6b,c).

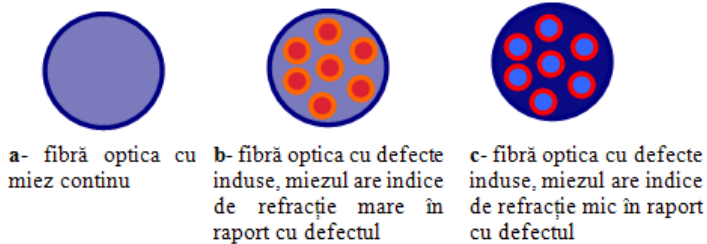


Figura 7.6- Tipuri de fibră optică de ultimă generație

În figura 7.6 b fibra este formată prin adăugarea goluri suplimentare în structura fibrei. În acest caz, miezul este cel care are un indice de reflexie mai redus prin comparație cu materialul ce-l înconjoară astfel, propagarea nu poate surveni prin aplicarea principiului reflexiei interne totale. În schimb, în partea alcătuită din goluri axiale propagarea este oprită pentru o anumită lungime de undă. În figura 7.6 c defectul are un indice de refracție mai mare față de miezul fibrei: propagarea luminii se realizează prin același proces ca și la fibrele convenționale, defectul formînd un miez cu un indice de reflexie ridicat în timp ce structura înconjurătoare defectului se comportă ca un înveliș cu un indice de reflexie mai scăzut decît cel al miezului, determinat de forma și proporțiile relative ale aerului și sticlei;

## 7.2 Fibre optice cu rețele Bragg induse

Rețele de tip Bragg sunt o modificare locală în structura internă a fibrei prin reflectarea unui fascicul de lumină de o anumită lungime de undă, în timp ce le permite celorlalte să treacă. Lungimea de undă pentru care un fascicul de lumină este reflectat de-pinde de presiunea sau temperatura aplicată în zona rețelei Bragg; astfel, prin activarea unei surse de lumină cu un spectru larg de lungimi de undă în fibra optică și prin monitorizarea lungimii de undă a razei reflectate, cu ajutorul unui spectrometru, se poate măsura temperatura sau presiunea aplicată.

Rețelele Bragg prezintă un interes special pentru că acestea se formează în interiorul fibrei. Senzorul astfel format este extrem de compact și poate fi înglobat cu ușurință în alte materiale compozite. În plus, cîteva rețele Bragg pe aceeași fibră permite funcționarea lor în sistem multiplex, permițînd astfel măsurătoro în multiple zone. Printre senzori de un considerabil interes actual se află fibrele optice cu rețele Bragg [4]. Acesta este un sensor intrinsec căruia i-a fost impus o modulare periodică spațială a indicelui de refracție a miezului unei fibre monomod. Modulația este produsă în mod normal de expunerea fibrei la două unde de lumină ultraviolet; interferența lor produce o distribuție în variația intensității axiale (Figura 7.7). Modificarea indicelui de refracție este continuă.

Sensibilizarea la lumina ultraviolet se produce în mod obișnuit datorită dopanților folosiți pentru controlarea indicelui de refracție a miezului. Soluția alternativă constă în sensibilizarea fibrei prin expunerea la hidrogen, prin expunere la presiune mare [5].

Efectul în fibrele optice cu rețele Bragg constă în reflectarea undelor de lumină ce satisfac condiția Bragg  $\lambda_B = 2n\Lambda$  unde  $n$  este indicele de refracție, iar  $\Lambda$  este distanța dintre maximele modulației indicelui de refracție. Ambele depind de presiunea și temperatura la care este supusă fibra optică cu rețele Bragg. Astfel, prin iluminarea fibrelor optice pe rețele Bragg cu o sursă de lumină cu un spectru larg de lungimi de undă și monitorizarea lungimii de undă a fasciculului reflectat se poate măsura temperatura și presiunea.

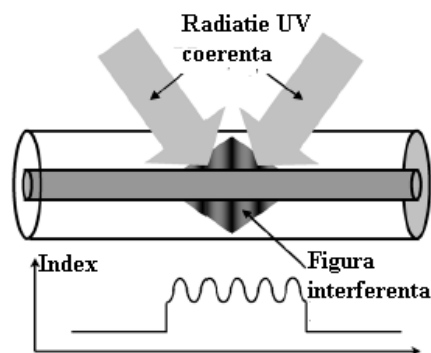


Figura 7.7- Principiul senzorului cu rețea Bragg de interferență:  $\lambda_B = 2n\Lambda$ ,  $n$ -indice de refracție,  $\Lambda$ -distanța dintre două maxime consecutive,  $\lambda_B$ -lungimea de undă a radiației reflectate

### 7.3 FOBS în medicină

Fibra optică ca senzor poate fi plasată în pielea pacientului sau în interiorul corpului lui pentru a măsura direct parametri biomedicali. Senzorul cu fibră optică este propus a se folosi în multe și rapide determinări medicale, iar aplicațiile lui se extind continuu. Indubitabil, proliferarea acestor tipuri de aplicații pentru senzorul cu fibră optică conduce la un număr mare de aplicații și combinații ale acestora care în viitor vor conduce la microminiaturizare, versatilitate, funcționalitate. El poate fi atașat în interiorul unui cateter și introdus în țesutul hipodermic, realizând o minimă monitorizare acolo unde este nevoie. Senzorul cu fibră optică este netoxic, inert chimic, și se poate folosi cu succes în interiorul organismului. El se poate asocia cu echipamente pentru monitorizarea pacientului. Este simplu de manipulat cu greutate neglijabilă. Evoluția senzorului medical cu fibră optică se bazează pe multiplele performanțe și biocompatibilitate.

Biocompatibilitatea este primul pas în confortul pacientului, biosenzorul nu trebuie să afecteze parametrii fiziologici a organismului dar nici funcționalitatea lui nu trebuie compromisă de producții de dezasimilație a pacientului. Senzorii cu fibră optică pot fi clasificați ca extrinseci, fibra acționează ca o cale pentru semnal și intrinseci, interacțiunile survin în fibra însăși. Se disting trei tipuri de FOBS:

- Senzori noninvazivi care sunt în contact cu pielea;
- Senzori minimal invazivi, care sunt introduși în cavitățile organismului;
- Senzorii invazivi, care sunt introduși în organele interne sau în vasele de sânge

#### *Aplicații în medicină*

În ultimul deceniu fibră optică este un produs foarte folosit în toate domeniile de vîrf ale științei și tehnologiilor avansate. Era de așteptat ca și științele medicale să beneficieze de aceste avantaje pe care le oferă fibra optică, atât în ceea ce privește costurile dar și competențele acestui material nou. Avînd în vedere ușurința cu care se poate manipula, posibilități nelimitate de sterilizare, costuri reduse, se poate estima că acest produs va cucerii tot mai mult piața medicală. Pînă în prezent se cunosc următoarele domenii medicale care au recurs la folosirea de biosenzori cu fibră optică:

- În medicina de urgență și în cardiologie: analiza elementelor sîngelui, saturația în oxigen a hematiilor, analiza gazelor sîngelui, pH ul sîngelui.
- În monitorizarea respirației
- În angiologie: monitorizarea perfuziilor microvasculare.
- În aprecierea refluxului biliar prin absorbția directă a bilei de către pigmentul biliar, bilirubină.
- Determinarea facilă a pH-ului stomacului; se introduce un microabsorbant indicator și modulator de pH, acid –alcalin.
- În oncologie se urmărește monitorizarea temperaturii în timpul curelor de terapie citostatică, sau se diagnostichează tumorile de dimensiuni mici și foarte mici, greu abordabile.
- În oftalmologie, se poate depista o cataractă la debutul ei.
- În dermatologie se poate testa calitatea și integritatea straturilor pielii, se pot depista tumori de dimensiuni mici, se poate folosi în cosmetică pentru refacerea țesuturilor prin stimulare, sau în eritema. În ceea ce privește diagnosticul unor piodermite se poate folosi un biosenzor cu fibră optică, care se bazează pe consumul de oxigen (BOD).
- În stomatologie se pot diagnostica cariile de dimensiuni foarte mici care sunt inaparente, sau cele de sub alte lucrări dentare. De asemeni se poate aprecia culoarea dinților sau integritatea nervului dintelui.[6].

Principalele tipuri de aplicații ale senzorilor în scopuri biomedicale sunt prezentate în tabelul 7.1:

Tabela 7.1 – FOBS- aplicații medicale, clasificare

**Cardiovascular, terapie intensiva**

1. Saturarea cu oxigen a sîngelui	1. Reflectanța direct a elementelor din componenta sîngelui.
2. PH-ul sîngelui	2. Fluorofori legați covalent pe o matrice de celuloză atașată pe capătul FO
3. Continutul de gaze din sînge $P_{CO_2}$ (presiunea parțială)	3. Determinarea pH cu fluorofori în contact cu o soluție tampon de bicarbonat. Concentrația de $CO_2$ – măsurată prin pH ca o variație a presiunii parțiale
	4. Fluorofori fixate în matrice polimera la capatul fibrei optice; atenuarea fluorescenței cu concentrația de oxigen

**Monitorizarea respirației**

Rata respirației: fibra optica în conductul nazo-faringian;  
Modificarea reflexiei cauzată de umiditatea aerului în timpul respirației

**Angiologie**

1. Perfuzie microvasculara	Măsurarea debitelor prin efect Doppler a radiației laser;
2. Fluidica sîngelui	retroîmprăștierea radiației laser; analiză spectrală.
3. Fluxuri biliare	Microdeformările fibrei optice sub acțiunea presiunii sîngelui .
4. pH - stomacului	Fibra optică se dispune între plăci rigide Controlul Bilirubinei pH- controlat de variații alcalin-acide din tractul digestive; Microsfere: Metacresol purpuriu – albastru bromophenol fixat în poliacrilamide situate în capatul fibrei optice, care la randul lui este imersat în tubul de dializa

**Oncologie**

1. Monitorizarea temperaturii în timpul terapiei	Atenuarea fluorescenței Recunoașterea naturii tumorii prin tehnici de autofluorescență: excitare cu laser He-Ne a unui țesut și analiza fluorescenței prin fibre optice
2. Diagnoza tumorală	
3. Presiune	Interferometrie Fabry-Pérot

**Oftalmologie**

Analiza evoluției cataractei      Imprăștierea dinamică a luminii

**Dermatologie**

Controlul dermatologic al pielii      Umiditatea pielii

**Stomatologie**

- |                          |  |
|--------------------------|--|
| 1. Culoarea dentara      | Spectroscopie de reflexie de banda larga |
| 2. Starea pulpei dentare | Saturarea cu oxigen a pulpei dentare     |

**Monitorizarea sîngelui , oximetria**

Ca răspuns la cererile medicilor, senzorii cu fibră optică pot monitoriza acum electroliții din sînge precum potasiu, sodiu și calciu, în plus fata de conținutul de gaze în sînge. Aici miniaturizarea fibrelor optice este din plin folosită. În figura 7.8 este prezentat un cateter din fibre optice (0,5 mm diametru) ce poate fi introdus în aorta descendentă capabil prin cele trei tipuri de fibre să măsoare concentrația de gaze și pH ul sîngelui: măsu-

rarea saturatiei oxigenului, care reprezinta cantitatea de oxigen transportata de hemoglobina din hematii în funcție de capacitatea sa maximă. Materialele din care sunt alcătuiți traductorii chimici sunt ionofori care se pot fixa reversibil de electrolit un separator molecular (spacer) și respectiv fluoroforul. Gradul de fluorescență, prin excitație cu diode electroluminiscente în violet, este modulată de ionofori proporțional cu concentrația de analit. Senzorul este utilizat fie extracorporeal în circuitul extern de analiză a gazelor din sânge fie intracorporeal pentru monitorizarea continuă a gazelor sanguine în cazul situațiilor critice ale bolilor copiilor nou născuți.

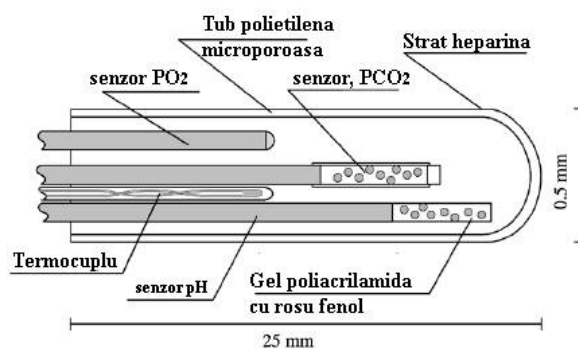


Figura 7.8 – FOBS-oximetru, pentru monitorizarea gazelor din sânge  
Senzorul este introdus prin cateter în circuitul aortei nou născutului

Accidentul cerebrovascular este cauzat de reducerea cantității de sânge către creier.

Dacă durata lipsei de alimentare cu sânge a creierului este prea mare, celulele creierului vor suferi schimbări ireversibile. Din acest motiv monitorizarea stării celulelor este de o mare importanță. Șocurile hemoragice sunt datorate rupturii vaselor sanguine sau cele ischemice datorate ocluzării vaselor (prin depuneri sau arteroscleroza).

Parametrul chimic capabil să monitorizeze starea celulei este pH deoarece acidul lactic, format când țesutul celulei moare produce o descreștere în pH. Orice scădere a pH ului sîngelui de la 7,4 indică prezența morții celulei. Cele mai recente realizări în domeniu sunt senzorii de pH invazivi ce determină starea celulei. Senzorul este format din colorant fluorescent încapsulat într-o matrice de gel (poliacrilamidă) atașată la capătul fibrei optice. Colorantul, seminaftorodamina-L-carboxilat este caracterizat prin emisia formei acide centrată pe 580 nm și a formei alcaline centrată pe 680 nm. Cele două forme sunt sensibile la pH. Excitația apare la 533nm pentru ambele forme. Separarea emisie se realizează direct prin filtre optice iar sensibilitatea este 0.05 unități pH mult sub limita standardelor clinice admise (0.1 pH).

#### *Monitorizarea streptococilor mutans din saliva umană și organul cutanat*

Caria dentară este o afecțiune multifactorială, o afecțiune bacteriană, care este caracterizată de o demineralizare a porțiunii anorganice a dintelui și de o distrucție orga-

nică a substanței dintelui. Numeroase experimente efectuate pe animale de laborator au scos în evidență că fiecare carie dentară are ca agent etiologic o specie de streptococi mutans.

Adevărata cantitate de agenți patogeni din interiorul cariei este dată de dimensiunea cariei. O investigație pe un număr de 235 de copii, cu vârste între 11-12 ani cu nici o carie dentară sau cu mici modificări ale structurilor dinților, sugerează că acest test salivar poate aduce reale informații despre riscul cariei dentare în special în cazurile în care medicul stomatolog nu poate evalua acest risc prin tehnicile obișnuite. Studiul în acest sens a arătat cu ușurință că aciditatea bacteriilor din genul *Streptococcus mutans* și *Lactobacilli*, ce formează colonii de  $10^5$  per mililitru sunt predictibile pentru riscul de carii dentare [7, 8].

Conținutul salivei umane în ceea ce privește încărcătura bacteriană este de aproximativ  $10^9$  per mililitru de salivă. De aceea salivă poate fi considerată un mediu selectiv pentru creșterea bacteriilor [9]. A fost demonstrată o corelație semnificativă între numărul streptococilor mutans în salivă și prevalența lor în problemele dentiției [10]. O metodă simplă a fost adaptată pentru detecția și numărarea streptococilor mutans, numită *Dentocult SM*, în anul 1998 [11]. *Dentocult SM* este un dispozitiv produs de Orion Diagnostica, Espoo, Finlanda, ce constă dintr-un suport special fabricat cu un mediu de cultură cu agar salivar ce conține 20% sucroză. Acesta este inoculat cu salivă și densitatea creșterii streptococilor umani este apreciată după o incubare de 48 de ore la 37 de grade C. Identificarea este morfologică a coloniilor distincte pe agar selectiv și neselectiv, pe forma distinctă a celulelor, vizibilă în lumina microscopului.

Această tehnică are și unele mici dezavantaje, acelea că are nevoie de timp mai mult pentru creșterea bacteriană și totodată necesită laboratoare adiționale, situate pe lângă cabinetele stomatologice.

Pentru a monitoriza activitatea streptococilor în saliva umană a fost creat un biosenzor cu fibră optică (FOBS) care monitorizează reacțiile cu sucroza mediate de *Streptococcus mutans* printr-un indicator fotosenzitiv imobilizat într-un învelis de sticlă poroasă. Suprafața miezului fibrei optice este tratată sau îmbrăcată într-un film de sticlă poroasă utilizând tehnica sol-gel [12]. Analiza spectroscopică a arătat că există două faze distincte în absorbția luminii la 597 nm pe o durată de 120 min: una între 0-60 minute, și alta de la 60-120 minute. Această investigație arată potențialul enorm pe care îl au biosenzorii în monitorizarea activității microorganismelor în organismul uman.

Tehnica sol-gel este utilizată pentru imobilizarea indicatorului fotosenzitiv, este simplă în vreme ce principiul mediului selectiv bacterian este folosit ca transfer specific pentru streptococii mutans necesită timp și este laborioasă. De aceea FOBS se dovedește a fi un test rapid de măsurare cantitativă a activității streptococilor mutans în Salivă. Totodată acest test se poate adapta și la alte domenii medicale unde activitatea bacteriană este implicată în distrucție celulară, sau tisulară.

În figura 7.9 este descrisă metoda de formare a unui biosenzor dintr-o fibră optică pentru observarea și detecția *S. Mutans*. Experimentele acestui studiu au urmărit faza de



recunoaștere biochimică a semnalului și faza analizei spectroscopice. Criteriile care au stat la baza conceperii unui montaj experimental [13, 14]:

1. Streptococci mutans sunt parțial anaerobi având o creștere optimă la 37<sup>0</sup>C,
2. Glucoziltransferazele și fructoziltransferazele din streptococci mutans, catalizează sinteza glucanului insolubil în apă și a polimerilor de fructan, în sucroză, formînd acid lactic ce se regăsește în saliva acidă
3. Streptococci mutans din saliva umană, sintetizează atât polizaharide extracelulare cît și intracelulare, din sucroză
4. Polizaharidele extracelulare ajută adîția bacteriilor la suprafața dintelui, în timp ce polizaharidele intracelulare sunt stocate pentru energia bacteriilor.
5. Aceste polizaharide, intracelulare, ajută bacteria să continue fermentația chiar și atunci cînd nu există o formă exogenă de hrană
6. Toleranța acidă a streptococilor face ca activitatea lor să continue chiar și la un pH scăzut.
7. Un pH indicator, fotosenzitiv, produce o culoare caracteristică, conform unui gradient de culoare, în funcție de pH –ul salivei și este folosit la construcția FOBS.

Pe baza acestor considerente s-a conceput și realizat un montaj experimental cu un spectrometru UV-viz cu fascicul dublu în care în locul unei cuve s-a introdus fibra optică.

În cuva de referință s-a utilizat soluția tampon cu albastru de bromfenol pentru diferite valori de pH, de la 4 la 7. Un experiment inițial a ajutat la determinarea lungimii de undă și a picului caracteristic pentru indicatorul din soluția tampon și pentru diferite valori de pH din salivă, induse de activitatea bacteriană.

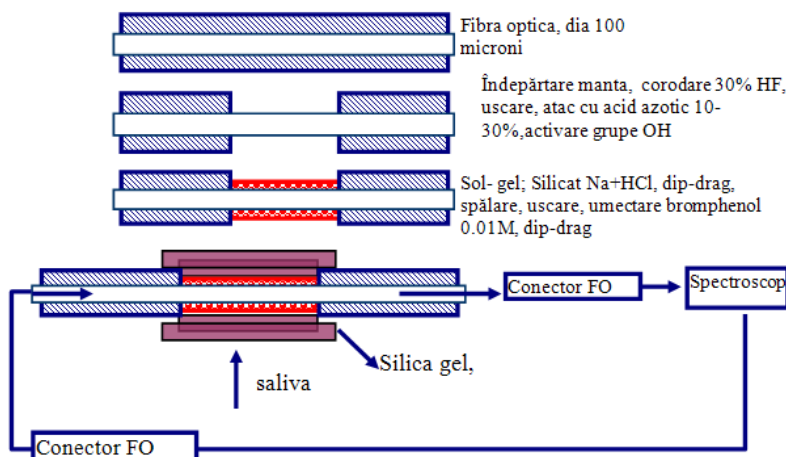


Figura 7.9- Senzor cu fibră optică pentru investigarea microorganismelor din salivă și organul cutanat

Analiza spectroscopică în UV-viz. la un pH de 4 și 7 al soluției cu albastru de bromfenol a arătat un pic proeminent la 590 nm lungime de undă. Intensitatea picului descrește de la pH 7 spre 4. Compararea cu datele din literatură au arătat o concordanță

bună observându-se că în mediu cu salivă, sucroză și albastru de bromfenol absorbția a fost stabilă la 590 nm lungime de undă pentru un interval de timp de 15 min, 30min, 1h și 24 de ore [15]. De notat că pentru fiecare set de fibre corodate și procesate ca în figura 7.9 necesită calibrare independentă datorită neomogenităților rezultate din etapele de pregătire a fibrei optice ( de origine OceanOptics- fibre pentru spectrometrul HR-2000)

#### 7.4 Referințe

- 1 Kawachi M. Kobayashi M., *Opt. Lett.* **9**, 183- (1984)
- 2 Mrs Bulletin, *Review in optical sensors* May ( 2002)
- 3 Hecht E. Zajac A., *Optics*, Addison-Wesley, Reading, MA, p. 81 (1974).
- 4 Rao Y.-J., *Meas. Sci. Technol.* **8** p. 355,(1997)
- 5 Bennion I., Williams J.A.R., Zhang L., Sugden K., Doran N.J., *Opt. Quantum Electron.* **28** p. 93, (1996)
- 6 Baldini F. Mignani A. G., *Bulletin Materials Research Society*, vol. 27, no. 5, (2002)
- 7 Kneist S, et all, *Journal of Dental Research* **75**, 1251-1259 (1998)
- 8 Emilson C. G, Bratthall D, *Journal of Clinical Microbiology* **4**, 95-98. (1976)
- 9 W. H. Bowen. *Salivary influences on the oral micro flora. in: Saliva and oral health*, second ed. Brithish Dental Journal, London,(1996)
- 10 Gronroos L., *Quantitative and qualitative characterization of mutans Streptococcus in saliva and in dentition*, Academic dissertation, University of Helsinki, Finland. (2000)
- 11 Alaluusua S, M.Nystrom, Gronroos L, Peck L, *Caries research* **23**, 49-54 (1989)
- 12 Brinker C. J, Scherer G. W., *Sol-Gel Science: the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, New York (1990)
- 13 Collins C. H., Patricia M. L., Grange J. M, *Microbiological Methods*, 7th ed. Butterworth-Heinemann Ltd, Great Britain (1995)
- 14 Lazar Veronica, *Microbiologie medicală*, Ed. Univ. Bucuresti. (2001)
- 15 Kischen A. et all. *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 1371- 1378, (2003)

## 8. Celule de biocombustie

O majoră provocare pentru dezvoltarea aparatelor medicale implantabile este găsirea surselor de curent potrivite. Acestea trebuie să fie capabile să genereze energie electrică pentru perioade lungi de timp.

Celulele sau pilele de biocombustie (BFC) promit mult în acest sens prin funcționarea lor pe baza reacțiilor pereche oxidarea glucozei – reducerea oxigenului molecular la apă. În condiții ideale, produsele secundare ale BFC ar fi dioxidul de carbon și apa.

Glucoza și oxigenul sunt amândouă prezente în celulele și țesuturile tuturor organismelor eucariote, inclusiv ale oamenilor. Este posibilă, de altfel, introducerea lor între resursele organismului, chiar și a proprietăților metabolice ale celulelor noastre pentru a genera suficientă energie pentru alimentarea aparatelor clinice cum ar fi sisteme de transport al medicamentelor, aparate de diagnosticare și dispozitive de creștere umană.

### **8.1 Necesitatea implementării surselor alternative de energie**

O problemă foarte complexă, căreia știința și tehnica contemporană trebuie să-i găsească soluție, este ritmul mereu crescând al nevoilor energetice, provocat de dezvoltarea continuă a industriei și de creșterea numărului de consumatori în toate sectoarele vieții sociale. În prezent se studiază o întreagă gamă de metode pentru generarea și stocarea energiei. Termeni ca economia hidrogenului, biocombustibili, combustibili regenerabili, celule fotovoltaice, pile de combustie sunt alternative la noi surse de energie ce trebuie să înlocuiască căile clasice. Un argument indiscutabil în favoarea căutării altor căi de conversie a energiei, îl reprezintă faptul că rezervele de combustibili fosili fiind în scădere (petrol: 40 ani, cărbuni: 224 ani, gaze naturale: 62 ani), costul lor va deveni curînd inacceptabil.

Dioxidul de carbon, cel mai insidios poluant este produs de vehicule și industrie în cantitate mai mare decît cea pe care plantele verzi o pot converti înapoi, la oxigen, prin procesul de fotosinteză și concentrația acestuia în atmosferă crește în timp. CO<sub>2</sub> absoarbe radiația IR, Pămîntul încălzit de Soare reradiaza ca un corp negru la cca 300K și această energie reradiată încălzește atmosfera; astfel, o parte din gheața polară se va topi conducînd la o creștere a nivelului apelor mărilor și oceanelor. În consecință, trebuie rezolvată problema folosirii energiei “curate” și trebuie găsită o cale convenabilă de stocare a energiei electrice (indiferent cum ar fi obținută ea), care să permită folosirea ei după necesități și în locații cît mai diversificate.

Lumea pare a fi în pragul unei noi ere, a tehnologiei avansate și a noilor combustibili. Atenția cercetătorilor este îndreptată către surse neconvenționale de energie, ca de exemplu: eoliene, solare, hidraulice, geotermale, mareice, nucleare. Aceste tipuri de energie nu sunt disponibile în orice moment, fiind variabile, imprevizibile și, în general, ne-transportabile de la locul de producere către cel de utilizare. Dar alte surse neconven-

ționale de energie, precum pilele de combustie, reprezintă o alternativă posibilă pentru viitor deoarece pot conduce la randamente superioare față de cele obținute în prezent.

Sistemele bazate pe motoare termice funcționează cu randamente de până la 50%, în timp ce teste tehnice au indicat pentru pilele de combustie randamente electrice de 70%

Rolul celulelor de combustie în viitor depinde de viteza cu care se vor epuiza combustibilii fosili și de viteza cu care vor deveni disponibile noile surse de energie. Dar, chiar dacă energia solară va fi disponibilă din abundență, pare probabil că va fi folosită pentru a obține  $H_2$  prin electroliza apei, care va fi stocat și trimis prin conducte (sub formă gazoasă) sau în rezervoare (sub formă lichidă) la locurile de trebuință, unde va fi folosit pentru a produce energie electrică cu ajutorul unor celule de combustie  $H_2/O_2$  (din aer). Printre căile cele mai noi de generare a energiei electrice, celulele de combustie au o utilizare tot mai diversă și eficientă o dată cu dezvoltarea și implementarea materialelor nanostructurate în elementele lor pasive și active. Transformarea energiei chimice în energie electrică, prin intermediul pilelor de combustie, deschide un larg domeniu de aplicații și prefațează noi descoperiri în domeniul mijloacelor de conversie directă a energiei chimice sau nucleare în energie utilă

## **8.2 Celule de biocombustie-celule bioelectrochimice**

Celulele sau pilele de combustie sunt dispozitive care transformă energia chimică a combustibililor (hidrogen, gaz natural, gazolină, etc.) și a oxidantului (oxigen sau aer) în energie electrică. Părțile componente ale unei celule combustibile sunt: electrozii (locul de producere a reacțiilor electrochimice), electrolitul (asigură transferul ionilor de la anod la catod) și conductorii electrici (asigură transferul electronilor prin circuitul exterior).

Sub influența catalizatorilor, de obicei metale platinice sau aliaje ale acestora, la anod se produce oxidarea hidrogenului, iar la catod reducerea oxigenului cu formarea și eliminarea produșilor finali (apă, electricitate și căldură). Principiile care guvernează performanța pilelor de combustie sunt cele termodinamice și cinetica proceselor de electrod pentru reacțiile care au loc la interfețele electrod – electrolit. Celulele de combustie se clasifică în principal după două criterii. Unul ia în considerare temperatura de funcționare iar celălalt electrolitul pe care-l utilizează.

Clasificarea se poate face ținând seama și de natura combustibilului (gazos sau lichid) sau de faptul că pila este alimentată direct cu combustibil sau cu produsul obținut după o prealabilă reformare a acestuia. După natura electrolitului utilizat se deosebesc următoarele tipuri de pile de combustie[1]:

- Celule de combustie cu electrolit alcalin (AFC)
- Celule de combustie cu membrane schimbătoare de protoni (PEMFC)
- Celule de combustie cu electrolit acid fosforic (PAFC)
- Celule de combustie pe bază de metanol (DMFC)
- Celule de combustie cu electrolit de tip carbonat topit (MCFC)
- Celule de combustie cu electrolit de tip oxid solid (SOFC)
- Celule de combustie regenerative (RFC)

- Celule de combustie pe bază de zinc și aer (ZAFC)
- Celule de combustie cu acizi solizi respectiv superacizi (SAFC)
- Celule de biocombustie = Celule bioelectrochimice (BFC)

### 8.3 Mecanisme în celulele bioelectrochimice

Celulele bioelectrochimice numite celule de biocombustie microbiene (MFC) sunt dispozitive ce extrag electroni din metabolismul microorganismelor prin cuplarea oxidării glucozei cu reducerea oxigenului molecular la apă. Electronii care apare în plasma membranei bacteriene sunt extrași din lanțul metabolic și canalizați către electrozi unde se descarcă pe o sarcină electrică din circuitul exterior. Pentru creșterea eficienței transferului de electroni din plasma membranei către electrozi au fost folosiți mediatori electronici (electronofori). Aceste molecule au proprietăți speciale de intermediere a transportului de electroni de la membrana celulei microorganismelor la electrozi.

Mediatorii intră în lanțul de transport electronic, fiind reduși în proces, după care se reoxidează transferând electroni anodului celulei.

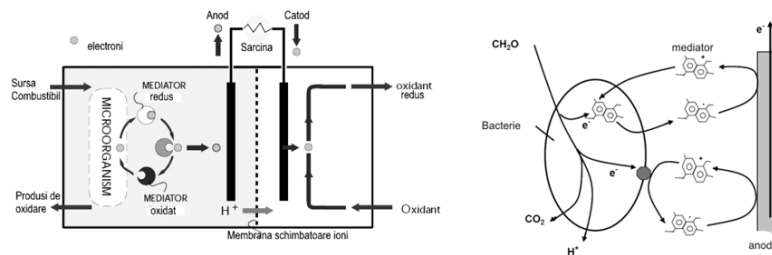
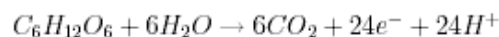


Figura 8.1. Reprezentarea schematică a principiului de funcționare a unei celule de combustie microbiene. Rolul mediatorului (dreapta) solubil care poate fi transportat în bacterie pentru reducere sau oxidare poate apărea la suprafața membranei. Mediatorul are rol de extracție electroni din procesul de metabolizare a materiei organice de către bacterie și transportul acestuia către anod

Principiul de funcționare a MFC ce utilizează combustibilul glucoza și un mediator de transfer de electroni este descris în figura 8.1. Oxidarea completă a unui mol de glucoză în dioxid de carbon va elibera 24 moli de electroni.

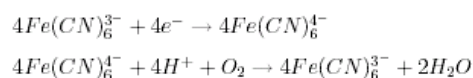


Astfel, este disponibilă o sarcină totală de  $2.32 \times 10^6$  C per mol de glucoză. Curentul generat de acest proces oxidativ va depinde de viteza metabolismului și de eficiența transferului electronic către electrod.

Celulele de biocombustie microbiene sunt compuse din două compartimente separate de o membrană permeabilă pentru protoni (PEM). Un compartiment este pentru anod iar celălalt pentru catod. Principiul funcționării acestor celule de biocombustie este strâns legat de procesele biochimice care apar în organismele microbiene, anume glicoliza, ciclul acidului citric și lanțul de transport electronic.

Electronoforii intervin în timpul procesului de transport electronic, transportând electroni din plasma membranei bacteriene către anod. Protonii pompați din bacterie în mediul anodic traversează PEM spre compartimentul catodic. Mediatorul (cel mai cunoscut fiind fericianura) este oxidat din nou în fericianid, în timp ce ionii de hidrogen se combină cu oxigenul formând apă.

Pentru fericianură mecanismul de oxidare-reducere este bine cunoscut:



Pe baza cunoștințelor actuale despre funcționarea celulelor de biocombustie se fac eforturi pentru maximizarea curentului și puterii prin:

- compararea și folosirea de combinații diferite de bacterii și electronofori [2, 3, 4]
- folosirea de culturi mixte de bacterii [5],6,7
- folosirea mediului anaerob la anod [2,3, 6,7,8 , 9, 10]
- creșterea vitezei de alimentare (cu zaharuri) și alți biocombustibili [7]
- modificarea electrozilor cum ar fi imobilizarea electro-noforilor [2, 4, 7, 11] și folosirea polimerilor conductori [11], materiale carbonice nanostructurate
- barbotarea de oxigen în compartimentul catodic [2,10].

Pentru celulele de biocombustie microbiene au fost raportate densități de curent în jur de  $1.5 \text{ mAcm}^{-2}$  [7,11], puteri de pînă la  $3.6 \text{ Wm}^{-2}$  [7]. Rabaey et al [7] au folosit în experimentele lor o cultură amestecată de bacterii investigînd influența vitezei de alimentare cu glucoză asupra puterii. S-au folosit electrozi de grafit obișnuit. S-a observat o recuperare a electronilor de 89% pentru viteze de hrănire de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  pe zi. În studiul lui Schroeder et al [11], a fost folosit un anod de polimer activ modificat catalitic (poli-anilină). A fost folosită o cultură bacteriană de Escherichia Coli K12. Cel mai clar dezavantaj al întregului proces a fost costul de producere al electrozilor. Au fost obținute densități de curent comparabile cu cele ale echipei Rabaey et al [7]. Valorile pentru curenți din literatură în celule de biocombustie microbiene s-au situat între  $1 \mu\text{Acm}^{-2}$  și  $30 \mu\text{Acm}^{-2}$ . Unele articole au asigurat o atmosferă anaerobă la anod [2,6, 8-9] și oxigen barbotat în compartimentul catodic [2, 10]. Acești factori au contribuit împreună pentru producerea de curenți mari. De obicei atmosfera anaerobă se obține prin trecerea de azot și dioxid de carbon prin compartimentul anodic. Eliminarea oxigenului conduce la creșterea transferului de electroni de la bacterie la electrod mai mult decît prezența lui. Aerarea compartimentului catodic îmbunătățește reacția de reducere a oxigenului la apă.

Ca rezultat, viteza de oxigenare a catodului s-a dovedit a fi un parametru ce poate fi manipulat pentru optimizarea sistemului generator de curent. În cadrul acestui tip de celule combustibile, una sau mai multe reacții de electrod sunt catalizate de procese biologice.

Cercetările în acest domeniu sunt încurajate de următoarele două considerente: existența imensei cantități de materie vegetală disponibilă în natură și posibilitatea elimi-

nării deșeurilor de natură organică în mediul ambiant prin transformarea lor în fertilizatori organici. Procesele biochimice pot genera energie prin degradarea cu randament ridicat a materiei organice la temperaturi moderate, în soluții neutre sau aproape neutre [12, 13].

Celulele de biocombustie folosesc biocatalizatori pentru conversia energiei chimice în energie electrică [14 a-h]. Așa cum cele mai multe substraturi organice suferă o ardere cu eliberare de energie termică, oxidarea în prezența biocatalizatorilor a substanțelor organice de către oxigen sau alți oxidanți la interfețele a doi electrozi furnizează mijloace pentru conversia energiei chimice în energie electrică. Materiale organice abundente cum ar fi metanolul, acizii organici sau glucoza pot fi folosite ca substraturi pentru procesele de oxidare și oxigenul molecular ori  $H_2O_2$  se pot comporta ca substraturi, fiind reduse.

Puterea disponibilă a celulelor de combustie ( $P_{cel}$ ) este:

$$P_{cel} = \int d(E_{cel} I_{cel}) \quad 8.1$$

unde  $E_{cel}$  este tensiunea electromotoare a celulei și curentul acesteia,  $I_{cel}$  dacă este aplicată o sarcină electrică.

Tensiunea ideală a celulei este afectată de diferența dintre potențialele convenționale ale oxidanților și compușilor combustibili ( $E_{ox} - E_{comb}$ ), pierderi ireversibile în tensiune ca rezultat al limitărilor cinetice ale proceselor transferului de electroni la nivelul electrozilor, rezistenței ohmice interne și gradientilor de concentrație, care duc la descreșterea valorilor. Curentul celulei este controlat prin dimensiunile electrozilor, permeabilitatea ionică și viteza de transfer prin membrana ce separă compartimentele anodului și catodului biocelulei.

Celulele de biocombustie folosesc biocatalizatori, enzime și chiar organisme celulare întregi într-unul sau două moduri. Fiecare (i) biocatalizator poate genera substrat combustibil pentru celulă prin transformări biocatalitice sau procese metabolice, ori (ii) biocatalizatorii pot participa la transferul în lanț al electronilor între substratul combustibil și suprafețele electrozilor. Însă cele mai multe enzime redox nu participă la transferul direct de electroni cu electrozii, și astfel o varietate de mediatori electronici sunt folosiți pentru contactul electric dintre biocatalizator și electrozi [15]. Recent, au fost dezvoltate noi abordări cu privire la rolul suprafețelor electrozilor cu monostrat și multistrat constând în enzime redox, electrocatalizatori și bioelectrocatalizatori care stimulează transformările electrochimice la nivelul electrozilor [16].

#### 8.4 Clasificare

Celulele de combustie se clasifică în două mari categorii [17]:

- **INDIRECTE** – un anumit compus, folosit la alimentarea unor bacterii, este convertit într-un produs ce poate servi apoi drept combustibil în pila de combustie. Ca exemplu se pot menționa: producerea hidrogenului din hidrați de carbon, cu ajutorul bacteriei *Clostridium cellobioparum*, hidrogen din acid formic cu *Escherichia Coli*; amoniac din uree cu *Bacillus Pasteurii*, etanol din hidrați de carbon, cu *Saccharomyces* (drojdie). Alături de producerea de biocombustibil, procesele biochimice pot fi adaptate și pentru generarea de

oxidant. Ca exemplu poate servi procesul de fotosinteză din plante, în care oxigenul este produs din dioxid de carbon.

- **DIRECTE** - au la baza același proces ca și pilele indirecte, cu deosebirea că microorganismul poate funcționa în două feluri. El poate servi ca generator continuu de enzime necesare procesului electrochimic, în care organismul însuși nu beneficiază de pe urma procesului și astfel dispare treptat. De aceea, o parte din microorganisme se alimentează pentru cultură, consumând o parte din combustibil. Alternativ, microorganismele se pot cultiva pe electrod sau în imediata vecinătate a acestuia, iar producții de metabolism sunt utilizați direct la producerea de energie electrică. Acest tip de pile prezintă o mare dificultate: condițiile favorabile pentru dezvoltarea microorganismelor vii (soluții neutre sau aproape neutre și temperatură apropiată sau egală cu cea ambiantă) sunt net defavorabile pentru producerea eficientă a energiei electrice în pilele de combustie.

Luând drept criteriu de clasificare natura microorganismelor utilizate pentru funcționarea celulelor bioelectrochimice se disting:

- **CELULE ENZIMATICE de COMBUSTIE** – se utilizează catalizatori biologici de tip enzimatici pentru oxidarea combustibilului la anod, respectiv pentru reducerea oxigenului la catod.
- **CELULE MICROBIENE de COMBUSTIE** – sunt utilizate microorganisme precum bacterii pentru conversia combustibililor și acționează ca sursă de producere a energiei. În cadrul acestui tip de celule se disting două subclase:
  - **CELULE MICROBIENE de COMBUSTIE cu mediator** – a căror funcționare necesită adăugarea unui mediator electronic artificial: acid 2,6-antrachnon disulfonic, tionină, 2-hidroxi-1,4-naftochinona, albastru de metilen, Fe(III)EDTA, puncte cuantice solubile în apă [18a-g]
  - **CELULE MICROBIENE de COMBUSTIE fără mediator** – a căror funcționare nu necesită adăugarea unui mediator electronic artificial, pentru că se utilizează bacterii care pot transporta direct electronii prin circuitul exterior [19,20]

Recent s-a arătat că bacteria metalreducătoare din familia Geobacteraceae, poate transfera electroni direct către electrozi folosind enzime redox active electrochimic cum ar fi citocromii pe membrana lor externă [16-18]. Acestea sunt celule de biocombustie microbiene fără mediatori fiind considerate a avea un potențial mare de aplicații comerciale decât celulele de biocombustie cu mediatori deoarece mediatorii folosiți sunt scumpi și toxici pentru microorganisme [19].

### **8.5 Celule de biocombustie microbiene (MFC)**

Folosirea unor microorganisme ca microreactoare în celulele de combustie elimină necesitatea de izolare a enzimelor individuale și permite biomaterialelor active să funcționeze în condiții apropiate de mediul lor natural, rezultând de aici o înaltă eficiență.



Microorganismele sunt dificil de manipulat sau, în orice caz, au nevoie de condiții speciale pentru a fi active iar contactul lor electrochimic direct cu electrozii este virtual imposibil. În MFC fără mediatori există posibilitatea de a funcționaliza anodul cu materiale biocompatibile cu microorganismele din compartimentul anodic. În acest caz microorganismele vor forma biofilme pe suprafața anodului iar transferul de electroni se realizează prin interfața membrana celulară- suprafața anodului. În figura 8.2 este prezentată o celulă de biocombustie microbiană pe care s-au realizat diferite studii și cercetări cu diferite microorganisme.

Celula MFC (figura 8.2) constă din două compartimente un anod și un catod separate printr-o membrană schimbătoare de protoni (PEM) din polimer perfluorosulfona (Nafion, DuPont). Electrozii sunt din hârtie carbonică care pot fi funcționalizați cu diferite materiale biocompatibile.

În compartimentul catodic se află o soluție tampon de pH neutru.

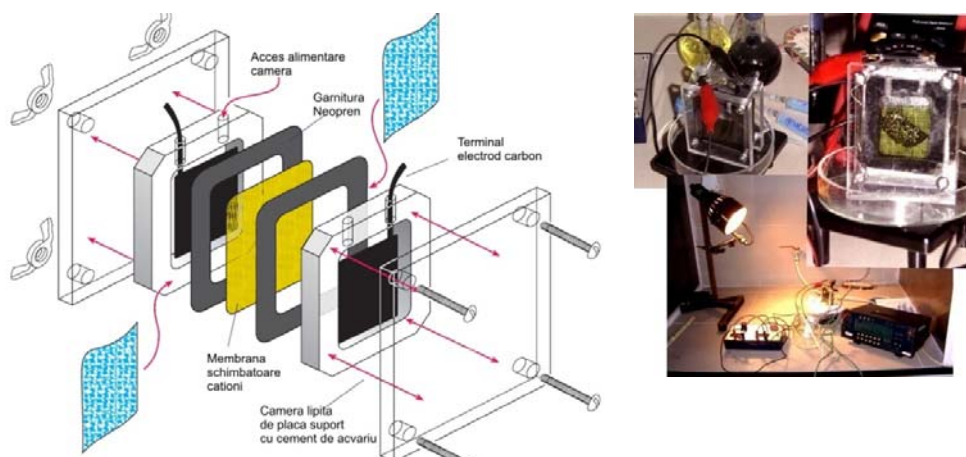


Figura 8.2-Celulă de biocombustie microbiană, montaj experimental

În compartimentul anodic s-a preparat o soluție de glucoză de 200g/l în care s-a introdus diferite microorganisme. O sarcină de 1 Kohm a fost menținută pe tot parcursul experimentelor. În figura 8.3 este prezentat răspunsul a trei specii de microorganisme, E. Coli, Klebsiela și S. Aureus. Cele trei tipuri de microorganisme răspund diferit ceea ce face ca MFC să devină un biosenzor de identificare și analiză a comportării acestora.[21, 22,23]. Au fost folosite bacteriile prezente în apa menajeră în MFC. Așa cum s-a arătat, bacteriile apei menajere se dovedesc a fi biocatalizatori potriviți pentru producerea de electricitate [24,25].

Apa menajeră a avut un pH între 7,3 și 7,6 și un conținut chimic de oxigen (COD) de 200-300 mg/L. a fost de asemenea folosit un mediu de glucoză (170-1200 mg/L) cu următorul conținut (per litru):  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 310 mg;  $\text{KCl}$ , 130 mg;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4,97 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,75 g; mine-rale (12,5mL) și vitamine (12,5mL) [26].

Microorganismele au abilitatea de a produce substanțe active electrochimic, substanțe ce pot fi intermediari metabolici sau produși finali ai respirației anaerobe. În scopul generării de energie, aceste substanțe combustibile pot fi produse într-un loc și transportate la celulele de biocombustie pentru a fi folosite drept combustibil. În acest caz, reactorul microbial biocatalitic produce biocombustibil iar partea biologică a aparatului nu are contact direct cu partea electrochimică. Această schemă permite părții electrochimice să opereze în condiții care nu sunt compatibile cu partea biologică a aparatului. Aceste două părți pot fi chiar separate în timp, funcționând complet individual. Cel mai folosit combustibil în această schemă este hidrogenul gazos, ce permite buna dezvoltare și eficiența marea celulelor de combustie  $\text{H}_2/\text{O}_2$  în operarea alături de bioreactoare. În Figura 8.4 se arată cum (A): Cu un bioreactor microbial separat de restul celulei se furnizează combustibilul în compartimentul anodic și cum (B). Cu un bioreactor microbial se furnizează combustibilul direct în compartimentul anodic al celulei combustibile.

Potrivit unei alte abordări, procesul de fermentare micro-biologică continuă direct în compartimentul anodic al unei celule de combustie, alimentând anodul cu produse de fermentație generate in situ. În acest caz, condițiile de operare din compartimentul anodic sunt dictate de sistemul biologic, așa că există o diferență semnificativă între acestea și celulele de combustie convenționale. Există o diferență între o adevărată celulă de biocombustie și o simplă combinație a unui bioreactor cu o celulă de combustie convențională. Această ultima configurație se bazează de asemenea în mod frecvent pe producerea biologică a hidrogenului, dar oxidarea electrochimică a  $\text{H}_2$  se face în prezența compușilor biologici în condiții blânde. În acest tip de sistem sunt de asemenea folosite și alte produse metabolice (alcooli,  $\text{H}_2\text{S}$ ).

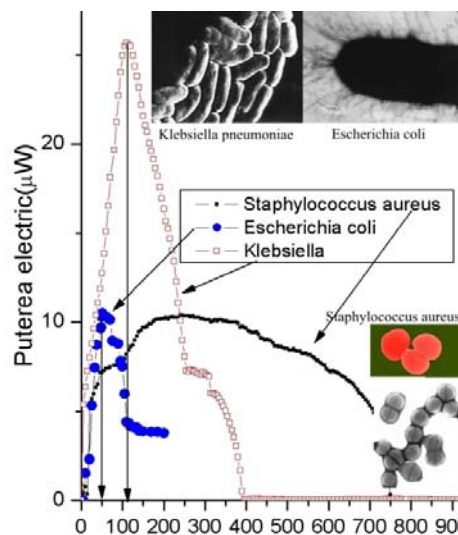


Figura 8.3-Răspunsul a trei tipuri de micro-organisme în MFC (putere funcție de timp, min)

### *Celule bioelectrochimice pe bază de electrozi enzimatici*

O metodologie în plus pentru dezvoltarea celulelor bioelectrochimice implică aplicarea enzimelor redox pentru oxidarea și reducerea substraturilor specifice de combustibili și oxidanți la electrozi și generarea de energie electrică. În consecință este esențial proiectarea de electrozi enzimatici integrați care cresc contactul electric.

Caracterizarea detaliată a vitezelor de transfer electronic la interfață, vitezele biocatalitice și rezistențele electrice interne este esențială pentru construcția de celule de biocombustie.

Modificarea chimică a enzimelor redox cu unități sintetice care îmbunătățesc contactele electrice cu electrozii furnizează mijloace generale pentru sporirea energiei electrice a celulelor de biocombustie.

Modificarea sitului specific al enzimelor redox și funcționalizarea electrozilor reprezintă mijloace noi și atractive. Conectarea electrică efectivă a proteinelor cu electrozii sugerează că eforturile viitoare pot fi direcționate către dezvoltarea mutațiilor structurale a proteinelor redox.

Nanoingineria suprafețelor electrozilor cu unități biocatalizatoare co-factori de transfer ale sintezelor organice permite controlul transferului electronic în cascade. Prin reglarea potențialelor redox duce la sporirea generărilor de putere ale celulelor de biocombustie. Configurațiile celulelor de biocombustie discutate mai sus pot fi extinse teoretic și altor enzime redox și substraturi combustibile, permițând numeroase aplicații tehnologice.

Un potențial important al celulelor de biocombustie este folosirea lor în ansambluri și locații din fluidele corpului uman, de exemplu sângele. Puterea electrică obținută poate fi folosită în alimentarea cu energie electrică a aparatelor implantate ca stimulatoarele cardiace, pompele, senzorii și protezele.

### **8.6 Elemente de electrochimia MFC**

Similar ca orice celulă galvanică în care au loc reacții chimice de generare de energie utilă respectiv căldură și MFC se supune aceluiași legi ale termodinamicii însă mecanismele sunt diferite. Pentru simplificare ne vom limita la o analiză termodinamică a celei luând în considerare reacțiile reversibile.

Puterea electrică a celei (8.1) are două componente corespunzător celor două regimuri de funcționare. Primul regim se referă la generarea de electricitate prin acumulare

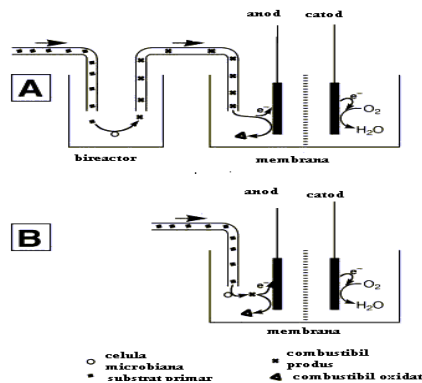


Figura 8.4 Reprezentarea schematică a unei microbiocelule combustibile  
A-furnizare indirectă B-furnizare de biohidrogen

de sarcină pînă se atinge o tensiune maximă  $E_{cel}$ . Se presupune că aceasta este constantă pentru al doilea regim de lucru prin conectarea ei la un consumator rezisitiv.

Dacă curentul este constant atunci  $P_{cel} = E_{cel}I$ . Tensiunea electromotoare produsă de sistemul electrochimic poate fi evaluată termodinamic din bilanțul energiei libere Gibbs aplicat asupra reacțiilor chimice din sistem [17]:

$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln \Pi \quad 8.2$$

unde  $\Delta G_r$  este energia liberă Gibbs,  $\Delta G_r^0$  - energia liberă Gibbs a produșilor și reactanților în condiții standard, R- constanta universală a gazelor, T- temperatura iar  $\Pi$  este raportul dintre produsul activităților chimice ale produșilor de reacție respectiv a reactanților.

Lucrul mecanic maxim efectuat de sistem este:

$$W_{max} = -\Delta G_r = E_{tem} \times Q = E_{tem} \times (znF) \quad 8.3$$

unde  $E_{tem}$  este tensiunea electromotoare a celulei, Q- sarcina electrică, z- numărul de electroni transportați per mol, n-numărul de mol, F-constantă Faraday.

Rearanjînd relația 8.3 se obține,

$$E_{tem} = -\frac{\Delta G_r}{znF}; E_{tem}^0 = -\frac{\Delta G_r^0}{znF} \quad 8.4$$

ce reprezintă tensiunile electromotoare generate în condiții de lucru respectiv în condiții standard. Înlocuind 8.4 în 8.2 rezultă ecuația generală pentru tensiunea electromotoare generată de o celulă electrochimică pentru un cuplu de reacții date:

$$E_{tem} = E_{tem}^0 - \frac{RT}{znF} \ln \Pi \quad 8.5$$

În condiții specifice tensiunea electromotoare este dată de diferențele de tensiuni electromotoare a reacțiilor ce au loc la catod,  $E_C$ , respectiv la anod,  $E_A$  adică:

$$E_{tem} = E_C - E_A \quad 8.6$$

În MFC, teoretic, randamentul poate fi evaluat ca lucrul mecanic consumat pentru a transporta  $znF$  sarcini în circuitul exterior la diferența de potențial măsurată ( $E_{cel} = V_{măsurat}$ ) raportat la lucrul mecanic maxim efectuat de celulă datorat reacțiilor de la catod și anod ( $E_{tem} znF$ ):

$$\eta_{MFC} = \frac{W_{masurat}}{W_{max}} = \frac{V_{masurat} znF}{E_{tem} znF} = \frac{V_{masurat}}{E_{tem}} \quad 8.7$$

În realitate datorită rezistențelor interne,  $R_e$ , (de volum respectiv de interfață) a celulei potențialul generat va fi:

$$E_{cel} = E_C - E_A - \sum IR_e \quad 8.8$$

În experimente, măsurarea potențialelor de electrod pentru determinarea potențialelor la anod,  $E_A$ , și catod,  $E_C$ , se raportează la un electrod de referință situat în vecinătatea acestora. În consecință valorile experimentale nu coincid cu  $E_{\text{tem}}$  respectiv cu  $E_{\text{tem}}^0$  din relația 8.5. În practică pentru o celulă ideală cu un cuplu de reacții reversibile se consideră o tensiune electromotoare măsurată  $E_e$  și o tensiune electromotoare standard de echilibru  $E_e^0$  iar expresia 8.5 se modifică corespunzător. Considerînd o concentrație de oxidanți,  $c_O$  respectiv de produși reduși,  $c_R$  atunci relația 8.5 ia forma:

$$E_e = E_e^0 + \frac{RT}{znF} \ln \frac{c_o}{c_R} \quad 8.9$$

care pentru echilibru ar valorile măsurate în circuit deschis trebuie să fie apropiate de  $E_e$ .

Excesul de energie liberă în sistem indus de suplimentarea de oxidanți și de combustibil raportat la valorile de echilibru va conduce la un suprapotențial  $E_{\text{cel}}$  mai mare de  $E_e$ . Pentru a maximiza performanțele celulei și a obține o tensiune optimă este necesar a maximiza ( $E_C - E_A$ ) și de a reduce valorile rezistențelor interne. Densitatea de putere a celulei de combustie se raportează la aria electrozilor sau la aria echivalentă de catalizatori.

## 8.7 Referințe

- 1 Keith Scott, Ioan Stamatina, JOAM, 9, 6, 1597 - 1605, (2007)
- 2 R.M. Allen, H.P. Bennetto, Applied Biochemistry and Biotechnology, 39/40, pp. 27-40, (1993).
- 3 D. Park, J. Zeikus, Applied and Environmental Microbiology 66,4, 1292-1297, (2000).
- 4 S.D. Roller, H.P. Bennetto, G.M. Delaney, J.R. Madison, J.L. Stirling, C.F. Thurston, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B, pp. 3-12, (1984).
- 5 D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, *Science* 295, 483-485, (2002).
- 6 D. Park, J. Zeikus, *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 3, 348-355, (2003).
- 7 K. Rabaey, et al, *Biotechnology Letters*, 25, 1531-1535, (2003)
- 8 D.R. Bond, D.R. Lovley, *Appl. and Environmental Microbiology* 69, 1548-1555, (2003).
- 9 M. Chiao, K.B. Lam, L. Lin, "Micromachined Microbial Fuel Cells," *IEEE The Sixteenth Annual International Conference*, pp. 383-386, (2003)
- 10 D. Park, S. Kim, I. Shin, Y Jeong, *Biotechnology Letters*. 22, 1301-1304, (2000).
- 11 U. Schroeder, J. Niessen, F. Scholz, "A Generation of Microbial Fuel Cells with Current Outputs Boosted by More than One Order of Magnitude." *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, pp. 2880-2883, (2003).
- 12 N. Mano, F. Mao, W. Shin, T. Chen and A. Heller, 'A miniature biofuel cell operating at 0.78 V', *Chem. Commun.*, 518-519 (2003).
- 13 M. Chiao, K.B. Lam and L. Lin, 'Micromachined microbial fuel cells', *16th IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference*, Kyoto, Japan, January 19 - 23, 2003
- 14 a. C. Van Dijk, C. Laaneși C. Veeger, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 104, 245 (1985).  
b. W. J. Astonși A. P. F. Turner, *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 1, 89 (1984).  
c. L. B. Wingard Jr, C. H. Shawși J. F. Castner, *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 137 (1982).  
d. A. P. F. Turner, W. J. Aston, I. J. Higgins, G. Davis and H. A. O. Hill, 'Applied Aspects of Bioelectrochemistry: Fuel Cells, Sensors, and Bioorganic Synthesis', Presented at the Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, C. D. Scott (Ed), Interscience, New York, 12, 401 (1982).  
e. G. T. R. Palmore și G. M. Whitesides, 'Microbial and Enzymatic Celule de bio-combustie', în "Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production", M. E. Himmel, J. O. Baker and R. P. Overend (Eds), ACS Symposium Series No. 566, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 271-290 (1994).  
f. A. T. Yahiro, S. M. Leeși D. O. Kimble, *Biochim. Biophys. Acta*, 88, 375 (1964).  
g. F. D. Sisler, 'Biochemical Fuel Cells', în "Progress in Industrial Microbiology", D. J. D. Hockenhuil (Ed), J. & A. Churchill, London, Vol. 9, pp. 1-11 (1971).  
h. S. Wilkinson, *Autonomous Robots*, 9, 99 (2000).
15. P. N. Bartlett, P. Tebbutși R. C. Whitaker, *Prog. Reaction Kinetics*, 16, 55 (1991).

- 
- 16 I. Willner și E. Katz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 1180 (2000).
- 17 Liviu Oniciu, Pile de combustie, Ed. Stiintifica, Bucuresti, pp.127, (1971)
- 18 a. Siebel, D.; Bennetto, H. P.; Delaney, G. M.; Mason, J. R.; Stirling, J. L.; Thurston, C. F. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: (1) Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B, 3-12 (1984)
- b. Delaney, G. M.; Bennetto, H. P.; Mason, J. R.; Roller, S. D.; Stirling, J. L.; Thurston, C. F. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. II. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator combinations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B, 13-27 (1984)
- c. Lithgow, A. M.; Romero, L.; Sanchez, I. C.; Souto, F. A.; Vega, C. A. Interception of electron-transport chain in bacteria with hydrophilic redox mediators, *J. Chem. Res.*, 5, 178-179. (1986)
- d. Emde, R.; Swain, A.; Schink, B., Anaerobic oxidation of glycerol by *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 170-175 (1989).
- e. Park, D. H.; Zeikus, J. G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4), 1292-1297 (2000)
- f. Ioan Stamatina, Adina Moroza, Luminita Stamatina, Anca Dumitru, Prospective Investigations of Biofuel Cells as Source for Applications in Nanobiotechnology, *NATO Science Series Volume: Nanostructured and Advanced Materials for Applications in Sensor, Optoelectronic and Photovoltaic Technology*, Ed. A. Vaseashta, D. Dimova-Malinovska and J. M. Marshall, (2005).
- g. Kim, B. H.; Park, D. H.; Shin, P. K.; Chang, I. S.; Kim, H. J. Mediatorless biofuel cell, *U.S. Patent 5976719*, 1999.
- 19 Chaudhuri, S. K.; Lovley, D. R., Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells, *Nat. Biotechnol.* 21, 1229-1232. (2003)
- 20 Liu, H.; Ramnarayanan, R.; Logan, B. E., Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell, *Environ. Sci. Technol.*, 38, 2281-2285, (2003)
- 21 Luminita Stamatina, I. Stamatina, *Nanobiocomposites based on nanocarbon for cell culture media*, in Nanoengineered Nanofibrous Materials, Ed. Y. Gogotsi, S. Kacac, Kluwer, pp.289-298 (2004)
- 22 A. Moroza, I. Stamatina, L. Stamatina, A. Dumitru, K. Scott, *Carbon Electrodes for microbial fuel cells*, *JOAM*, 9,1, 221-224, (2007)
- 23 Adina Moroza, L. Stamatina, F. Nastase, A. Dumitru, S. Vulpe, C. Nastase, Ioan Stamatina, Keith Scott *The biocompatibility microorganisms-carbon nanostructures for applications in microbial fuel cells*, *Phys. Stat. Sol. a* 204, 6, 1797-1803 (2007)

- 
- 24 Liu, H.; Ramnarayanan, R.; Logan, B. E. *Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell*. Environ. Sci. Technol., *38*, 2281-2285. (2003)
- 25 Park, D. H.; Zeikus J. G. *Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation*. Biotechnol. Bioeng., *81*(3), 348-355 (2003)
- 26 Lovley, D. R.; Phillips, E. J. P. *Novel mode of microbial energy metabolism: Organism carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese*. Appl. Environ. Microbiol., *54*(6), 1472-1480 (1988)



## 9. Nanoparticule în medicină

Am putea spune că acest domeniu s-a născut o dată cu experimentele lui Albert Einstein, care într-un capitol al lucrării sale de doctorat, a calculat mărimea unei singure molecule de zahăr într-un experiment de difuzie a zahărului în apă. Experimentul său a arătat că fiecare moleculă măsoară aproximativ un nanometru în diametru.

Domeniul este relativ nou și a evoluat o dată cu creșterea necesității de a găsi noi materiale cu biocompatibilitate cât mai mare pentru reducerea intoleranței organismelor vii. Începând cu protezele și aliajele dentare, componente artificiale pentru înlocuirea de părți ale organelor sau chiar integral (rinichi, ficat, piele, componente ale inimii, esofag, plămâni, ochi etc) au fost dezvoltate noi materiale cu proprietăți din cele mai sofisticate.

Aria sintezei nanomaterialelor a permis o nouă abordare. Binecunoscute din știința coloizilor nanomaterialele au surmontat principalul inconvenient- pot fi stabile fără a fi necesar stabilizări în diferite miceli. Nanomaterialele nu sunt altceva decât tot ce cunoaștem ca materiale la scală macroscopică dar reduse la nivel nanometric ele prezintă ori noi proprietăți ori cele clasice sunt amplificate. Nanomaterialele nu sunt produse prin tehnicile „up-down” adică formarea lor prin reducere dimensională ci invers”bottom-up” împrumutând mult din tehnicile chimiei supramoleculare, coloizilor, sol-gel, inginerie genetică, biologie/ biochimie moleculară. Peste acestea s-au suprapus noile metode de manipulare și sinteza cu microscopia de forțe atomice, metode de autoasamblare (SAM), manipularea cu fascicule laser (tweezer), inscripționarea directă prin ink-jet etc.

Dimensiunile lor fiind sub sau comparabile cu cele ale virusurilor (figura 9.1); activitatea lor este adeseori amplificată datorită mesostructurii și forțelor superficiale total diferite de ce se întâmplă la dimensiuni normale. Interesul în potențiale aplicații biomedicale ale nanomaterialelor și ale materialelor nanostructurate, provine din percepția că ele sunt capabile să interacționeze cu biomolecule individuale, celule și părțile lor individuale și alte structuri biologice. Pe o scală a măririlor pentru inspecția microscopică (figura 9.1) se observă că domeniul dimensional al nanoparticulelor acoperă o vastă arie dimensională în scala nanometrilor compatibilă cu microorganismele și virusurile. Vor fi abordate câteva din aspectele impactului nanoparticulelor în medicină unele din ele fiind elaborate și dezvoltate în această lucrare.

1. *Nanofibrile, Nanoparticule de carbon* – existente în mediul înconjurător, datorită emanațiilor de gaze incomplet arse- pot fi inhalate și ajung localizate în diferite organe dar cel mai adesea în circuitul sanguin unde cu glucoza, hemul și alți mediatori împreună cu microorganisme patogene pot forma adevărate celule miniaturizate bioelectrochimice ce pot produce electricitate iar ca produși pot varia de la cei inofensivi ( ex CO<sub>2</sub>) la gaze combustibile, uneori accelerează formarea toxinelor. Astăzi există largi studii de a crea miniroboți ce folosesc substanțele din circuitul metabolic ce produc electricitate și energia necesară pentru a transporta medicamentele la o țintă pre-

cizată. Ansamblul gastrobot medicament învelit în filme inteligente cu recunoaștere moleculară a celulelor bolnave- unitate de transport formată din cili biomimetic- este intens studiat ca domeniu specific de „drug delivery”- transport inteligent de medicamente. *Structura și activitatea specifică* a nanoparticulelor de carbon rezultate din sinteza prin piroliză laser , a arătat că în anumite situații pot accelera transportul de oxigen spre microorganismele aerobe jucînd rol de „pompe de oxigen”

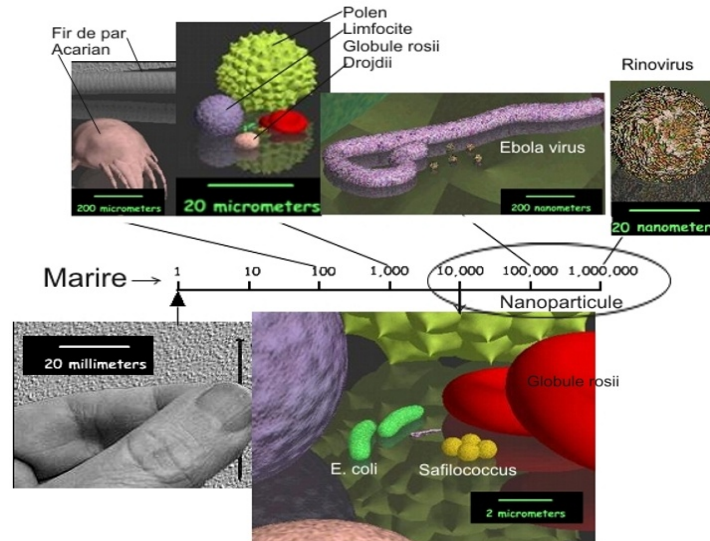


Figura 9.1 – Comparație dintr dimensiunile microorganismel și nanoparticule pe o scală a măririlor acoperind microscopia optică și de forțe atomice

2. *Nanocompozite/nanobiocompozite*- ca definiție acceptată orice compozit care conține cel puțin un material nanometric într-o matrice dată se numește nanocompozit. Dacă matricea conține materiale biologice sau biocompatibile ele capătă denumirea generică de nanobiocompozite. Nu vom intra în detalii asupra diferitelor metode de formare a nanocompozitelor. De reținut că orice tip de matrice de la gel pînă la polimeri sau alte solide care conțin materiale nanometrice dispersate, funcționalizate, legate chimic, etc formează clasa nanocompozitelor (dispersiile lichide, coloizii sunt clase distincte). În această lucrare s-a studiat dezvoltarea de medii de cultură ce pot induce creșterea accelerată a unor tipuri de microorganisme reducîndu-se astfel timpii de incubare la jumătate în scopul unui diagnostic mai rapid. Ulterior s-a constatat că o combinație de creșteri pemedii de cultură pe bază de nanocarboni și transferul acestora într-o celulă de biocombustie cu electrozi pe bază de nanotuburi de carbon se pot identifica tipurile de microorganisme datorită specificității lor în mecanismele de transfer de electroni.

3. *Puncte cuantice(Q-dots)*-Nanocristale ce au proprietatea de luminozitate sau de coloranți luminiscenti sub acțiunea radiației de la albastru spre ultraviolet. Diferențele sunt majore față de luminoforii și coloranții clasici biotinilați sau nu. Q-doturile au o emisie specifică pe o anumită lungime de undă cu persistență îndelungată. Biotinilate devin biocompatibile, se pot atașa pe diferite structuri biologice având capacitatea de indexare și identificare respectiv secvențiere. Lucrarea abordează un singur aspect – utilizarea lor în investigarea unor tipuri de preparate biologice țintind spre analiza elementelor componente ale singelui și a naturii paraziților. De notat că această metodă este pentru prima dată introdusă la nivel național.

În continuare vor fi prezentate aspecte specifice pentru cele două clase de nanoparticule și acolo unde este posibil comentarii încercând surprinderea aspectelor comune din biologia microorganismelor cu proprietățile nanoparticulelor

### **9.1 Nanofibrile, Nanocarboni, rolul lor în microbiologia clinică**

#### *Nanofibrile*

De curând nanofibrilele (NF) au fost menționate ca o conexiune între lumea nanometrică și macrometrică, pentru că în teorie, având diametru unei fracțiuni de micron, nanofibrila poate fi infinit de lungă. Ele sunt considerate ca o conexiune de la nanobiecte spre macrobiecte.[1]. Producerea nanofibrelor prin electrospinning (etirare în câmp electric a unei soluții lichide de material prin canale capilare) sau centrifugare capilară, este de mare actualitate, și o varietate de nanofibrile continui sau poroase au fost realizate cu această metodă.

Ele includ: polilactide, (PL) poliglicolide (PG), polietilentereftalați, poli-acrilonitril, polivinilcarbazol, policarbonat, polistiren, polimetil-metacrilat, polivinilpirolidon, poli-metacrilat, polioximetilene [2]. Co-electrospinning de soluții coloidale cum ar fi hidroxiapatita într-o soluție polimeră a condus la nanofibrile ce pot încorpora nanoparticule. Un alt exemplu cu un impact considerabil pentru medicina reparatorie de țesut este obținerea de nanofibrile de polioxietilene cu nanotuburi și de aici nanocompozite fibrilare cu o rezistență mecanică foarte mare [3].

Similar, dacă se înglobează în soluții de polimeri biodegradabili diferite medicamente atunci nanofibrilele pot deschide arii largi de aplicații pentru industria medicamentelor [4]. Nanofibrile cu polimeri biodegradabili cum sunt polilactidele poliglicolidele sunt de interes pentru ingineria țesuturilor de susținere deoarece ei se dizolvă complet după implantare, nu se comportă ca materiale străine în corp [5]. Utilizând tehnici de electrospinning au fost obținute fibre de collagen de 100 nm în diametru și care au aceeași configurații cu ale nanofibrelor de collagen natural. Au fost obținute, prin această tehnică din soluții de collagen cu nanotuburi, nanofibre care au abilitatea de a facilita creșterea celulelor și formarea țesuturilor de susținere [6].

Aplicațiile nanofibrelor în lumea medicală sunt multiple: pentru filtrarea mediilor biologice, pentru a transforma sau anihila substanțele patogene sau microorganismele. De exemplu filtrele din nanofibrile au suprafețe specifice de ordinul sute de metri pătrați per

gram care în comparație cu microfibrilele cu zeci de metri pătrați. Filtrele din nanofibrile sunt foarte utile în procesul de purificare a apelor, procese de dializă dar și în prevenirea și combatere a bioterorismului.

Recent a fost raportat obținerea unor filtre ce sunt capabile să rețină metalele grele, virușii și bacteriile din apă și să separe proteinele. Aceste filtre au fost fabricate din nanofibrile de alumina ( $Al_2O_3$ ) de Aragonide Sanfort [7]. Alumina nanofibrilară atinge dimensiuni impresionabile de 2 nm în diametru și o suprafață de contact de 500-650  $m^2$ /gram. Un exemplu interesant despre cum se assemblează peptidele pe nanofibrile a fost descris recent în [8]. Autorii studiază sinteza moleculelor de peptide –molecule amfifile care se autoassemblează reversibil cu nanofibrile rezultând un gel apos. Aceste structuri sunt în continuare polimerizate pentru a îmbunătăți stabilitatea lor. Nanofibrilele sunt utilizate ca șabloane pentru producerea de nanotuburi prin acoperirea acestora cu un alt material care după procesare se poate elimina miezul format din polimer

Nanomaterialele și nanofibrilele nu sînt invenția genială a unui creier uman, ele sunt larg răspîndite în natură. Diferite materiale naturale cum ar fi: lemnul, mătasea, părul, conexiunile celulare, oasele, pielea și celulele vaselor de sînge, toate aceste formațiuni sunt produse prin repetarea regulată a aranjamentului nanofibrilelor alcătuite din proteine și polizaharide. Moleculele de ADN, sunt un exemplu de nanofibrile de 2 nm în diametru și de 100 nm lungime.

Un exemplu interesant de material nanostructurat utilizat sau produs în natură, este cel al culorii albastre a penajului la păsări. Această culoare nu este dată de un pigment albastru al penajului ci de un sofisticat aranjament nanostructurat. Culoarea albastră a penajului la păsări este dată de lumina ce este împrăștiată coerent pe aranjamentul de fibrile de keratină și bulele de aer ce alcătuiesc fulgul penei.[9, 10]. Un alt exemplu interesant ce conține nanofibrile naturale este cel al polimerizării fibrinogenului și formării cheagului de sînge. Este un exemplu magistral de aranjament nanostructurat de macromolecule și este rezultatul stadiului final al coagulării în cascadă. Ansamblu coagulării constă dintr-o succesiune de etape distincte care influențează rata asamblării fibrelor de fibrină și aranjamentul final al fibrelor în procesul coagulării. Primul pas în procesul de clivare proteolitică a proteinei plasmatică fibrinogen (factorul 1. în sistemul coagulării celulare ), este îndeplinit de enzima numită trombină. Trombina clivează peptidele moleculare, mici, cunoscute cu denumirea de fibrinopeptide A și fibrinopeptide B ale moleculei de fibrinogen. Oligomerele cresc și dau protofibrile, care la rîndul lor formează fibrilele finale în procesul de coagulare. După atingerea unei mase critice protofibrilele formează fibrile și în final o rețea sub formă de cheag.[11,12]. In vivo, fibrina monomerică în mod spontan formează un polimer solid care se leagă covalent de celulele sîngelui printr-o enzimă plasmatică transglutaminaza și se transformă într-un polimer insolubil. In vitro, polimerul de fibrină trebuie să polimerizeze reversibil și apoi să repolimerizeze în structura mai sus amintită.

Este posibil să se formeze o fibrină lucrătoare, cu un larg spectru, cu fibrile de grosimi diferite, realizînd în final un polimer de porozitate diferită, cu pori distribuiți diferit.

Numeroși factori contribuie la determinarea finală a diametrului fibrilelor și la funcționarea sistemului[13,14]: tăria ionică, pH, raportul fibrinogen / trombină, prezența altor proteine plasmatică. Autoasamblarea fibrinei apare în special via legăturile necovalente A- $\alpha$  și B- $\beta$  dintre siturile localizate de polimerizare din domeniile E centrale și domeniile D periferice ale fibrinei. Natura fizico- chimică a legăturilor covalente depinde de interacțiunile electrostatice și legătura de hidrogen ce însoțește resturile de aminoacizi în cursul procesului de asamblare a fibrilelor de fibrină. Este semnificativă observația că efectul tăriei ionice ce însoțește procesul de polimerizare, influențază rata de polimerizare. Deasemeni interacțiunile hidrofobe participă la polimerizarea fibrinei.

Studiul asupra nanostructurilor de fibrină este de mare interes pentru lumea academică și medicală, atât în ceea ce privește noua viziune asupra conceptului de boală a coagulării cât și în ceea ce privește noile perspective ce se deschid, fibrina are un potențial important în industria medicamentelor și în cea a țesuturilor de susținere.

#### *Nanofibrile carbonice*

ACF- fibrele de carbon activate, sunt materiale fibroase nanostructurate, ce au mare potențial în medicina aplicată. Diametru acestor fibrile este de ordinul micrometrilor, au mari suprafețe interne și sunt clasificate în funcție de dimensiunea porilor în trei categorii:

- micro, au porii mai mici de 2nm,
- mezo, au porii între 2-50 nm,
- macro, cu porii mai mari de 50nm.

Această clasificare se bazează pe diferența în mecanismul de adsorbție a gazelor, clasificare realizată la recomandările IUPAC. Toate cele trei tipurile de pori contribuie la nanostructurarea ACF.

GAC- fibre de carbon gaz adsorbante, sunt utilizate cu succes în purificarea sângelui extracorporal, hemoperfuzii.

Rezultate preliminare comparative între cele două nanostructuri, ACF și GAC au condus la ideea că au un potențial deosebit în aplicațiile medicale.

#### *Aplicații medicale ale ACF și GAC*

Bactericid puternic, dovedit prin impregnarea fibrilelor de carbon activ cu cupru și amestecarea lor cu un mediu nutritiv pentru culturi de: *Pseudomonas mirabilis*, *E. coli*, *Stafilococcus aureus* sau *Pseudomonas aeruginosa*. În toate cazurile din aceste culturi nu s-a observat dezvoltarea coloniilor de microorganisme. Importante rezultate pozitive și încurajatoare sunt în tratarea tumorilor, prin reducerea dimensiunilor acestora sau dispariția lor. Experimentele s-au efectuat pe animale de laborator dar și pe voluntari umani.

Imobilizarea endotoxinei bacteriene de la *Stafilococcus aureus*, cu ACF (SAC-ACF) sau de la *E.coli* (BET-ACF), se pot folosi pentru experimente de tratare a cancerului la animalele de laborator. În aceste cazuri durata de supraviețuire a fost mărită de la 52 zile la 76 zile, prin hemoperfuzii. Rezultatele sumarizate din literatură arată marile posibilități ce se oferă aplicațiilor medicale prin folosirea nanomaterialelor cum ar fi nano-fibrină și ACF sau GAC.

În cazul fibrelor naturale de fibrină, proprietățile lor pot fi semnificativ îmbunătățite sau modificate în sensul dorit. În cazul ACF sau GAC, un simplu calcul estimează că suprafața nanoporozității nano-fibrelor este de 200-2000 metri pătrați per gram. O suprafața specifică mare, ca aceea din ACF dar care nu necesită o etapă de activare va reduce semnificativ rezistența mecanică a materialelor carbonice, aceasta este un mare avantaj. Suprafața externă care nu are limitări în difuzia intraporoasă ar putea reduce rata de adsorbție prin carbonul poros. În ciuda faptului că nanofibrilele de carbon nu sunt produse pe scară largă, recente descoperiri în domeniu au făcut posibilă descoperirea de nanofibrile din polimeri, care au condus la producerea unor fibrile de carbon prin piroliză ce va deschide în viitor oportunități pentru aplicații medicale a acestor materiale.[15]

## **9.2 Nanocarboni**

Particule carbonice de dimensiuni (sub)micronice sunt răspândite prin intermediul curentilor de aer pe toata suprafața Terrei dar sunt cu precădere concentrate în marile aglomerări urbane, fiind un factor important în fenomenul poluării. Ele au o proveniență foarte diversă, de la emisiile motoarelor (îndeosebi cele Diesel), termocentralelor și pînă la incendii. Acțiunea lor asupra sănătății oamenilor este atît directă, prin afectarea sănătății oamenilor, în speță a sistemului respirator și a altor sisteme [16, 17], dar poate fi și indirectă, prin creșterea incidenței diferitelor infecții bacteriene ca urmare a interacției acestor microorganisme patogene cu particule aflate în suspensie.

Microorganismele coexistă cu oamenii de foarte mult timp și unele au dezvoltat relații simbiotice cu acesta, pe cînd altele atacă organismul uman, putînd fi foarte virulente. Poarta de intrare a acestora din urmă poate fi atît pielea, cît și sistemul respirator sau cel digestiv. Bacteriile simbiote sunt importante prin faptul că produc o serie de vitamine din grupa B cît și prin faptul că împiedică dezvoltarea celor patogene.

În cadrul procesului de studiere a interacțiilor de tip organism unicelular – particule de dimensiuni submicronice, un factor fundamental îl constituie cunoașterea proprietăților de suprafață ale celor două sisteme ce interacționează:

- Pe de o parte a învelișului microorganismelor, care este constituit în cazul bacteriilor de complexul membrană–perete bacterian;
- Pe de altă parte, suprafața nanoparticulelor, în particular cele carbonice.

Membrana bacteriană (ca și membranele tuturor celulelor vii) este alcătuită în principal dintr-un dublu strat lipidic, cu proprietăți de cristal lichid, adică moleculele lipidice sunt ordonate, dar sistemul are o anumită fluiditate. Ea nu este doar o simplă barieră fizică dintre citoplasmă și mediul extern, avînd și o serie de funcții ce depind în mod critic de proteinele ce se găsesc încorporate în stratul lipidic. Cîteva din aceste funcții sunt:

- Asigurarea legăturilor structurale dintre citoskeleton ( rețeaua de proteine fibrilare din citoplasma celulei) și matricea extracelulară;
- Transportul selectiv al unor molecule și ioni specifici în interiorul și în afara celulei;
- Cataliza a multor reacții chimice, de cele mai multe ori existînd un sistem de enzime, fiecare catalizînd o secvență dintr-un lanț de reacții metabolice.

Peretele bacterian are o compoziție și structură complexă. Există două tipuri principale de structuri ale acestuia care determină clasificarea bacteriilor în două clase: Gram pozitiv și Gram negativ. Această denumire provine de la metoda Gram de identificare a bacteriilor ce folosește violetul de gențiană (un colorant bazic trifenil-metanic) și o soluție apoasă de iod și iodură de potasiu. După spălare cu alcool, bacteria fie va reține colorația puternic violetă a violetului de gențiană, fie va fi complet decolorată. Uneori se aplică și o colorare suplimentară cu fucsină sau eozină pentru a da bacteriilor decolorate o culoare roșiatică și a le face mai vizibile. Bacteriile ce rețin culoarea violetă sunt cele Gram pozitiv, iar în caz contrar sunt Gram negativ [18].

Toate bacteriile, cu excepția micoplasmelor, posedă un perete bacterian iar principala componentă a acestuia este mureina, un peptidoglican, care contribuie la rigiditatea mecanică a acestuia. Toate bacteriile Gram negativ conțin un strat adițional în structura peretelui celular, o membrană externă, care este localizată deasupra stratului peptidoglicanic, astfel că la o secțiune prin învelișul bacteriilor de acest tip văzută la microscopul electronic apare o structură trilaminară [19]. O altă deosebire dintre cele două grupuri constă în grosimea stratului peptidoglicanic, care este mult mai mare la cele Gram pozitiv.

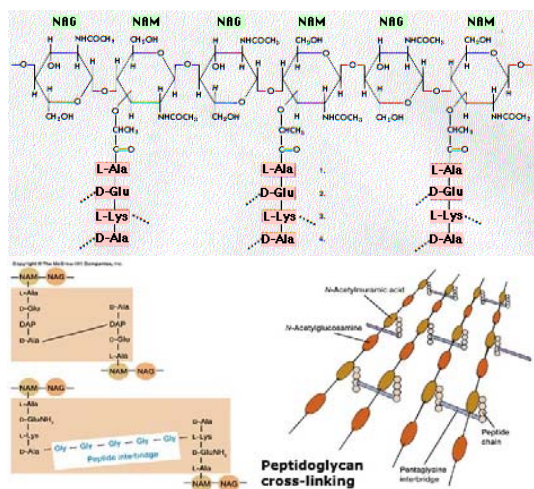


Figura 9.2-Fragment de peptidoglican

Figura 9.3 –Legarea catenelor și reticularea în peptidoglican (encarta-2005)

Peptidoglicanul este un polimer insolubil, tridimensional, compus din catene în care se găsesc alternativ resturi de N-acetilglucozamina și acid N-acetilmuramic ( figura. 9.2). Legătura dintre catene se face între resturile de acid N-acetil muramic prin intermediul a câte două lanțuri scurte polipeptidice. A doua polipeptidă (de obicei pentaglicina) se leagă în punte (pozițiile 2 și 4') între două peptide paralele, identice, legate fiecare la rândul lor de câte un rest de acid N-acetil muramic din doua catene adiacente ( figura 9.3).

Rigiditatea acestui ansamblu este dată atât de legăturile covalente, cât și de cele de hidrogen dintre resturile de aminoacizi C=O.....H-N. Tot legături de hidrogen pot forma și

grupele hidroxil prezente sub forma de  $-\text{CH}_2\text{OH}$  din catenele principale. De asemenea, datorită spațiilor relativ mari dintre catene, polimerul peptidoglicanic este îmbibat cu molecule de apă, care sunt și ele reținute prin legături de hidrogen, ceea ce dă naștere unei faze de gel în care sunt dispersate o varietate de alte molecule mici.

Polimerul peptidoglicanic nu este lipit direct de membrana internă lipidică, între acestea existând un spațiu în care se află apa, numit periplasma. Unii autori consideră că la bacteriile Gram negative și peptidoglicanul este o componentă a acestei periplasme. O altă caracteristică a bacteriilor Gram negative o constituie prezența în membrana externă a unor lipopolizaharide precum și a unor pori, cu deschidere de circa 1-2 nm, induși de proteine specifice, numite porine. Cele Gram pozitive prezintă la exterior polizaharide specifice ancorate în perete, precum și polimeri filiformi de tip acid teichoic (ancorat tot în perete) și lipoteichoic (ancorat în membrana de bază), acizi cu compoziție complexă de tip poliesteri fosforici ai glicerinei cu resturi de alanina, zaharuri cu/fără lipide. De asemenea, bacteriile posedă pentru locomoție mai mulți flageli care încastrați în peretele celular ce asigură deplasarea acestora spre sursele de nutrienți și oxigen. Alte structuri filiforme prezente pe peretele bacterian sunt pili. Ei sunt formați din proteine tubulare cu rolul de a ajuta bacteria să adere la celula gazdă, folosind de asemenea la transferul informației genetice de la o celulă bacteriană la alta prin mecanismul de conjugare,

Multe bacterii prezintă pe exteriorul peretelui bacterian un strat mucoid, foarte puternic îmbibat cu apă, numit capsulă, ce are o grosime apreciabilă. El are în compoziție, spre exemplu la bacilul de antrax, un polimer al acidului glutamic, iar la alte bacterii conține polizaharide. Rolul său pare a fi de protecție a bacteriei împotriva mecanismelor de apărare a gazdelor infectate.

În afara de proteinele din membrana de bază, se mai găsesc, lipoproteine, și multe alte tipuri de proteine cu diverse roluri (de transport, catalitice, "antene" pentru diverse semnale, de adeziune etc) [20].

Un alt fapt ce trebuie menționat este că o mare parte din antibiotice acționează prin blocarea biosintezei peretelui bacterian, în speță dereglează sinteza peptidoglicanului. În absența unui perete funcțional, materialul bacterian din interiorul celulei este expulzat afară și bacteria moare [4].

Tabloul zugrăvit succinct relevă marea complexitate și varietate, dar și importanța învelișului bacterian. Proprietățile acestuia îl fac apt să interacționeze în multiple moduri cu suprafața nanoparticulelor în particular cele carbonice, determinând o schimbare profundă a comportamentului bacteriilor.

#### *Tipuri de nanocarboni*

Interacția dintre microorganisme și materialele carbonice a fost studiată din mai multe puncte de vedere, în special din cel al depoluării apelor folosind carbon activ, care se știe că are o suprafață specifică foarte mare, comparabilă cu cea a nanoparticulelor carbonice. Spre exemplu, bacteria *Escherichia coli* s-a dovedit a crește adsorbția sărurilor de  $\text{Pb(II)}$  și de  $\text{Cd(II)}$  și de a scădea pe aceea a  $\text{Cr(VI)}$  din soluții apoase de către carbonul activat [21]. Aceste rezultate se pot explica prin schimbările de densitate de sarcină



superficială a carbonului când bacteria este adsorbită și prin considerarea caracteristicilor structurale și chimice ale peretelui bacterian. De asemenea, se constată un proces competitiv dintre cationii divalenți de Pb(II) și Cd(II) pe de o parte și cationii electrolitici pe de altă parte ce sunt atrași spre grupările funcționale încărcate negativ ale substanțelor polimerice extracelulare.

O altă direcție a fost aceea a determinării activității antimicrobiene a argintului (0,05% masic) depus pe fibre de carbon activate [22]. Concluzia a fost că efectul antimicrobial nu pare a fi legat exclusiv de prezența argintului și depinde și de concentrația oxigenului dizolvat.

Nanoparticulele carbonice au două caracteristici foarte importante care le fac indicate pentru studiul interacției lor cu microorganismele: au o suprafață specifică foarte mare și o reactivitate foarte ridicată, care le fac apte pentru a influența dezvoltarea bacteriilor cu care vin în contact. Nanoparticulele de carbon au o foarte mare activitate chimică pe de o parte datorită legăturilor nesatisfacute ( așa numitele «dangling bonds»), adică electroni necuplați, iar pe de altă parte datorită grupărilor chimice ce apar la marginile planelor grafenice prin expunerea acestor nanoparticule la oxigenul din aer. Aceste grupări pot fi atât acide: carboxil, hidroxil fenolic, hidroxil lactic și chiar lactona, dar s-a emis ipoteza că și alte structuri oxigenate cum sunt resturi de cromen, cetone și pirone pot prezenta proprietati bazice [23], așa cum se arată în figura 9.4. Sursa bazicității carbonului o reprezintă electronii  $\pi$  delocalizați din planele bazale [8].

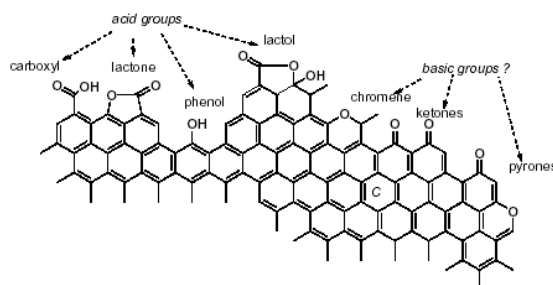


Figura 9.4- Modelul structural a nanoparticulelor de carbon [24]

Faptul că suprafața nanoparticulelor carbonice prezintă proprietăți acido-bazice, ceea ce înseamnă donoare și acceptoare de protoni este un alt argument în favoarea unei interacții puternice cu celulele bacteriene, știut fiind faptul că acestea prezintă sisteme proteice cu funcții de «pompe» de protoni.

O altă proprietate a suprafeței nanoparticulelor carbonice o constituie cea redox, adică proprietatea de cedare-acceptare de electroni. Un grup de cercetatori americani a studiat această proprietate prin metode de spectrofotometrie UV-Vis și potențiometrice expunând particulele de negru de fum de furnal, unor diverși agenți redox cum sunt Cr(VI), Mn(VII), Fe(III) și  $\text{SO}_3^{2-}$ . Abilitatea suprafeței acestor particule carbonice de a participa la reacții redox cu acești reactivi a fost corelată cu atribute morfologice cum

sunt dimensiunea cristalitelor și aria suprafeței. Datele au arătat că abilitatea acestui tip de carbon de a accepta/dona electroni este funcție de densitatea de defecte pe suprafața negrului de fum [25].

Transferul de electroni este esențial în multe procese celulare, cum ar fi de exemplu cele de fotosinteză și de respirație. Se poate presupune astfel și posibilitatea existenței unui schimb electronic la contactul bacteriilor cu nanoparticulele carbonice, prin intermediul proteinelor existente în peretele bacterian.

Deși suprafața carbonului este de obicei hidrofobă, structura chimică se poate modifica pentru a crește hidrofilicitatea [26]. S-a amintit mai sus că oxigenul reacționează cu suprafața carbonică conducând la diverse grupări, polare, cu caracter puternic hidrofil.

Aceste grupări pot atrage nu doar moleculele de apă dar și alte grupe polare ce se găsesc din abundență pe suprafața peretelui bacterian, astfel ele pot adera foarte strâns la nanoparticulele de carbon.

Trebuie reținut că grupele carboxil și hidroxil fenolic de la suprafața carbonului pot ioniza cu formare de ioni de tip  $\text{Ar-COO}^-$  și  $\text{Ar-O}^-$ , unde Ar reprezintă restul carbonic cu caracter aromatic. De asemenea, aceste grupe pot interacționa cu structurile ce prezintă molecule ionizate pozitiv de la suprafața peretelui celular, cu formare de legături ionice puternice.

Suprafața specifică foarte mare ca și porozitatea acestor nanoparticule permit adsorbția prin legături slabe a oxigenului din aer dar și a unor nutrienți din mediul de cultură. Aceste substanțe adsorbite vor fi eliberate către bacteriile care aderente la nanoparticule, fenomen ce poate constitui o explicație pertinentă pentru dezvoltarea foarte rapidă a coloniilor de microorganisme.

În concluzie, suprafața carbonului conține o proporție variabilă de situsuri active, constituite de către valențele nesaturate de la marginea straturilor grafenice formate de atomii de carbon, proporție ce crește desigur cu creșterea porozității și a dimensiunii suprafeței; pe de altă parte, prezența unor heteroatomi cum sunt în principal oxigenul, hidrogenul și azotul de asemenea introduce situsuri active la suprafața carbonului, și deci această suprafață nu e deloc inertă cum ar parea [10].

Un alt aspect demn de a fi luat în considerare este acela al Hidrocarburilor Aromatice Polinucleare (PAH-uri), care sunt prezente întotdeauna adsorbite la suprafața particulelor nanometrice de carbon, știindu-se faptul că aceste PAH-uri apar ca intermediari în procesele pirolitice ce au ca precursori hidrocarburi în stare de gaz sau vapori.

Aceste molecule ar putea interacționa cu bacteriile în două moduri: pe de o parte ar putea fi oxidate de aparatul enzimatic al acestora și să aibă loc astfel un fenomen de biodegradare [27], iar pe de altă parte aceste PAH-uri ar putea străbate barierele membranare și odată ajunse în interiorul celulei să interfereze cu mecanismul de multiplicare al acizilor nucleici bacterieni, provocând mutații genetice cu diverse consecințe [28].

#### *Medii de cultura specifice bionanocompozite cu nanomateriale carbonice*

Interacția nanoparticulelor cu structurile vii este studiată la ora actuală atât din punctul de vedere al nanotehnologiei dedicate aplicațiilor în biologie și medicină, cât și din perspectiva contaminării mediului ambiant și implicit al organismelor cu aceste nano-

particule. Două proprietăți caracteristice ale nanoparticulelor sunt de mare importanță în cadrul acestei interacții: o suprafață specifică foarte mare și o mare reactivitate chimică.

Datorită compatibilității în dimensiune a nanostructurilor de carbon cu microorganismele interacțiunea lor este urmată de o multitudine de efecte pozitive sau negative.

Combinând dimensiunea nanometrică cu reactivitatea nanoparticulelor sub diferite aspecte biochimice, efectele asupra materiei vii pot fi extrem de benefice dar și dezastruoase. Bionanocompozitele cu matrici de medii de cultură ce înglobează nanoparticule de carbon de diferite forme, dimensiuni și compoziții pot fi utilizate în dezvoltarea de noi tehnici bioanalitice.

În cele ce urmează se descrie realizarea primelor medii de cultură bionanocompozite cu pulberi obținute prin piroliza laser, plasmochimice și respectiv uzuale tipice din tehnologia negrului de fum și a pigmentilor. Interesul în potențialele aplicații biomedicale ale nanomaterialelor și biocompozitelor provine din percepția că acestea sunt capabile să interacționeze cu biomoleculele individuale, celule sau organite celulare de mărimi micro sau nanometrice. Toate materialele biocompozite au în structura lor nanofibrile sau nanoparticule cu activități specifice iar în particular pentru acest caz de studiu nanoparticulele de carbon.

Diversitatea nanoicroparticulelor existente în mediul ambient sub formă de aerosoli influențează dezvoltarea microorganismelor și a bolilor infecțioase ale pielii.

Microparticulele din aerosoli rezultate din activitatea industrială induc largi clase de îmbolnăviri cum ar fi: în mine, silicozele; în industria tipografică – boala plumbului; în industria diamantelor, nanoparticulele de diamant induc suferințe pulmonare prin eroziunea țesutului pulmonar etc.

Deasemeni nanoparticulele pot modifica rata de creștere, dezvoltare a microorganismelor, influențând prin prezența lor pe tegumente dezvoltarea de stafilococi și streptococi cutanate sau a unor paraziți cutanați.

În particular nanocarbonii pot accelera dezvoltarea de microorganisme atunci când sunt imersate în medii de cultură observate în primele stadii de cercetare. Aceste observații conduc la necesitatea de a dezvolta noi tipuri de medii de cultură care să accelereze creșterea coloniilor reducând astfel timpul de incubare. În acest scop s-a conceput și realizat o serie de bionanocompozite care să devină mult mai eficiente ca medii de cultură. Bionanocompozitele concepute cu nanoparticule funcționalizate și asamblate în medii de cultură sunt concepute pentru creșterea ratei dezvoltare a microorganismelor.

Statisticile au arătat că atunci când atmosfera are un grad semnificativ de încărcare cu particule carbonice rezultate de la coșuri de ardere sau țevi de eșapament, și procentul de noxe de tip NO<sub>x</sub> și SO<sub>x</sub> este crescut, frecvența îmbolnăvirilor cu aceste microorganisme fiind mai mare.

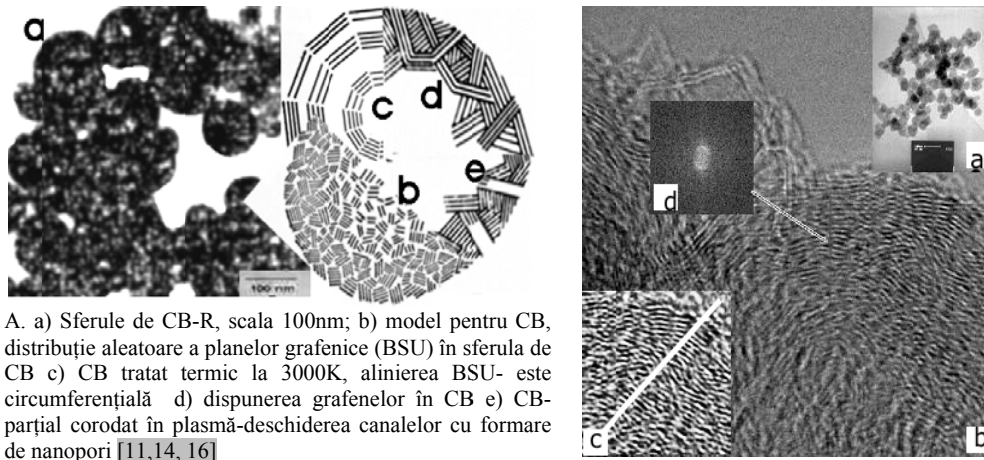
Nanopulberi carbonice de diferite morfologii au fost înserate în două medii de cultură prin metode adecvate cu scopul de a estima rata de dezvoltare și virulența diferitelor clase de microorganisme

*Materiale și metode*

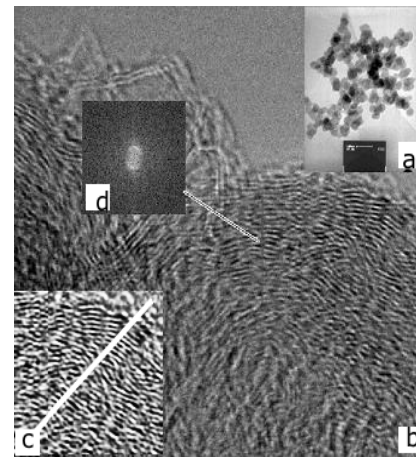
Nanocarbonii folosiți provin din piroliză laser sau din descompunere în plasmă (sursa Institutul Național Fizica Laserilor Plasmă și Radiații). Ca referință s-au studiat și specimene de negru de fum. Caracteristicile materialelor sunt prezentate în tabela 9.1. Structura lor este prezentată în figura 9.5. Se observă că fiecare tip de nanocarbon are o topografie specifică cu o structură turbostratică diferențiate prin natura compoziției lor și a grupărilor funcționale induse din procesele de sinteză.

Tabela 9.1 -Nanocarboni compatibili cu aerosolii din mediu folosiți în BNC

Tipul	Sursa/metoda	Caracteristici principale	Compoziții
CB –R Negru de fum de canal	Ardere incompleta a acetilenei	<i>Aria specifică:</i> 10-150 m <sup>2</sup> /g măsurată prin absorbția de azot (metoda BET) <i>Diametrul:</i> min20- max 300 nm. Distribuție aleatorie	Impurități: oxigen, hidrogen, sulf. Oxigenul și hidrogenul sunt covalent legați de carbonul de pe suprafața particulei Raportul O/H depinde de condițiile arderii incomplete. In cazul negrului de fum de canal, conținutul de oxigen este de 2-5% iar cel de hidrogen este de 0.5%; În negrul de fum de furnal conținutul de oxigen este dependent de debitul de alimentare a hidrocarburilor
Pigment negru CB- P (negru de fum de furnal)	Ardere incompletă în furnal cu ciclizare	Pigment-negru cu arie specifică: 300-500 m <sup>2</sup> /g.	
NC-LP1 NC- CVD1	Precursori etilenă, butadienă	Structură turbostratică,	Hidrogen adsorbit pe suprafață
NC- LP2	Acetilena cu sensibilizator SF <sub>6</sub>	Structură turbostratică	Sulf și fluor sunt prezente în cantități apreciabile
NC-LP3	Benzene	Fragmente fullerenice în cantități mici,	Multiple structuri poli- aromatice (PAH)
NC-CVD2	Benzene, toluene,		

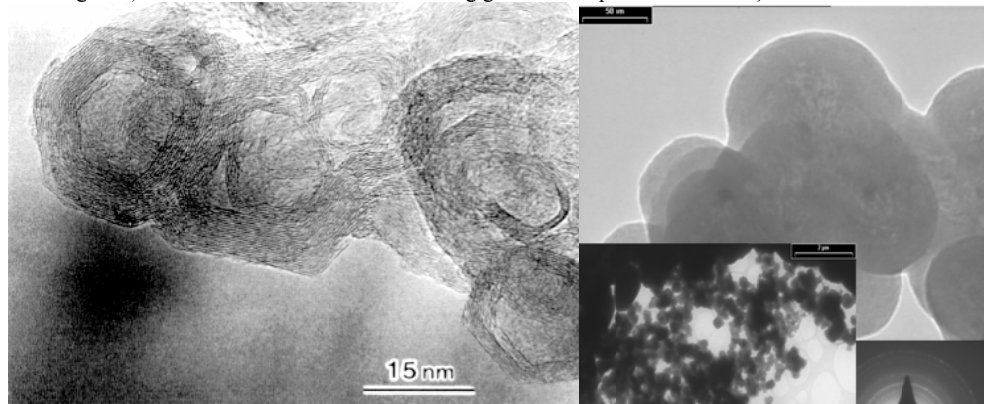


A. a) Sferule de CB-R, scala 100nm; b) model pentru CB, distribuție aleatoare a planelor grafenice (BSU) în sferula de CB c) CB tratat termic la 3000K, alinierea BSU- este circumferențială d) dispunerea grafenelor în CB e) CB- parțial corodat în plasmă-deschiderea canalelor cu formare de nanopori [11,14, 16]



B)

B) NC-LP1-precursor etilenă/acetilenăre, structură turbostratică tipică a) scala 100nm b) 10 nm c) Detalii morfologice d) HRTEM- contrast de fază- se disting grafenele dispuse circumferențial



C) LP-NC3 din precursor de benzen, structură cu fullerene multistrat și mari canități de PAH

D) NC-CVD2, din precursor toluen, sferule de nanocarbon multistratificate

D)

Figura 9.5-Structuri de nanocarboni utilizați la formarea de medii bionanocompozite (BNC) cu matrice biologică pe bază de medii de cultură Chapman și AABTL

**Matricea biologică:**

Pentru microorganismele Gram pozitiv, respectiv culturi de Staphylococcus aureus, s-a ales un mediu Chapman cu adaos de manitol.

Pentru microorganismele Gram negativ, respectiv culturi de *Escherichia coli*, s-a ales un mediu de cultură uzual AABTL.

#### *Prepararea mediilor de cultură bionanocompozite*

În vederea obținerii de colonii microbiene pe mediul de cultură, acesta se topește la o temperatură de 90°C, după care se toarnă pe o placă Petri 3ml de mediu de cultură. Pe acesta placă, după ce mediul de cultură se solidifică prin răcire, se însămânțează folosind o ansă, tulpinile microbiene. Acesta este procedeul normal de însămânțare pe mediul de cultură al coloniilor microbiene. Dispersia de nanocarboni în aceste medii este dificilă datorită diferențelor mari de densitate și proprietăților de autoaglomerare rapidă, de adsorbție pe suprafață de componenți nedorți ce conduce la atenuarea activității acestora.

Din acest motiv metoda de preparare este laborioasă și necesită o serie de etape după cum urmează:

1. Se dozează pulberea pentru concentrații de 0.01, 0,1 și 1% (grame nanocarbon la 100 grame mediu de cultură). Se usucă fiecare cantitate prin desicare sub vid de argon
2. Transferarea pulberii în 10ml ser fiziologic (cel mai bun rezultat se obține cu serul fiziologic prepart din apă mili-Q, ultrapură,) ultrasonat sub vid pentru o cât mai bună dezoxigenare.
3. Ultrasonarea eprubetei cu ser fiziologic și nanocarboni timp de 20 min la o putere de minim 60W. Din observațiile experimentale se constată că cea mai bună soluție este ca și ultrasonarea să se realizeze în condiții de vidare sau atmosferă inertă.
4. Se toarnă mediul topit pe plăcile Petri așezate în baia de ultrasonare simultan cu serul fiziologic ce conține nanocarboni cu agitare manuală viguroasă în câmpul ultrasonor al băii. Operația de agitare continuă pînă la punctul de gelificare după care se lasă la agitație ultrasonică timp de 20-30 min pînă la solidificare completă.

Se recomandă pentru studii și cercetări de mare acuratețe ca serul fiziologic cu nanocarboni să fie trecut prin etape de micro/nanofiltrare astfel încît să se selecteze fracții de nanocarboni cu dimensiuni într-o plajă cît mai îngustă.

Inspecția vizuală și optică arată un mediu omogen fără particule aglomerate sau fenomene de coalescență. Funcție de natura experimentului se poate utiliza în locul serului fiziologic eluenți cum ar fi: alcoolul etilic, acetat de etil, toluen, cu precauțiile necesare asupra scopului experimentului și nivelului de sterilizare.

Pe aceste medii de cultură se fac însămînțări din culturi proaspete de o zi prin procedee normale care demonstrează că față de mediile normale pe bionanocompozite acestea cresc într-un timp mult mai scurt și sunt mult mai viguroase.

Au fost efectuate experimente pe mai multe loturi de probe:

- De la fiecare pacient recoltat s-au făcut însămînțări pe cele trei tipuri de concentrații ale aceluiași tip bionanocompozit cu, 0,01%; 0,1%; 1%, conținut de nanocarboni, și o însămînțare pe mediul de control, simplu.

- S-au testat totodată tipurile de nanocarbon conform cu tabela 9.1 (nanocarboni din ardere incompletă, carbon turbostratic cu alchene și carbon aromatic (benzen, toluen), care are un conținut ridicat de hidrocarburi poli-aromatice și fragmente de fulerene.

În figura 9.6 sunt prezentate coloniile de *Staphylococcus aureus* crescute pe mediul de referință și pe bionanocompozite cu concentrații diferite.

Se observă că:

- BNC cu CB-R (negru defum de canal) și CB-P (negru de fum de furnal), nu prezintă nici o îmbunătățire importantă, coloniile sunt slab dezvoltate, aleator dispersate, de dimensiuni mici. Pigmentogeneza lipsește sau este slab reprezentată. (din tabela 9.1)
- BNC cu NC-LP1 (nanocarbon din piroliză laser, precursori etilenă):
  - La concentrația de 0,01% coloniile sunt bine dezvoltate similare cu referința sau ușor mai mari. Pigmentogeneza este normală.
  - La concentrația 0,1% creșterea este explozivă cu pigmentogeneza remarcabilă.
  - Peste această concentrație, la 1%, creșterea este slab reprezentată, atipică iar pigmentogeneza lipsește.
- BNC cu NC-LP3 (nanocarbon cu fragmente fullerenice și PAH-uri):
  - La concentrații de 0,01% se observă o creștere atipică de colonii.
  - La 0,1% creșterea este remarcabilă și pigmentogeneza bine reprezentată.
  - La 1% creșterea un este evidentă, colonii slab reprezentate

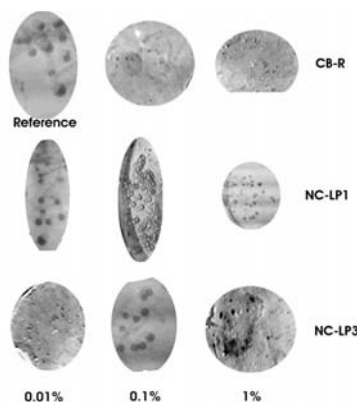
Toate aceste observații sunt sumarizate în tabela 9.2.

Tabela 9.2-Comparație calitativă a virulenței în BNC

BNC	0.01%	0.1%	1%
CB-R	N. O	M	Ca in R
CB-P	N.O	M to WD	Ca in R
NC-LP1	W D	<b>Exploziv</b>	Pigmentare atipică
NC-LP2	slab	Nu	nu
NC-LP3 & NC-CVD2	Forme atipice	W. D , pigmentare atipica	neconclue nt

N.O- diferențe neobservabile M-evoluție moderată ;  
WD-colonii bine dezvoltate, R-referința

Figura 9.6- Creșterea de colonii de *Staphylococcus aureus* pe BNC cu diferite specii de nanocarboni și la diferite concentrații



Pentru evaluarea eficienței acestor medii de cultură s-au efectuat experimente de incubare la diferiți timpi urmată de inspecția microscopică. S-a urmărit scurtarea timpului de analiză bacteriologică și de identificare a speciilor de microorganisme. În figura 9.6 se

reprezintă dependența dezvoltării de colonii funcție de timpul de incubare pentru două din concentrațiile de nanocarboni din BNC considerate optime. Se constată că diagnosticul microbiologic poate fi redus de la 24-48 de ore la 4-8 ore. Creșterea accelerată a acestor tipuri de microorganisme cu dezvoltare de colonii viguroase și pigmentogeneză bine reprezentată este consecința interacției acestora cu nanocarbonii din mediul de cultură bionanocompozit.

Microorganismele aerobe, precum *Staphylococcus aureus* au nevoie de oxigen pentru dezvoltare iar nanocarbonul are o foarte mare afinitate de a adsorbi oxigenul din atmosferă și al concentra. Acesta este fenomenul principal ce stă la baza relației nanocarbon-microorganism. Nanocarbonul are funcția de a „pompa oxigenul” în mediul cultură prin următorul mecanism: adsorbția preferențială a oxigenului din atmosferă și concentrarea în jurul său. Mecanismul de transport implicat este diferența de concentrație și difuzia prin microporii bionanocompozitului.

Din datele de analiză structurală și spectroscopie FT-IR arată prezența de grupări OH și carbonil legate covalent de suprafața nanocarbonilor ce au proprietăți de schimbători de ioni. Aceasta este benefic pentru microorganismele aerobe mari consumatoare de oxigen dar ar putea avea un impact major negativ atunci când vin în contact cu tegumentele și pielea. Caracterul de nanoelectrolit al nanocarbonilor poate schimba pH-ul local al filmelor hidrolipidice și aciditatea pielii favorizând astfel atacul microorganismelor. Astfel se deschid multe canale pentru infecția microbială.

În concluzie se poate afirma:

- BNCul conceput ca un gel cu nutrienți specifici și cu nanocarboni este un bun mediu de cultură ce asigură o creștere accelerată a bacteriilor aerobe, în particular genului *Staphylococcus*.
- Nu orice nanocarbon este o bună pompă de oxigen prin urmare nu induce creșteri spectaculoase.
- Concentrațiile considerate optime sunt probabil și acelea ce se găsesc în natură și care pot influența aderența microorganismelor pe tegumente favorizând astfel infecția primară.
- Peste concentrația de 1% se poate considera că nano-carbonii pot fi bacteriostatici sau bactericizi funcție de natura și structura lor.

Necesitatea unui răspuns mai rapid la investigație clinică bacteriologică cere funcționalizarea unui material avansat în mediul de cultură care să accelereze timpul de detecție al infecției microbiene

Rezultate experimentale prezentate au arătat că microorganismele în contact cu nanoparticulele de compoziție și structură diferită au o comportare extrem de diferită în ceea ce privește capacitatea de adaptare și dezvoltare. O deosebită importanță trebuie acordată impactului nano-particulelor asupra evoluției microorganismelor patogene și a influenței acestora asupra diferitelor tipuri de boli de piele. Din acest motiv conceperea unor structuri de bionanocompozite cu nanoparticule carbonice simple ar putea da câteva răspunsuri extrem de importante pentru medicină și industria medicamentelor.



Rezultatele acestui studiu conduc la concluzia că se poate schimba sau îmbunătăți diagnosticul microbiologic în sensul scurtării timpului de analiză și identificării microorganismelor patogen.

Deasemeni se poate explica de ce stafilocociile cutanate sunt atât de frecvente în diagnosticul dermatologic, unele sunt greu de tratat și de ce frecvența lor este din ce în ce mai mare

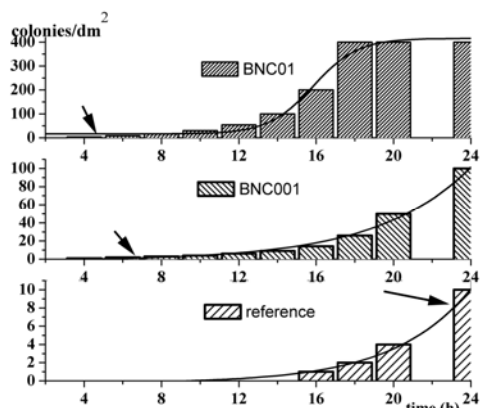


Figura 9.6-Rata de creștere la două concentrații BNC001 și BNC01 raportate la referință funcție de timpul de incubare. Săgeata indică momentul vizibil al creșterii sub lupa microscopică [24]

### 9.3 Puncte cuantice

De la apariția apei pe pământ, proprietățile naturale de dizolvare- cristalizare a sării sunt perpetue. În timpul cristalizării o soluție suprasaturată trece prin stadiul de nucleație, dimensiunea cristalitelor fiind de domeniul nanometrilor.

Un exemplu concludent este cel al mării Aral, care poate fi socotit un exemplu la extrem prin dimensiunea producerii lui. De multe ori în istoria sa, volumul mării Aral s-a schimbat dramatic datorită variațiilor climatice. În ultimii 30 de ani reducerea mării cu 60%, a condus la o concentrare a sării de 25%. În anumite momente din istoria etapei de nucleație au apărut și sunt prezente tone de nanocristale de clorură de sodiu dispersate în apă. Imaginile luate din staelit arată o reflexie atipică când acest fenomen are loc.

Din istoria evului mediu putem aminti sticla de geam frumos colorată a catedralelor, vitralii, ce conțin particule de zinc, cadmiu, seleniu, sulf. Catedrala Notre Dame din Strassbourg se mândrește și astăzi cu frumoasele ei vitralii, și este foarte posibil ca acestea să fie nanocristale ale compușilor, zinc-cadmiu-sulf-seleniu cu proprietăți specifice de emisie sub acțiunea spectrului superior a luminii naturale.

Relativ recent mecanica cuantică, a demonstrat că electronii liberi se pot confina într-o groapă de potențial iar particule cu dimensiuni nanometrice pot expulza electronii spre periferie formând un „pseudoatom” similar modelului lui Bohr cu un nucleu dintr-un

miez de ioni în jurul căruia gravitează electronii generând un spectru discret similar dar la energii mult mai mici.

Termodinamica descompunerii fazei prin difuzie controlată a unei soluții suprasaturate a fost dezvoltată și experimentată pe aliaje metalice arătând că pot fi formate particule nanometrice stabile. Chimia colizilor a furnizat procedee de stabilizare fără înglobare în structuri micelare. Sintezele sol-gel de preparare de nanoparticule au devenit un instrument uzual.

### **Istoric**

1973 LEO ESAKI primește premiul nobel pentru dezvoltarea de structuri cuantice semiconductoare, teoria confinării unidimensionale.[29]

1980. EKIMOV și EFROS, de la Institutul IOFFE, au observat formarea de puncte cuantice în structura unei sticle conținând Pb S.[30]

1983 LOUIS BRUS s-a ocupat de confinarea tridimensională de puncte cuantice crescute în lichide organice.[31]

1984 TADASHI ITOH dezvoltă teoria confinării tridimensionale în punctele cuantice crescute în volumul cristalelor de clorură de cupru și clorură de sodiu.

1997, profesor WARREN CHAN, de la Universitatea din Indiana a pus în evidență o metodă pentru vizualizarea unei singure proteine și a virusului în acțiune. În același an a fost posibilă demonstrarea prezenței oligonucleotidelor legate de DNA, prin legarea lor de punctele cuantice, un pas important în domeniul analizelor genetice.[32]. Ulterior bioconjugatele conținând puncte cuantice au arătat un drum nou pentru studiile fundamentale în biologie.

AKERMAN și echipa sa au demonstrat în 2002, că polimeri ce au în componenta lor puncte cuantice au fost folosiți pentru diagnosticul cancerului la soareci.[33]. NIE și GAO, 2002, Universitatea Emory- Georgia Tech, au injectat polimeri cu puncte cuantice la soareci urmărind procesul de carcinogeneză și de metastazare.

2003, la Universitatea din Toronto, profesorul RED SARGENT și grupul său au observat electroluminiscenta în infraroșu (1000-1600 nm) a nanocristalelor de sulfură de plumb, imersate într-un polimer semiconductor. Aceste nanocristale sau materiale de polimeri hibridi constituie platforma de plecare pentru electronica integrată, tehnologia optică și cea a comunicațiilor. Toate aceste importante descoperiri ale electroluminiscentei sau fluorescenței, bazate pe prezența punctelor cuantice are utilizări în biologie și medicină, cu condiția să fie biocompatibile, netoxice. În acest sens pledează și experimentul efectuat în anul 2002, când s-a reușit încorporarea de puncte cuantice în micelle de fosfolipide, rezultând un polimer fluorescent.[34]

### ***Puncte cuantice-nanocristale semiconductoare***

Punctele cuantice sunt cristale semiconductoare nanometrice din clasa compușilor binari II-VI, III-V sau III-VI. Nu sunt semiconductori tradiționali. Practic aceste tipuri de materiale nu sunt noi și nici fenomenele fizice implicate- cum ar fi fluorescența dependentă de dimensiune. Elemente clasice din fizică cum sunt structura de benzi, raza Bohr, excitoni concurează la fenomenul de fluorescență amplificată, dependentă de dimensiunea nanocristalelor semiconductoare.

În figura 9.7 sunt prezentate elementele de bază a trecerii de la un semiconductor normal cu dimensiuni macroscopice la un Q-dot și fenomenele implicate pentru a obține fluorescență amplificată. Electronii în volumul unui material semiconductor cu dimensiuni mult mai mari de 10 nm au larg spectru de nivele de energie. Fiecare electron ocupă un nivel energetic dat și este stabilit că numai doi electroni pot ocupa acest nivel (principiul de excluziune a lui Pauli).

În volumul semiconductorului nivelele de energie sunt foarte apropiate astfel încât poate fi considerat a fi un spectru energetic continuu (figura 9.7c). Tot ce este ocupat și contribuie la formarea legăturilor chimice formează banda de valență. Există o limită superioară de energie pe care electronii o pot ocupa în banda de valență. Pentru a părăsi zona de valență și a deveni liberi să conducă un curent electric este necesar un supliment de energie bine definit. Acest interval de energie se numește bandă interzisă. Prin urmare nivelele de energie situate sub banda interzisă formează banda de valență iar nivelele energetice de deasupra benzii interzise formează banda de conducție. Dacă un stimul extern va furniza asupra electronilor din banda de valență suficientă energie atunci el va trece din banda de valență lăsând în banda de valență un gol pozitiv. Astfel se formează o pereche electron-gol care se numește exciton.

Prin urmare există un minim de energie a radiației ce provine de la stimulul extern pentru a produce generarea de perechi electron-gol. Banda interzisă are un profil energetic bine stabilit prin compoziția și structura semiconductorului. Electronii care au tranzitat banda interzisă în banda de conducție vor staționa un anumit timp după care se vor reîntoarce în banda de valență –starea lor naturală. Revenirea în banda de valență se realizează prin emisia unei radiații electromagnetice cu o lungime de undă bine precizată egală cu energia pierdută datorită tranziției. În general tranziția electronilor se realizează de la marginea inferioară a benzii de conducție la marginea superioară a benzii de valență.

Pentru semiconductorii clasici aceste tranziții produc emisii cu o frecvență fixată.

Punctele cuantice oferă o abilitate nenaturală și anume de a-și acorda banda interzisă și de aici lungimea de undă a radiației emise. Dacă privim figura 9.7 e,f observăm că perechea electron-gol este separată de o anumită distanță. Ne putem imagina că electronul părăsind un atom din structura sa el va gravita pe o rază dată în cristal fiind strict dependentă de proprietățile acestuia.

Distanța dintre electron și ionul de unde a plecat se numește raza excitonului sau mai simplu “raza Bohr a excitonului”, termen împrumutat de la modelul Bohr al atomului de hidrogen.

Dacă privim formarea benzilor de energie de la un semiconductor normal spre un Q-dot observăm imediat că atunci când dimensiunea acestuia este mai mică decât raza excitonului ( $R_e$ ) nivelele energetice devin discrete iar electronul este constrâns să evolueze în spațiul delimitat de nanocristal (fenomen denumit confinare cuantică), figura 9.8

Fluorescența punctelor cuantice este net superioară oricăror tipuri de coloranți utilizați în tehnicile de biologie, microbiologie, pentru etichetarea și eșantionarea materialelor biologice

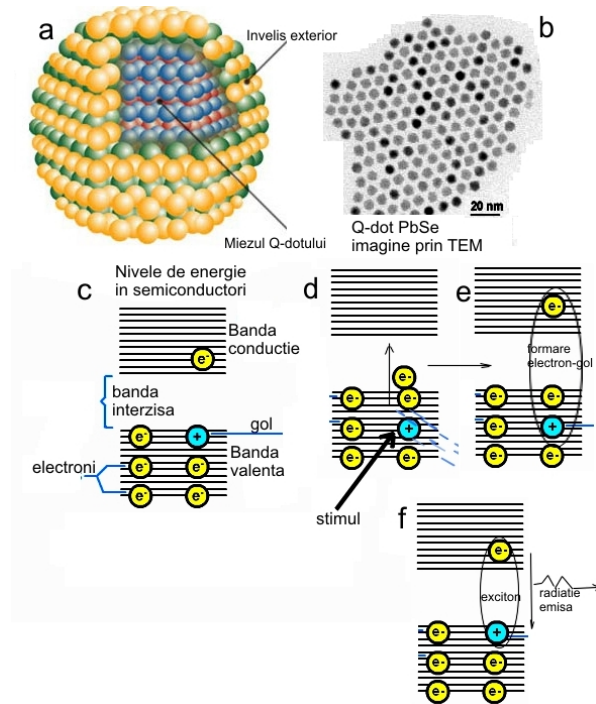


Figura 9.7-Formarea unei perechi electron-gol (exciton) și fenomenul de fluorescență amplificată.

- Q-dot cu dimensiunea de  $\sim 30\text{nm}$  miezul este un nanocristal de CdSe iar învelișul de stabilizare este ZnS.
- Nanocristal de PbSe (imagine TEM), se observă natura cristalină și dispunerea ordonată a atomilor de Pb (puncte negre) și de Se
- structura de benzi a unui semiconductor normal (electronii ocupă la temperaturi normale numai banda de valență).
- sub acțiunea unui stimul extern (radiație e.m) electronul sare în banda de conducție lăsând un gol
- perechea electron-gol este un cuplu instabil ce evoluează în volumul cristalului ca o cuasiparticulă- excitonul.
- Recombinarea lor (reîntorcerea electronului în banda de valență) are loc cu emisia de radiație cu o frecvență bine precizată.

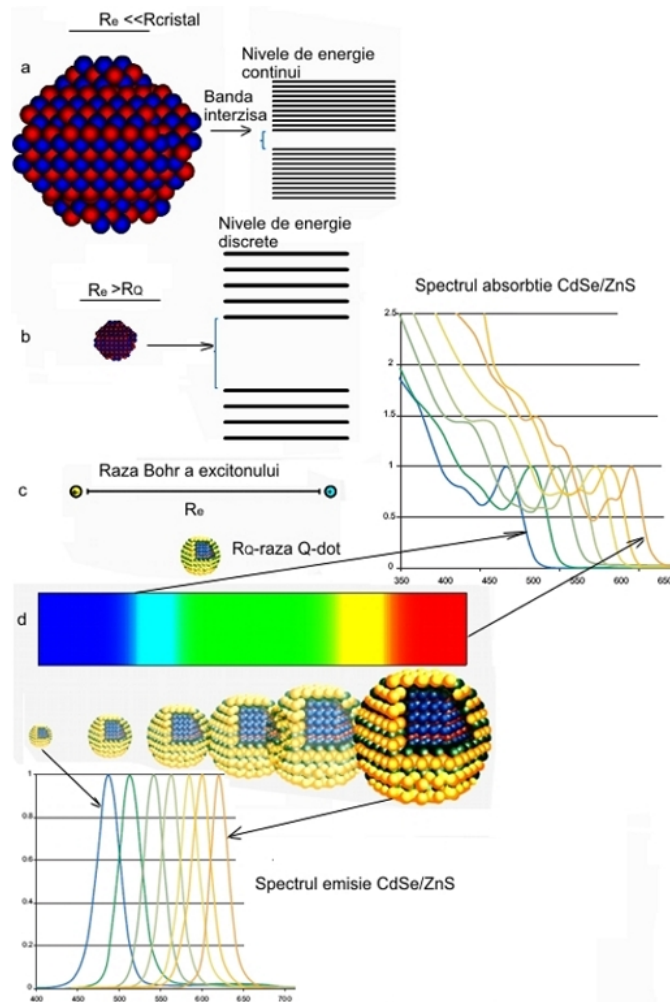


Figura 9.8-Trecerea de la un cristal normal ( a ) la un nanocristal ( b ) conduce la discretizarea nivelelor benzilor de energie și depența lărgimii benzii interzise de dimensiune. Când raza excitonului,  $R_e$ , este mai mare ca  $R_Q$  atunci absorbtia radiației se realizează pe domenii largi iar emisia este extrem de îngustă proporțională cu dimensiunea Q-dotului

### Aplicațiile punctelor cuantice

#### Microdomenii de celule maligne ( cancer protein microarrays)

Scopul este identificarea și localizarea zonelor microscopice de celule maligne.

Cercetarea în domeniul biologiei celulare și a proteinelor este de a găsi noi proteine țintă, specifice unor produse farmaceutice și de biomarkeri în vederea managementului cancerului și a altor boli umane.

De exemplu ( Evident Technology și Protea Biosciences) se dezvoltă o serie de cupluri anticorpi-puncte cuantice pentru investigarea de serii de proteine canceroase. Prin simple investigații de probe se pot identifica configurații de proteine cu expresii diferențiate dintr-o matrice de proteine. Mai mult microzone de țesut din diferite tipuri de cancer pot fi identificate cu anticorpi cuplați cu puncte cuantice fluorescente.

#### Absorbția celulară de receptori mediați cu puncte cuantice

Utilizarea punctelor cuantice ca „sonde” intracelulare prezintă un potențial imens prin faptul că ele pot fi absorbite în celulă. Tipuri de puncte cuantice solubile în apă (WSQD) prezintă avantajul că pot fi transferate în celulă prin metoda receptorului mediat prin conjugare la o proteină de transfer.

Din figura 9.9 se observă că funcționalizarea punctelor cuantice se realizează în general prin straturi lipidice (naturale sau sintetice) covalent legate de învelișul de ZnS prin intermediul atomilor de sulf. Structura acestor tipuri de puncte cuantice este formată dintr-un miez de cristal nanometric de InGaP ce conferă o bună toleranță la toxicitate.

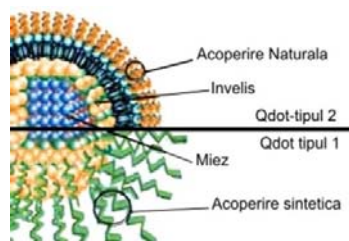


Figura 9.9 -WSQD – cu funcționalizare naturală cu lipide (tipul 2) respectiv funcționalizare sintetică (tipul 1.)



Figura 9.10- Imagistică cu WSQD în domeniul NIR pentru identificarea tumorilor ( evidenttechnology.com)

Studiile au arătat că toxicitatea punctelor cuantice cu miez de CdSe se datorează ionilor de Cd ce se eliberează în celulă. Fenomenul se datorează acțiunii oxigenului ca rezultat al expunerii la UV timp îndelungat al punctelor cuantice.

Acoperirea cu ZnS crează o suprafață mai benignă la aceste fenomene. Desigur punctele cuantice se pot acoperi cu polimeri însă în foarte multe cazuri acești produc moartea prematură a celulelor. Studiile de citotoxicitate au arătat că sistemele InGaP/ZnS sunt mult mai limitate în toxicitate [35, 36,37]

Un exemplu al cercetărilor actuale cu tipul 2 este prezentat în figura 9.10 unde WSQD sunt utilizate în investigarea tumorilor prin tehnici de imagistică în domeniul NIR

(infraroșu îndepărtat) unde țesuturile sunt transparente iar tumorile pot fi puse în evidență prin fluorescență directă. În figura 9.10 este prezentat un exemplu pe un șoarece cu o tumoră cărui i s-a injectat 100 pmol de WSQD tipul 2 diluate în ser fiziologic. Se observă un contrast evident dintre localizarea tumorii și țesuturile normale. Distribuția prin sistemul limfatic, vezica urinară și ficat practic este inexistentă. Investigarea prin imagistică optică în domeniul NIR combinat cu punctele cuantice poate produce un impact major în detecția și diagnosticul și tratamentul cancerelor

#### *Punctele cuantice un instrument versatil în științele vieții*

Multiplexarea spectrală. Qdoturile emit o radiație caracteristică cu lungime de undă fixă independentă de sursa de excitație. Prin urmare Qdoturile pot fi combinate în același test sau analiză și cu aceeași sursă de excitație furnizând un semnal ce poate fi multiplexat. Aceasta permite utilizarea lor în matrici sau în sisteme cu rezoluție spațială

Qdoturile au arătat că sunt foarte eficiente pentru transferul rezonant de electroni (donori de electroni) spre fluoroforii organici datorită unei largi acoperiri dintre spectrele de emisie și absorbție a coloranților. Deoarece caracteristicile de emisie ale Qdoturilor pot fi acordate continuu este posibil de a crea un număr de donori prin transfer rezonant de energie, pentru orice tip de colorant organic care de obicei emit aproximativ între 510-640 nm

#### Microscopie și colorarea celulelor, imagistică in vivo

Qdoturile conjugate cu anticorpi au fost cu succes introduse în celule permeabilizate și folosite pentru colorarea citoskeletonului, centromerilor, cinetocorilor, organele din broască sau embrioane de nematode. Datorită fotostabilității mari și proprietăților de multiplexare a culorilor multiple componente celulare pot fi observate în dinamica lor folosind microscopia confocală cu fluorescență. Deasemeni studiul metabolismului celular devine cu punctele cuantice ușor de investigat ca de altfel orice tip de fenomen de transport

#### Analize imunologice

Punctele cuantice conjugate cu anticorpi primari au fost folosite pentru colorări preferențiale a suprafeței E. Coli patogene și respectiv nepatogene. O excelentă diferențiere între cele două specii poate fi realizată prin analiză de multiplexare a fluorescenței cu diferite puncte cuantice.

#### *Puncte cuantice fluorescente, imagistică de fluorescență, aplicații în microbiologie, parazitologie, hematologie*

Se va enumera câteva din aplicații ale punctelor cuantice bioconjugate solubile în apă cu exemplificări acolo unde este posibil

#### Evidențierea activității celulare prin indexare fluorescență:

- „Traficul molecular” intra și extracelular
- Urmărirea diferențierii celulelor stem
- Monitorizarea instabilității genetice
- Localizări moleculare la nivel celular

### Imagistică moleculară

- Detecția timpurie a bolilor și monitorizarea tratamentului
- Modalități multiple de imagistică non invazivă (PET, SPECT, MRI, UV-Viz, agenți de contrast optic)

### Selectii și sortări de înaltă performanță a materialelor biologice

- Microarii (proteomică, genomică)
- Coduri de bare

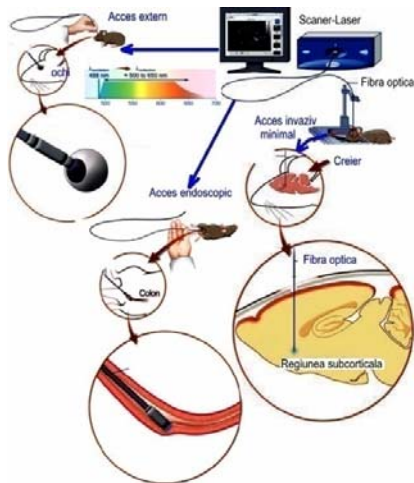
### Citometrie reologică

- Măsurarea multiplă și simultană a parametrilor celulari (conținutul de acizi nucleici, activitatea enzimatică, fluxul de calciu, potențialul membranei, pH)
- Sortarea celulară (separarea celulelor sau a sub componentelor acestora)

### Fluorescență rezonantă cu transfer de energie (FRET)

- Identificarea interacției dintre două sau mai multe molecule
- Înlocuirea fluoroforilor clasici și extinderea domeniului de fluorescență cu surse de excitație minime

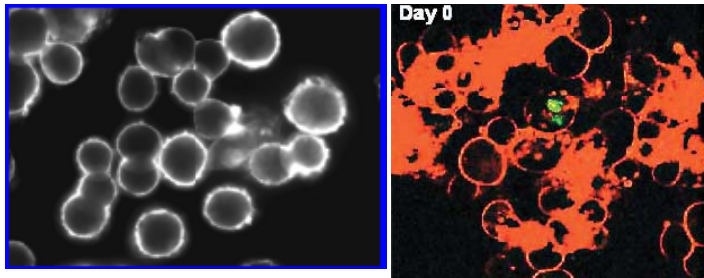
Se constată că punctele cuantice deschid o nouă etapă în tehnicile de analiză și investigație datorită fotostabilității mult mai mari față de fluoroforii clasici cu fluorescență îndelungată permițând astfel să se investigheze mecanisme moleculare și să elimine contaminările spectrale ce necesită metode de corecții suplimentare. Montajul de figura 9.11 descrie eficiența noilor materiale ca instrumente de investigație a materiei vii.



*Figura 9.11.* Metodă de investigație a structurilor organismelor vii prin metoda microscopiei de fluorescență confocale cu fibră optică. Fibră optică este formată dintr-un set de microfibre din care una este de excitație. Unitatea laser de scanare conține microscopul confocal, optica de mărire și detectorul CCD de prelucrare imagin (20-50 cadre/sec). Dioda laser cu  $\lambda=488\text{nm}$  poate excita toată gama de puncte cuantice dar și fluorofori clasici (Syto13, Yoyo1, FITC, CellTracker Green, Calcein, Rhodamine, 123 or 6G, Cy3,). Sunt prezentate trei aplicații: acces extern, endoscopic și invaziv minimal (cu permisiunea Cellvizio tech)

În figura 9.12 sunt prezentate câteva cazuri de investigație cu Qdot funcționalizate a materialelor biologice la nivel celular respectiv molecular.

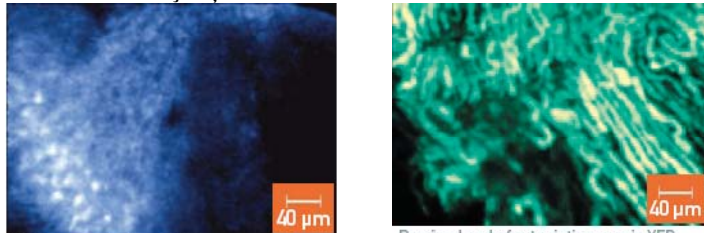




Explorarea transformării liniilor celulare mamliene cu Q-dots  
Carcinom de colon- liniile HT29 și SW 1222  
(detalii, evitenttechnology.com)

Figura 9.12 a. Celule neoplazice etichetate cu Qdot conjugate. Marcherul cancerului de plămâni, Her2, s-a detectat pe celule cu o combinație de Herceptin biotinilat

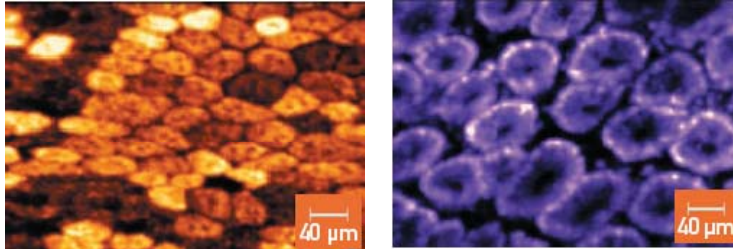
**Cercetări în neuroștiințe**



- \*Imagistică în adâncimea creierului
- \*Neurogeneză Postnatală
- \*Boli neuro-degenerative
- Celule stem & terapie regenerativă
- \*Reparații neuronale

GFP neurons in the striatum, investigation Proximal end of cut sciatic nerve in YFP transgenic mouse

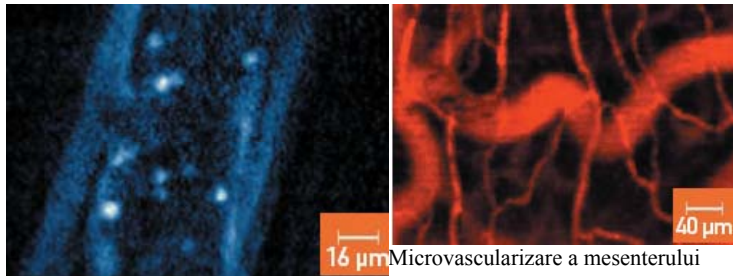
**Cercetarea cancerului**



- Observații histologice in vivo
- Angiogeneza tumorilor
- Imunoterapie
- Caracterizare criptfoci
- Cancere colorectale

Prismatic superficial cells of the rat bladder, investigation Glandular organization of the mouse colon

**Cercetări microvasculare**

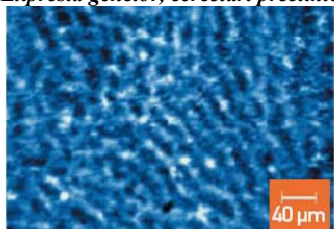


- Arhitecturi microvasculare
- Angiogeneza
- Hemodinamica
- Interacția leucocite-endotelium, inflamații
- Permeabilitatea vaselor
- Densitatea capilarelor

Leucocite Microvascularizare a mesenterului

Figura 9.12.d- Explorări sanguine

### Expresia genelor, cercetări preclinice



← detecția drogurilor în ficat  
\* Distribuția medicamentelor  
\* Monitorizarea Apoptozei  
\* Toxicitatea celulară

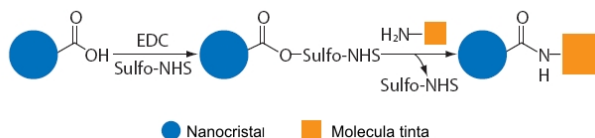
Rezultate puse la dispoziție prin amabilitatea firmei Evident technology

Figura 9.12-e Exemple de aplicații ale punctelor cuantice în medicină și biologie, explorări genetice

### Protocoale elaborate pentru investigarea și identificare unor clase de microorganisme

#### Materiale

Punctele cuantice utilizate în experimente au fost achiziționate de la Evident technology, SUA. Protocoalele de funcționalizare s-au derulat sub asistența firmei care a



furnizat materialele și substanțele necesare.

#### Protocoale de funcționalizare puncte cuantice

##### Principiul funcționalizării

Funcționalizarea punctelor cuantice prin conjugare cu proteine, oligonucleotide și alte molecule de interes poate fi relativ ușor realizată prin protocoale de complexitate medie. Reacțiile care au loc sunt următoarele:

**Protocol 1-** Legarea chimică a *streptavidinei* la punct cuantic tip Evitag (firma Evident Technology) funcționalizat cu grupări carboxilice

*Materiale* : (sursa Evident technology)

1. Puncte cuantice CdSe/ZnS funcționalizate cu grupări carboxilice (EVITAG-Andirlock, emisie 540 nm, excitație sub 450 nm (de la albastru spre UV), 0.25mg/ml
2. Microfiltre pentru separare prin centrifugare- Pall Nanosep tip 100k - 300kMWCO
3. Soluție EDC [(1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl 200 mg/ml- livrată cu punctele cuantice
4. Sulfo-NHS (N-hydrocylsulfo-succinimide)- 0.15mg/ml, apă DI

5. 10x: (1.37M NaCl; 27mM KCl; 101.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 17.6mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7.4, soluție tampon conform cu specificațiile producătorului EVITAG notată PBS și preparată în laborator
6. Apă sterilă
7. Streptavidin (5mg/ml)

*Metoda*- filtrare prin centrifugare, legare chimică ultracentrifugare

*Echipamente*- centrifugă laborator, lampă UV, seringi microlitrice, fiole de stocare

*A) activare* carboxi-EVITAG prin combinare a următorilor reactivi, incubare la temperatura camerei 1h, agitare manuală :

- 50μl- apă sterilă
- 40μl 10x PBS
- 200μl EviTags (0.25mg/ml)
- 10μl EDC (200mg/ml)
- 100μl sulfo-NHS (0.15mg/ml)

Cantitatea excesivă de sulfo-NHS este eliminată prin colectarea soluție după limpezire, expunere la UV, observarea părții fluorescente a soluției.

*B) Desalinizare centrifugală*

- Asamblare filtru umectat în PBS în fiola de centrifugare
- Încărcare filtru cu soluția de la punctul A, centrifugare min 6000 rpm minim 15 min până <10% din soluție rămâne deasupra filtrului
- adăugare 500 μl la soluția colectată și 1xPBS, filtrare normală pe hârtie milipor dacă este cazul
- Verificare fluorescențăcu expunere la UV.

Soluția se păstrează în condiții normale

*C) Conjugare: prin adăugarea proteinei de interes ( 100μl Streptavidin, 5mg/ml)*

Un raport de 10:1 streptavidin la EviTag, raportul utilizat fiind mg/mg

Incubarea soluției activate și desalinizate de la punctele A și B cu streptavidin la temperatura camerei, agitare liberă. Soluția cu EVITAG –streptavidin se poate realiza după 2 ore. Stabilitatea este 6 luni.

Protocolul 1 este adaptat după specificațiile firmei Evident technology și corectat cu referința [38]

## **Protocol 2**

*Materiale*

1. Soluție tampon fosfat de sodiu , 0.5M, pH 6.0
2. Soluție tampon , borat de sodiu , 0.5M, pH 8.3
3. Streptavidin, 10mg/ml în apă distilată
4. EviTags, 2nmol/ml în apă distilată
5. EDC

## 6. sulfo-NHS

### *Echipamente*

- Ultracentrifugă
- Lampă UV
- Baie ultrasonică

A) *Activare* carboxi-EVITAG prin combinare a următorilor reactivi, incubare la temperatura camerei 30h, agitare manuală

- 2ml EviTag
- 0.4ml fosfat de sodiu
- 20mg EDC
- 15mg sulfo-NHS

B) *Desalinizare* mixtura de reacție prin ultracentrifugare ( max 140000 g), 40 min

C) *Aspirare* ( prelevare) supernatant cu verificare fluorescență

D) *Conjugare* .

- 0.5ml streptavidin, 10mg/ml)
- 1.5ml apă distilată
- 0.4ml sodium borate buffer

E) Incubare RT în baie ultrasonică pînă cînd precipitatul se dizolvă

F) Agitare fiolă timp de 2h

G) Stocare 12 h în fiolă închisă

H) Centrifugare la 40000 rpm min 80 min

I) Recuperare supernatant în fiolă cu 5ml apă

J) Se repetă pașii H-I dacă controlul fluorescenței nu este corect sau prezintă turbiditate peste noapte

K) Păstrare: 4°C la întuneric

Acest protocol este în general satisfăcător pentru analize curente de microscopie de fluorescență pentru investigații uzuale și în parazitologie [39, 40]

### Protocol 3

*Cuplare oligonucleotide sulfhidril modificate la puncte cuantice EviTags funcționalizate cu grupări aminice*

A) *activare amin-EviTags cu sulfo-SMCC*

- Combinare 1:1 molar echivalent de sulfo-SMCC și amin EviTag în 50mM de soluție tampon de fosfat de sodiu pH 7,4 ( PBS , pH7 este deasemeni recomandat)
- Incubare 60 minutes la RT ( temperatura camerei)
- Eliminarea excesului de reticulator cu coloană de desalinizare echilibrată cu soluție tampon de conjugare (1mM EDTA, 0.1M fosfat, 0.15MNaCl, pH 7.2; pentru preparare se adaugă 20μl de 0.5M EDTA la 10ml de PBS pentru

fiecare 10 ml soluție tampon de conjugare necesar). Coloana de desalinizare PD-10, Amershan Nr 170851-01 sau D-Salt-dextran column, Sigma Aldrich

- Frația de EviTag este identificată prin controlul fluorescenței. În caz de diluție mare atunci se filtrează cu filtru 100kD MWCO

*B) Cuplare EviTags maleimid activate la grupările sulhidril*

- Mixare oligonucleotide sulhidril modificate ( sursa EvidentTechnology) cu EviTag maleimid activate în conjugare cu soluția tampon
- Incubare 4 ore la 4°C

*Materiale ( sursa Evident Technology)*

- 1x PBS
- 10x PBS
- Oligonucleotide. 0.1mM (5' sulfhydryl modifi ed oligo)
- BMPA, 200mM (N-β-Maleimidopropiovnic acid)
- Omega Nanosep Column 3000 MWCO
- H<sub>2</sub>O
- Amine EviTags (0.25mg/ml)
- EDC, 100mg/ml
- Tris, 1M, pH 7.4
- Omega Nanosep 3,000 and 100,000 MWCO spin fi lters

*Etape:*

*A) Activare oligonucleotide prin combinare reactivi și incubare 2 h, RT*

- 450 μl 1x PBS
- 25 μl 5' sulfhydryl-modifi ed oligonucleotide (0.1mM)
- 25 μl BMPA (200mM)

*B) Purificare oligonucleotide activate*

Filtrare prin centrifugare cu filtre de centrifugare (Omega Nanosep 3000 MWCO spin fi lter); 15 min la 5000g pentru înlăturarea excesului de BMPA.

Volumul reținut este aprox 140 μl la care se adaugă 1xPBS și aducere la 140 μl

*C) Conjugare EviTag la oligonucleotide activate*

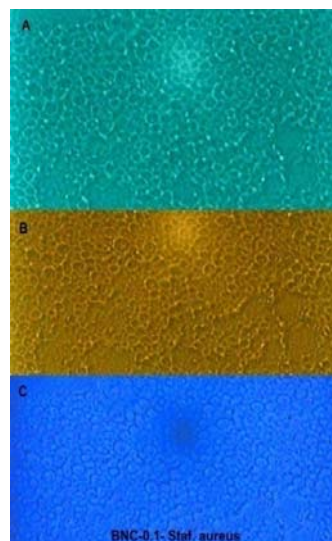
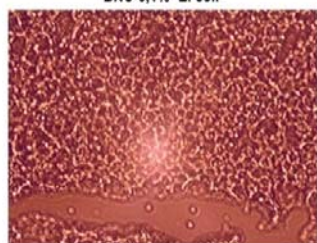
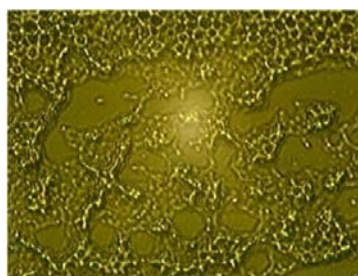
Incubare 2h la RT

- 70μl purifi ed BMPA-oligo
- 270μl H<sub>2</sub>O
- 50μl 10x PBS
- 100μl amine-EviTags
- 10μl EDC (100mg/ml)

La final se adugă 500μl 1M Tris pH 7.4.

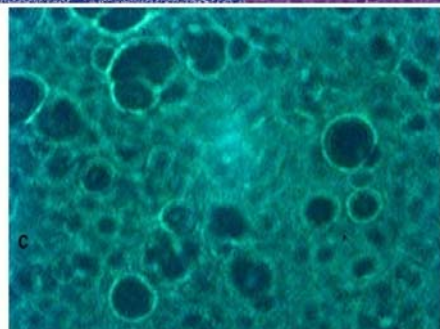
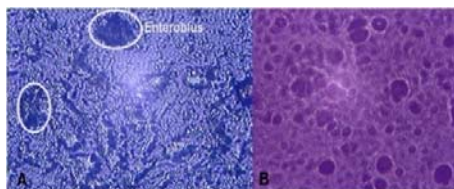
Utilizînd microscopul optic cu cameră video, programul MATLAB cu modulul Image Processing au fost puse în evidență diferite aspecte din laboratorul clinic. De

remarcat că lucrând cu puncte cuantice solubile în apă funcționalizate cu strptavidin (WSQD) s-au pus în evidență culturi de E. Coli pe BNC cu concentrații diferite descrise anterior, Stafilococ aureus pe BNC pe concentrații diferite, identificări rapide de paraziți intestinali ( Enterobius, Giardia, și respectiv investigații de anemii de tip hipocrom )

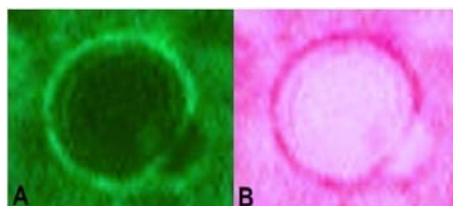


BNC cu 0,1 % și 0,05% nanocarbon, E. Coli Matricea biologică de bază, mediul de cultură AABTL

BNC cu 0,1% NC, cultură Stafilococ aureus. Matricea biologică de bază, mediul Chapman

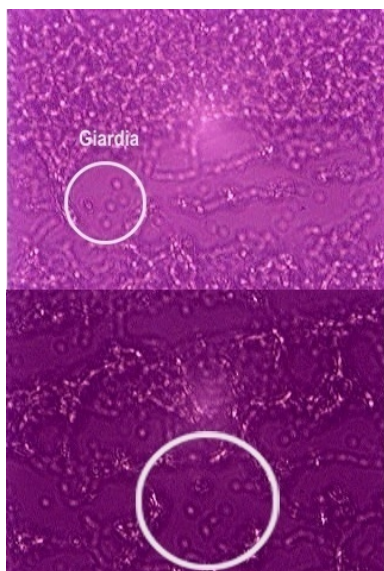


Identificarea cu WSQD de Enterobius în examenul

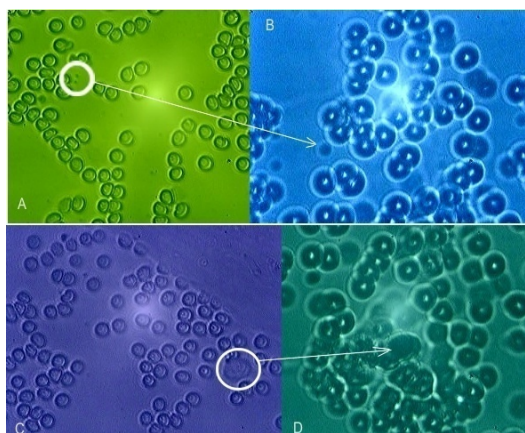


Enterobius, detaliu de fluorescență

coproparazitologic direct



Examen coproparazitologic direct, identificare Giardia cu WSQD



Identificarea anemiilor de tip hipocrom

Tehnica implementată cu WSQD elimină foarte multe din inconvenientele unor biosenzori de fluorescență ele înșele fiind biosenzori fluorescenți individuali. Au proprietăți de stereospațialitate prin funcționalizarea lor cu biomolecule de bioafinități diferite. Înlocuiesc tehnicile clasice de colorare, interferențele dintre lumina de excitație. Se constată că WSQD sunt un instrument extrem de eficient în analizele medicale. Combinarea BNC cu WSQD îmbunătățește substanțial tehnicile punând în evidență numai printr-o simplă inspecție microscopică diferențieri clare ale microorganismelor de tip parazitar. Este o tehnică eficientă care se aplică paraziților cutanați Demodex, scabiae ( care sunt de mare risc și încă nu se pot preparate permanentizate). Instrument de diferențiere a tipurilor de anemii [41]

#### 9.4 Referințe

- 1 Frenot A., Chronakis I.S. Current Opinion in Colloid and Interface Science; 8: 64–75. (2003)
- 2 Bognitzki M., Czado W., Frese T., et al. Adv Mater,13,70. (2001)
- 3 Ko F., Gogotsi Y., Ali A., et al.,Adv Mater; 15,1161-5 (2003)
- 4 Kenawy E.R., Bowlin G.L., Mansfield K., et al. J Contr. Release; 81:57–64. (2002)
- 5 Boland E.D., Wnek G.E., Simpson D.G., Pawlowski K.J., Bowlin G.L. J Macromol Sci, 38:1231–43.(2001)
- 6 Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L. Biomacromolecules; 3, 232–8. (2002)
- 7 Tepper F., Lerner M., Ginley D.American Ceramic Society Bulletin, 80, 57-60. (2001)
- 8 Hartgerink,J.D., Beniash E., Stupp S.I, PNAS; 99, 5133–8 (2002).
- 9 Prum R.O., Torres R.H., Williamson S., Dyck J. Nature, 396, 28–9. (1998)
10. Shawkey M.D., Estes A.M., Siefferman L.M., Hill G.E. Proc Roy Soc, Ser B; 270, 1455-60. (2003)
- 11 Doolittle R.F. Fibrinogen and fibrin. Ann Rev Biochem; 53, 195-229. (1984)
12. Henschen A. Thromb Res;Suppl 5, 27-39(1983)
- 13 Doolittle R.F., Blomback M., Henschen A., et al. Nature; 218, 130-4. (1968)
- 14 Kudryk B., Reuterby J., Blomback B. Thromb Res; 2, 297-303,(1973)
- 15 a.Boland E. D., Wnek G. E., Simpson D. G., Pawlowski K. J., Bowlin G. L., J. Macromol.Sci.,38, 1231-43.(2001)  
b.Bognitzki M, Hou H., Ishaque M.,et al. Adv Mater; 12: 637-40. (2000)  
c.Hartgerink, J. D., Beniash E., Stupp S. I., PNAS; 99, 5133-8. (2002)  
d.Matthews J. A., Wnek G. E., Simpson D. G., Bowlin G. L. Biomacromolecules; 43:4403-12. (2002)
- 16 D. B. Warheit, Materials today, 32-36 (2004)
- 17 P.H.M.Hoet, I. Bruske-Hohlfeld, O. Salata, J. of Nanobiotechnology,2:12, (2004)
- 18 A.M. Glauert, M.J. Thorley, Annu. Rev. Microbiol, 23, 159-198, (1969)
- 19 Microsoft Encarta Encyclopedia 2002
- 20 Balbaie V., Posogy N. editori, *Epidemiologie medicala, vol II*, Ed Medicală, București, (1985)
- 21 J. Riviera-Utrilla, I. Bautista-Toledo, M.A. Ferro-Garcia, C. Moreno-Castilla, Carbon, 41, 323-329 (2003)
- 22 H. Le Pape, F. Solano-Serena, P. Contini, C. Devillers, A. Maftah, P. Leprat, Carbon, 40, (2002), 2497-2954
- 23 M.A. Montez-Moran, D. Suarez, J.A. Menendez, E. Fuente, Carbon, 42, (2002),
- 24 Stamatina Luminita, Stamatina I., *Nanobiocomposites based on nanocarbon for cell culture media*, in Nanoengineered Nanofibrous Materials, Ed. Y. Gogotsi, S. Kacac, Kluwer, pp289-298 (2004)



- 
- 25 Goeringer S., Tacconi N.R., Chenthamarakshan C.R., Rajeshwar K., Wampler W.A., Carbon, 39, 512-522, (2001)
  - 26 F.Rodriguez-Reinoso, Carbon, 36, 159-175,(1998)
  - 27 Habe H., Omori T., Biosci, Biotechnol, Biochem., 67, 225-43, (2003)
  - 28 I. Alfheim, A. Lindskog, Sci. Total Environ, 15, 203-22 (1984)
  - 29 <http://nobelprize.org>
  - 30 Golubkov V, Ekimov A., Onushenko A., Tzehomskii V., Sov. Phys.and Chem.of glass, 6, 511, (1980 )
  - 31 Rosseti R., Nakahara S., Brus L., J.of Chem Phys, 79,1086, (1983)
  - 32 C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi,Annual Review of Materials Science, 30, 545-610, (2000)
  - 33 Åkerman Maria E., Warren C. W. Chan, Pirjo Laakkonen, Sangeeta N. Bhatia, Erkki Ruoslahti , PNAS, 99, 20-27 (2002)
  - 34 Zhang Q, et all, PNAS, 104, 17843-8.(2007)
  - 35 Christian Kirchner, Tim Liedl, Stefan Kudera, Nano Letters, 5, 2, 331-338, (2005)
  - 36 Austin M. Derfus, Warren C. W. Chan, et al Nano Letters,4, 1, 11-18 (2004)
  - 37 Florescu L. Gavrilă, Fleacă C., Voicu I., Morjan I., Stămatin L., Stămatin Ioan, Appl Surf Sci. 253,19, 7729-7732, (2007)
  - 38 Grabarek Gergely Anal. Biochem. 15;185,131-5 (1990)
  - 39 G.T Hermanson,. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York; pp226, (1996).
  - 40 Baoquan Sun, et al., Journal of Immunological Methods 249 85-89. (2001)
  - 41 Luminita Stămatin, *Cercetări asupra structurilor de biosenzori implicați în diagnosticarea și monitorizarea bolilor parazitare ale pielii*, Teză doctorat, 2006, coord T. Șesan



## 10 Nanotuburi de carbon

Nanotuburile de Carbon (CNT-carbon nanotubes) și microscopia de forțe atomice pot fi considerate promotorii nanotehnologiei. CNT-urile au entuziasmat lumea științifică prin proprietățile lor remarcabile electronice, mecanice și termice. Posibilitatea funcționalizării lor a deschis calea spre noi funcții specifice conexiunea spre nanobiotehnologie și a materialelor avansate, econanotehnologie. CNT-urile au un potențial ridicat pentru aplicațiile posibile în ramura energiei, a electronicii, IT-ului. Totuși, datorită insolubilității nanotuburilor în solvenți, chimici, biochimici și biologici, folosirea acestor materiale a fost mai degrabă limitată. CNT-urile solubile în apă și solvenți organici reprezintă un interes din moment ce pot deschide noi abordări în dezvoltarea de nanocompozite, nanosenzori, electronică moleculară.

### 10.1 Istoric

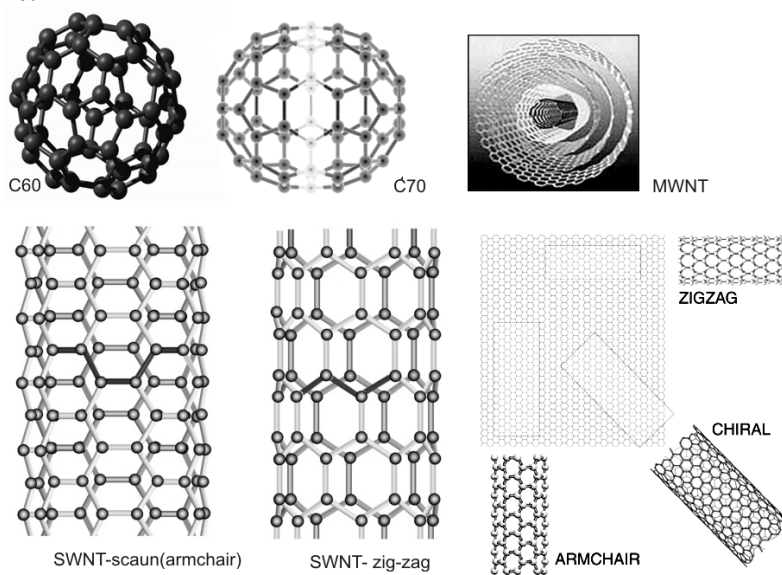
Descoperirea lor este legată de cea a fullerinelor, forme alotropice ale carbonului, molecule compuse din carbon în forma unor sfere, elipsoid sau de tuburi. Fullerenele sferice se numesc buckyball și acelea cilindrice se numesc buckytub sau simplu nanotuburi de carbon (CNT). Fiecare dintre ele poate fi considerat ca un mod de organizare spațială a grafenelor (planele bazale din grafit). Fullerenele au fost descoperite de în 1985 de Curl, Kroto și Smalley la Universitatea Sussex, UK și Rice University (Houston, Texas) iar denumirea lor provine de la arhitectul Richard Buckminster Fuller care a construit un dom cu acest tip de geometrie [1]. În 1996 cei trei chimiști primesc premiul Nobel pentru această descoperire. Această familie era diferită de cea a grafitului și diamantului, C<sub>60</sub> este o moleculă formată din 60 de atomi de carbon. Totul a început de fapt când experimentele lui Kroto au fost făcute cu ajutorul unui instrument realizat de Smalley ce studia clusterii moleculari. Kroto era interesat de tehnica lui Smalley, aceea a vaporizării laser, pentru a verifica o teorie despre existența lanțurilor lungi de carbon din spațiul interstellar. Kroto s-a gândit că stelele roșii gigante bogate în carbon produc forme complexe ale carbonului pe care radioastronomia putea să le detecteze. Acest grup de cercetare a încercat să identifice structura chimică a acestei noi familii folosind un spectrometru de masă. Smalley a alăturat mai multe poligoane lipindu-le cu o bandă izolatoare obținând structura perfect simetrică a C<sub>60</sub>. Această nouă moleculă de carbon (C<sub>60</sub>) a primit numele de “buckyball”. În timp ce grafitul conține atomi de carbon sub forma plane grafenice „suprapuse”, “buckyballs” sunt similare unor cuști sferice ce au legăturile carbon-carbon foarte puternice cu același tip de hibridizare ca în planele grafenice.

În 1991, au fost descoperite nanotuburi de carbon în funinginea depusă pe un catod de carbon a unui arc voltaic. Acestea au fost descoperite de Sumio Iijima în laboartoarele de cercetare fundamentală a firmei NEC din Tsukuba, Japonia. Micrografiile observate cu

un microscope electronic de înaltă rezoluție au arătat că nanotuburile de carbon multistrat (MWNT) ale lui Iijima erau înrudite cu fullerenele. Deși MWNT sunt înrudite cu fullerenele, ele nu sunt molecular perfecte [2]. În 1993, s-au descoperit simultan nanotuburile cu carbon unistrat (SWNT) de către Iijima și Toshinari Ichihashi de la NEC [3] și Donald S. Bethune et col [4] de la IBM Almaden Research Center din San Jose, California. Cele două grupuri au descris rolul de catalizator pentru fier, nichel sau cobalt, introduse în anodul arcului voltaic din reactorul de sinteză pentru nanotuburi și C60.

Rezultatul a fost o funingine pe pereții camerei iar microscopia de transmisie electronică (TEM) a pus în evidență că funinginea era alcătuită din mai multe SWNT ce aveau o distribuție variată a diametrelor. Funinginea nu conținea nici un MWNT. În prezent sunt dezvoltate o serie de metode de sinteză pentru fullerene (ablație laser) respectiv pentru nanotuburi ( ablație laser, CVD, CTR-chemical transport reaction) unde se folosesc descompunerile termice ale gazelor (metan, acetilenă, etilenă) în prezența catalizatorilor nanometrici din grupa fierului [5, 6, 7, 8].

Structurile tipice a celor trei tipuri de carbon C60, SWNT, MWNT sunt prezentate în figura 10.1



*Figura 10.1*-Fullerene C60 și C70, nanotuburi multipereți (MWNT), nanotuburi unipereți (SWNT) forma scaun (armchair) respectiv zigzag rezultați din roluirea și închiderea planelor grafenice pe cele două axe de simetrie. Formele chirale depind de axa de roluire. SWNT –zigzag au unele din legături C-C paralele cu generatoarea și au un caracter de semimetal iar SWNT –scaun are legături C-C perpendiculare pe generatoarea cilindrului cu comportare de semiconductor. Formele chirale au o axă de chiralitate similară cu ADN.

În tabela 10.1 sunt prezentate cele mai importante din realizările științifice cu nanotuburi de carbon

Tabela 10.1- Cronologia dezvoltării nanotuburilor

Anul	Evenimentul	Referințe
1993	Sinteza SWCNT	[3,4]
1997	SWCNT forma metalică	[9]
1998	Studii spectroscopice, corelații dintre structura atomică și electronică	[10, 11]
1998	FET cu SWCNT forma semiconductoare	[12]
1998	SWCNT solubili via modificări chimice	[13]
2000	Senzor chimic cu SWCNT individuali	[14]
2000	Spectru Raman pe SWCNT singular	[15]
2000	Transport balistic în SWCNT	[16, 17]
2001	Operații logice cu dispozitive pe bază de SWCNT	[18,19]
2001	Tranzistor cu SWCNT	[20]
2002	Separarea completă în soluție din mănunchiuri cu SWCNT	[21]
2004	Electroluminiscenta SWCNT	[22]
2004	Spectroscopia modurilor fononice cu rezoluție atomică	[23]

În prezent se cercetează descoperirea de noi forme ale carbonului, fizico-chimia fulleranelor, producerea de cantități industriale de CNT, metode de purificare, solubilizare, funcționalizare, separare după natura metalică sau semiconductoare, definirea cu exactitate a proprietăților.

Nanotuburile pot avea proprietăți metalice comparabile sau mai bune decât ale cuprului sau pot fi semiconductori, ca siliciul în tranzistori, totul depinzând de structura lor.

Pot conduce de asemenea căldura similar diamantului, și din moment ce este carbon, chimiștii pot crea legături între atomii de carbon a fulleranelor și nanotuburilor cu alți atomi sau molecule. Această “abilitate” de a lega sau atașa alte molecule sau atomi de nanotuburi sau/și buckyballs le fac să fie un nou nanomaterial ce se poate folosi în sistemele biologice sau să fie legate în materialele compozite.

Teoretic s-a calculat că din nanotuburi se vor face cele mai puternice fibre vreodată (aproximativ de 100 de ori mai puternice ca oțelul), cu doar 1/6 din greutatea lor. Se poate afirma că nanotuburile și buckyball-urile sunt cele mai interesante materiale descoperite în ultimele decade. De notat că din procesele de sinteză rezultă întotdeauna mănunchiuri de NT terminate cu jumătăți de fullerene.

## 10.2 Structură, proprietăți

### Structura geometrică

Structura geometrică din care provine un nanotub este rezultatul închiderii unui plan grafenic după o axă chirală definită de un vector chiral  $\vec{C}_h$  care este o combinație liniară a vectorilor celulei unitare a planului grafenic (figura 10.2):  $\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2 \equiv (n, m)$ , unde  $n$  și  $m$  sunt întregi ( $n \geq m$ ) [7]. Vectorul chiral poate fi privit ca vectorul ce conectează două puncte identice din cadrul planului grafenic definind direcția de roluire.

Unghiul chiral  $\theta$ , a nanotubului este definit ca unghiul dintre vectorul rețelei,  $\vec{a}_1$ , și vectorul chiral,  $\vec{C}_h$ , fiind dat de  $\theta = \arctan[\sqrt{3}m/(m + 2n)]$ . Numai tuburile zigzag și

armchair sunt caracterizate prin  $\vec{C}_h = (n, 0)$  respectiv  $\vec{C}_h = (n, n)$ . Ele au simetrie axială corespunzând grupului punctual de simetrie  $D_{nd}(n, \text{impar})$  sau  $D_{nh}(n, \text{par})$ . Toate celelalte nanotuburi  $(n, m)$  prezintă simetrie spirală și sunt chirale.

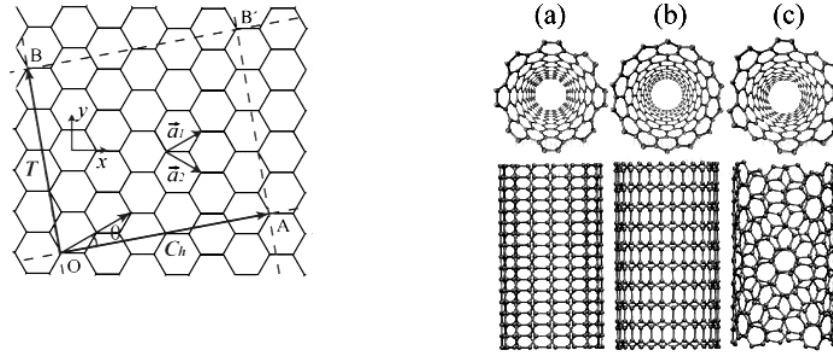


Figura 10.2- Construcția unui nanotub cu vectorul chiral  $\vec{C}_h = (4, 2)$  dintr-un plan grafenic. Vectorul de translație  $\vec{T} = (4, -5)$  este obținut prin prelungirea directă din punctul O normal pe  $\vec{C}_h$  pînă trece prin punctul identic de pe rețea. Vectorul de translație,  $\vec{T}$  și vectorul chiral,  $\vec{C}_h$  formează dreptunghiul OABB' care este celula unitară a tubului cilindric desfășurat. a) SWNT –armchair, b) zigzag, c) chiral

Datorită simetriei  $C_6$  a rețelei hexagonale unghiul  $\theta \leq 30^\circ$ . Atunci SWNT cu  $\theta = 30^\circ$  este cunoscut ca armchair (a, din figura 10.2) iar cel  $\theta = 0^\circ$  este cunoscut ca zigzag (b).

Pentru celelalte unghiuri ne vom referi la nanotuburi chirale (c, figura 10.2). Din teoria benzilor de energie, metoda electronilor strîns legați (tight binding, TB), formele metalice de SWNT se obțin pentru condiția ca  $(n-m)$  să fie un multiplu de 3 altfel este un semiconductor. Este interesant că pentru fiecare nanotub cu o chiralitate dată există doi enantiomeri.

Diametrul  $d_t$  a unui nanotub este legat de indicele de chiralitate prin ecuația:  $d_t = \frac{a}{\pi} \sqrt{(n^2 + nm + m^2)}$ , unde  $a$  este constanta rețelei hexagonale (a planului grafenic) fiind legată de lungimea legăturii  $a_{C-C} = 1.42 \text{ \AA}$ , prin  $a = \sqrt{3} a_{C-C} = 2.46 \text{ \AA}$ . Vectorii de translație pentru celula unitară a tubului sunt definiți de componentele lui  $\vec{T}$  adică:  $t_1 = \frac{2m+n}{d_R}$ ,  $t_2 = \frac{2n+m}{d_R}$  unde  $d_R$  este cel mai mare divizor comun dintre  $2n+m$  și  $2m+n$ .

Numărul de atomi per celula unitară a unui  $(n, m)$ -tub este dublul numărului de hexagoane (N) din ea:  $N = \frac{2(n^2 + nm + m^2)}{d_R}$ .

Din procesele de sinteză toate nanotuburile au capetele închise terminate cu hemisfere de fullerene. În cazul nanotubului  $(5, 5)$  și  $(9, 0)$  tuburile se închid cu hemisfere de  $C_{60}$ , în timp ce nanotuburile mai mari în diametre se închid după regula „pentagonului izolat”: un număr optim de hexagoane la fiecare pentagon din fullerenă. În general există șase pentagoane izolate pentru fiecare set de hexagoane în așa fel încît să se minimizeze deformările geometrice [24]

### Rute de sinteză

Diametrul mediu pentru SWCNT depinde de ruta de sinteză prin care este produs. În tabela 10.2 sunt prezentate cele mai curențe metode.

Tabela 10.2- Diametrele SWCNT funcție de metoda de sinteză

Metoda de sinteză	Diametrul mediu, nm (varianța, $\sigma$ )	Referințe
Evaporare laser pulsată (PLV)	$\sim 1.3 \pm 0.1$	[25,26]
Descărcare în arc electric	$\sim 1.4$	[27]
Metoda HiPCO, descompunere în fază gazoasă la presiune înaltă	$\sim 1.0 \pm 0.2$	[26, 28]
CVD- catalitic pe suport solid (CTR-CVD)	$\sim 1.0 \pm 0.1$	[29]
	$\sim 1.4 \pm 0.2$	[30]
	$\sim 0.8$	[31]

Cel mai subțire nanotub raportat în literatură a avut diametrul de aprox 0.3 nm cu toate că acestea pot fi observate în cadrul MWNT [32]. Aceste tuburi s-au atribuit la (2,2) –armchair conținând două jumătăți de  $C_{12}$  capete terminale. În toate metodele de sinteză nanotuburile se formează sub formă de mănunchiuri datorită tendinței lor pronunțate de aderență. Numărul de tuburi din mănunchi este variabil atingând ca ordin de mărime 100 per mănunchi. Împachetarea lor în mănunchi este trigonală iar energia de coeziune atinge 0.2-0.3 eV/Å [33 a,b]. Metodele CVD catalitice permit creșterea individuală de nanotuburi cu diametre controlate de diametrul și natura catalizatorului respectiv a substratului de creștere. De notat câteva din inconvenientele metodelor de sinteză: 1. Producerea de nanotuburi nu controlează chiralitatea; 2. Întotdeauna nanotuburile sunt închise la capete și necesită prelucrări și tratamente chimice pentru deschiderea lor.

### 10.3 Funcționalizare

În această secțiune se prezintă o scurtă sinteză referitoare la: purificare chimică și oxidativă; dizolvarea CNT în apă și în solvenți organici prin modificări chimice și fizice precum și a aplicațiilor lor din domeniul chimic și biologic; separarea SWNT metalice și a SWNT semiconductoare.

#### 10.3.1 Purificarea nanotuburilor

Toate metodele de purificare ale nanotuburilor se bazează pe unul sau mai mulți pași: oxidarea cu gaz sau cu vapori, oxidarea chimică, centrifugarea sau filtrarea (incluând metode cromatografice).

Oxidarea chimică are loc în acid nitric diluat (2.6 M) în reflux pentru a elimina carbonul amorf sau alte impurități, catalizatorii. Pentru cantități mici de material acidul poate fi îndepărtat prin filtrare sub vid urmat de spălarea cu o bază diluată (solubilizarea catalizatorilor prin trecerea în săruri și a carbonului amorf în acid carboxilic). Pentru

cantități mai mari de material (grame) se înlocuiește filtrarea cu decantarea și oxidarea chimică repetată, urmată de centrifugare și colectare de supernatant. Adăugarea de surfactanți în procesele intermediare de purificare este benefică, extracția lor fiind realizată în etapele finale prin spălare cu apă DI și metanol.

MWNT se purifică simplu prin oxidare în aer la temperatură înaltă ce nu poate fi aplicată la SWNT deoarece metalul catalizator poate iniția distrugerea lui. Etapele de oxidare pentru MWNT sunt: 200-230°C, oxidarea materialelor carbonice amorse (oxidare cu oxigen 20% umidificat și atmosferă de argon). În următoarea etapă este tratamentul cu HCl pentru eliminarea metalelor și a oxizilor metalici prin trecerea lor în săruri solubile.

După spălare și uscare ciclul se reia la temperaturi de 300°C respectiv 400°C.

### 10.3.2 Evaluarea purității CNT

Rezidurile de metal poate fi realizată prin analiza termogravimetrică (TGA). Prin arderea în aer a mostrei SWNT la 1000°C, se elimină materialul carbonic iar impuritățile prezente în mostra originală sunt transformate în oxizi. Puritatea materialului carbonic se estimează prin metode spectrometrice, TEM, SEM (caracterizare locală). Pentru a obține o măsurare standard a purității, este necesar să fie identificat caracteristica care să facă diferența dintre SWNT și alte forme de carbon care sunt adesea prezenți în mostrele SWNT. Această tehnică se bazează pe spectroscopia NIR a dispersiilor de SWNT fiind comparate cu probe standard de nanotuburi obținute în arc electric.

Figura 10.3 arată o ilustrație schematică a spectrului electronic al unei mostre tipice de SWNT produse în arc electric. Tranzițiile interbandă în SWNT încep la o energie foarte mică și sunt vizibile la aproximativ 3 eV. Absorbția  $\pi$ -plasmonică în SWNT și impuritățile carbonice se extinde peste toată regiunea spectrală cu benzi până la ~5 eV. Aceste absorbții domină spectrul și complică folosirea tranziției interbandă drept o măsurare absolută a purității SWNT. Caracteristicile interbenzii încep cu tranziții electronice de energie scăzută de la nivelul Fermi al SWNT metalice ( $M_{00}$ , ~0-0.5 eV). În timp aceasta s-a dovedit a fi o regiune doar informativă a spectrului. În orice caz, următoarele trei tranziții ale interbenzii ( $S_{11}$ ,  $S_{22}$  și  $M_{11}$ ) sunt accesibile spectrometrului NIR și sunt mesagere ale semnăturii SWNT.  $S_{22}$  (7750-11750  $\text{cm}^{-1}$ , ~1-1.5 eV), ce este aleasă ca semnătură a SWNT datorită faptului că  $S_{11}$  (~4000-8000  $\text{cm}^{-1}$ ) este extrem de sensibilă la impurități și dopanți. Intensitatea  $M_{11}$  (~12,500-17,500  $\text{cm}^{-1}$ ) este mai scăzută decât  $S_{22}$  din cauză că probele sunt compuse dintr-un sortiment de diametre și tipuri SWNT. Integrarea intensității peste întreaga întindere a spectrului de tranziție a interbenzii  $S_{22}$ , (AA) este folosită pentru estimări calitative. Două cantități prezintă interes pentru o mostră arbitrară X: suprafața absorbției tranziției interbenzii  $S_{22}$ , AA (S,X) și absorbția totală, AA (T,X); raportul lor arată o măsură a purității SWNT. Această metodă este utilă, în special pentru optimizarea proceselor de purificare.



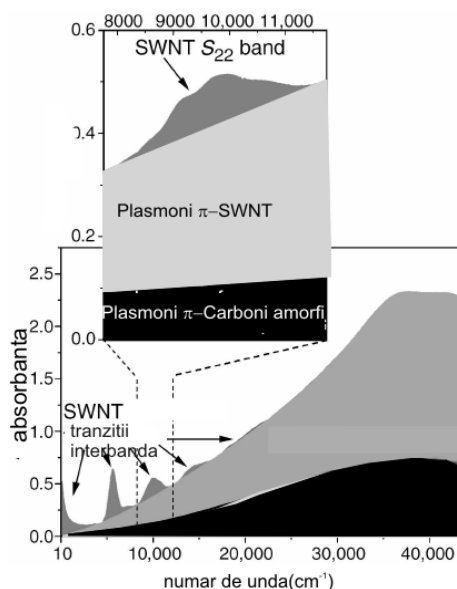


Figura 10.3-Ilustrare schematică a spectrului electronic a unui SWCNT obținut prin arc electric. Spectrul acoperă regiunile IR îndepărtat-UV (aprox 0.001-5.5 eV. Este detaliată o extensie a regiunii din tranziția interbandă S<sub>22</sub> (adaptare după [34])

Interacțiunea radiațiilor electromagnetice cu molecule și particule poate lua două forme, absorbția și împrăștierea. Nanotuburile de carbon sunt considerate în general că posedă caracteristicile ambelor așadar, împrăștierea este determinată de dimensiunile caracteristice a particulelor ( $d$ ) și de lungimea de undă a radiației incidente ( $\lambda$ )

Împrăștierea Rayleigh corespunde dispersiei luminii pe particule cu dimensiuni caracteristice  $< 1/10$  din lungimea de undă a radiației ( $d < 0.1\lambda$ ), și are o dependență foarte puternică de lungimea de undă ( $s(\lambda) \approx \lambda^{-4}$ ). Secțiunea eficace de absorbție este cea mai mare în momentul în care radiația electromagnetică este polarizată de-a lungul axei SWNT, și dacă se consideră că aceasta este componenta dominantă, atunci dimensiunea caracteristică a SWNT corespunde cu lungimea  $d$ . Pentru un SWNT cu lungimea de  $d=1 \mu\text{m}$ , este de așteptat ca radiația Rayleigh împrăștiată să fie importantă pentru  $l > 10$  micrometri, ce corespunde frecvențelor  $< 1000 \text{ cm}^{-1}$ . În aria spectrului a tranziției interbandă ( $\sim 10,000 \text{ cm}^{-1}$ ),  $d \approx \lambda$ , iar în această regiune împrăștierea Mie trebuie luată în considerație.

Împrăștierea Mie devine importantă în momentul în care dimensiunile caracteristice ale particulelor sunt mai mari decât lungimea de undă a luminii ( $d \geq \lambda$ ), și contribuie la nivelul liniei de bază, influențând măsurarea gradului de puritate a mostrei SWNT, în special în cazul mostrelor slab dispersate. Pentru a obține rezultate credibile în procedura de evaluare a purității este esențial să folosim mostre bine dispersate. Acest lucru poate fi făcut prin folosirea concentrației de SWNT  $< 0.01 \text{ mg/mL}$ , sonicate cu un solvent convenabil ales pînă cînd dispersia este omogenă vizual.

### **10.3.3 Selectarea nanotuburilor după lungime și diametru**

Sortarea SWNT după lungimea lor devine extrem de importantă pentru aplicații. De exemplu, nanotuburile cu lungimi scurte (ex: 20-250 nm) sunt ideale pentru nano și micro electronică sau de ordinul micronilor preferate pentru aplicații în materiale structurale și de compozite. Tehnici variate au fost folosite pentru a obține SWNT sortate în funcție de lungime. Aceasta este de obicei realizată prin tehnici cromatografice, electroforeză capilară și fracționare. Au fost folosiți surfactanți pentru a obține soluții de SWNT dispersate.

Separarea NT după diametru și a chiralityi se realizează prin metodele specifice de sinteză și nu prin procesare fizico chimică. Cele mai cunoscute metode sunt creșterile din structuri mezoporoase cu pori controlați. Tang et al.[35] au raportat decurând că SWNT cu diametru de 0.4 nm, cresc într-un singur cristal AlPO<sub>4</sub>-5 zeolit, atingând o chirality preferențială- care este, (5,0) de formă zigzag- opusă celorlalte două chirality posibile de diametru similar (3,3) armchair și (4,2) chirale. Controlul diametrului cavităților unidimensionale ale zeoliților mezoporoși ar putea conduce la materiale care să poată servi drept șabloane pentru creșterea selectivă de SWNT monodisperse. Tehnicile bazate pe CVD pe catalizatori suportați de zeoliți duc la creșteri selective în diametre. Combinând dezvoltările recente din separarea SWNT metalice și semiconductoare, împreună cu cercetările în curs pentru a produce nanotuburi cu o distribuție limitată după diametre se va atinge condițiile minimale de aplicații în nanoelectronică

#### **Tăierea și oxidarea CNT se poate realiza după următoarea metodă:**

La 2 mg SWNT se adaugă 1ml 3:1(V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și HNO<sub>3</sub> concentrat. Mixtura este sonicată 2,4,6,8,10, 12,14 ore funcție de lungimea ce surmărește a fi obținută. Temperatura de lucru se menține la 20<sup>0</sup>C prin răcire cu gheață. După sonicare se diluează cu 250 ml apă DI și se filtrează pe un filtru de PTFE de 40 micrometri. Spălare cu apă până la pH deasupra lui 5 urmat cu spălare în etanol și uscare în vid.[36]

Prin utilizare de același raport de acizi și concentrații dar cu tratament la 40-70<sup>0</sup>C pentru câteva ore cu sonicare se obțin CNT scurtate și cu grupări carboxilice atașate.

Acesta este cel mai simplu procedeu de a pregăti CNT în vederea funcționalizării și solubilizării [37,38]. Prin fierberea nanotuburilor într-un amestec de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> a rezultat o soluție limpede, incoloră care la evaporarea solventului și eliminarea excesului de acid, rezultă un solid alb ce conține nanotuburi funcționalizate. Neutralizarea soluției acide de către o bază rezultă un precipitat solid de culoare maro ce conține nanotuburi.

### **10.3.4 Separarea CNT după proprietățile lor metalice sau semiconductoare**

Separarea SWNT în fracțiuni metalice și semiconductoare ar trebui să simplifice și să permită extinderea de aplicații spre dispozitivele nanoelectronice (tranzistori și circuite logice), de emisie în câmp, nanosenzori, actuators, materiale pentru ecrane electromagnetice. Metodele de sinteză generează mixturi sub formă de mănunchiuri de SWNT metalice și semiconductoare într-un raport de 1:2, face separarea lor să fie dificilă. Prin explorarea interacțiunilor fizico-chimice complexe ale aminelor dintr-un surfactant (octadecilamine- ODA, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>NH<sub>2</sub>) cu nanotuburi de carbon conduce în etapele de

purificăre la separarea formelor metalice de cele semiconductoare. Interacțiunile slabe donor-acceptor dintre grupul de amine al ODA și SWNT semiconductoare par să acționeze împreună ca un zwitterion SWNT-COO-/NH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>. Spre deosebire de zwitterion care sunt ținuti împreună într-un solvent cu constantă dielectrică mică, complexele donor-acceptor surfactant-amină-nanotub sunt stabilizate prin grupul alifatic al ODA spre suprafața grafenei a SWNT. Studii spectroscopice și termogravimetrice recente indică faptul că aceste amine interacționează mai puternic cu SWNT semiconductoare decât cu cele metalice. Acest fapt reduce tendința SWNT semiconductor să se aglomereze în timp ce concentrația este crescută prin evaporarea parțială a solventului, lăsând precipitatul să fie populat în mare parte de nanotuburi metalice. Prin spectrometrie Raman analiza modurilor de vibrație RBM (radial breathing modes) se pune în evidență că în supernatant sunt SWNT semiconductoare, iar în fracția precipitată este bogată cu SWNT metalice. Spectrometria Raman de rezonanță arată că un factor de îmbogățire de ~90% în SWNT semiconductoare se poate atinge în supernatant. Separări cu o eficiență mai înaltă (97% și chiar mai mult) au fost observate pentru SWNT cu diametre de 1 nm.

Un alt experiment asupra separării SWNT metalice/semiconductoare: suspensie apoasă a SWNT în surfactant de Triton X-100 și brominare, urmată de o centrifugare la 24000 g pentru 12 ore. În acest caz supernatantul conține nanotuburi semiconductoare iar sedimentele nanotuburi metalice. De notat că separarea se bazează pe faptul ca nanotuburile individuale în suspensie cu surfactantul apos rămân „suspendate” pe parcursul centrifugării la factori g mari. Explicația pentru acest rezultat constă în formarea de structuri micelare surfactant-nanotub ce exclud apa spre capetele hidrofobe.

Doă efecte sunt concurente la separare: (1) bromul formează un transfer complex de sarcină cu nanotuburile metalice și (2) stabilizarea surfactantului Triton X-100 este slabă pentru nanotuburi metalice (ex., surfactantul are o toleranță limitată a puterii ionice, care, odată depășită, își pierde activitatea). Aceste efecte sugerează că separarea se datorează unei destabilizări a suspensiei cu nanotuburi metalice- surfactant, rezultând din afinitatea lor selectivă pentru brom. A fost arătat că un lanț de ADN (ss-ADN) se leagă puternic de SWNT prin rearanjare- $\pi$  și astfel produce exfolierea și solubilizarea SWNT în apă prin desfacerea din mănunchiuri. Mai mult de atât, grupările de fosfat aduc unui hibrid ADN-SWNT o densitate de sarcină negativă pe suprafața nanotubului de carbon, distribuție care ar trebui să fie o funcție de secvența ADN. Bazată pe aceasta, complexul ADN/SWNT metalic este predispus să aibă o suprafață mai mică de înărcare decât complexul ADN/SWNT semiconductor. O separare dielectroforetica a SWNT metalice de SWNT semiconductoare a fost de asemenea raportată. SWNT solubilizate cu dodecil sulfat de sodiu (SSD) în D<sub>2</sub>O în concentrații de 10mg/L au fost supuse la dielectroforeză la o frecvență de 10MHz, și un câmp de aproximativ  $2 \times 10^3$  V/cm. Datorită diferențelor dintre constantele dielectrice relative ale formei metalice versus semiconductoare cu privire la solvent, nanotuburile metalice au fost atașate către zona microelectrodului, lăsând nanotuburile semiconductoare în solvent. Spectroscopia raman de rezonanță a estimat un factor de îmbogățire de 80% al fracțiunii SWNT metalice depozitate. Lucrări mai recente indică faptul că SWNT metalice suferă transferuri preferențiale de electroni cu sări de

diazoniu în soluții apoase, față de SWNT semiconductoare. Această aparentă selectivitate pare să fie indusă de mobilitatea mare a electronilor (pentru SWNT metalice) din zona nivelului Fermi. (O discuție de detaliu asupra modalităților de separare și selectare a după tipul de nanotub se găsește în seria MRS-Bulletin aprilie 2004)

### 10.3.5 Atașarea de grupe funcționale

Acidul azotic concentrat și amestecuri de  $H_2SO_4$  cu  $HNO_3$ ,  $H_2O_2$  sau  $KMnO_4$  au fost folosite pentru a funcționaliza atașând grupări acidice la nanotuburi. Prima dată, se atașează grupe acidice la capetele deschise ale SWNT-ului (figura 10.4). Principalele funcțiuni acidice cuprinde grupările  $-COOH$ ,  $-C=O$  și  $-OH$  și sunt în proporție de 4:2:1.

Concentrația la suprafață a grupărilor acidice din nanotuburile tratate cu diferiți oxidanți variază între  $2 \times 10^{20}$  până la  $10 \times 10^{20}$  situri/g sau echivalent în rapoarte molare 5.5% - 7.7% ( $-COOH$ ), ~6% ( $-C=O$ ), ~5% ( $-OH$ ) pentru SWNT-urile scurte sau ~4% pentru SWNT-urile lungi. Metoda simplă de titrare acido-bazică arată ca trei probe diferite de SWNT purificat au cam 1-3% situsuri acidice și 1-2% au grupe funcționale  $-COOH$ . Concentrația grupelor funcționale este dependentă de timp.

Tratarea SWNT-urilor cu  $H_2SO_4$  concentrat ce conține persulfat de amoniu,  $(NH_4)_4S_2O_7$  și pentaoxid de fosfor, urmat de tratare cu acid sulfuric și permanganat de potasiu va rezulta un material ce conține C/O/H în proporție atomică de 2.7:1.0:1.2.

Ozonoliza nanotuburile crează centrii reactivi ce pot fi folosiți în alte reacții de atașare de funcțiuni acidice sau bazice.

SWNT-urile funcționalizate, purificate și scurtate pot fi dispersate în apă prin sonicare ce prezintă o stabilitate rezonabilă (aproximativ 1 lună). Solubilitatea și stabilitatea soluției este dependentă de pH

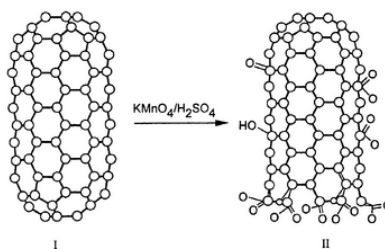


Figura 10.4- Tratarea CNT-urilor cu soluții de permanganat de potasiu și acid sulfuric scurtează nanotuburile și induce formarea de grupări funcționale pe suprafața lor

Grupările carboxilice de la extremitățile SWNT-urilor pot reacționa chimic în soluții organice formând inele sau compuși ce pot fi utilizați în procese de atașare pentru biomolecule. Cel mai important aspect pentru funcționalizarea ionică sau covalentă este posibilitatea exploatarea grupărilor carboxilice de la capetele tubului sau a pereților.

Aminele sunt reactivi care au atras cea mai mare atenție. Sunt trei tipuri de reacții a aminelor cu grupările carboxilice: amidarea; interacția acid-bază; condensarea. De altfel, aminele pot fi adsorbite fizic în pereții nanotuburilor. În acest sens există o literatură bogată asupra proceselor de solubilizare, funcționalizare, amidare ce poate fi consultată pentru o reacție specifică [39].

## 10.4 Referințe

1. Kroto H. W, Heath J. R., O'Brien S. C., Curl R. F and. Smalley R. E. *C60 Buckminsterfullerene*. Nature 318: 162 - 163(1985)
2. Iijima, Sumio. *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature 354: 56 - 58(1991)
- 3 Iijama, Sumio *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*, Nature 363: 603 – 605 (1993).
4. Bethune, D. S.; et al. *Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls*. Nature 363: 605–607. (17 June 1993).
- 5 a.Guo, Ting. *Self-Assembly of Tubular Fullerenes*, J. Phys. Chem. **99**: 10694 – 10697 (1995)  
b.Guo, Ting *Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization*, Chem. Phys. Lett. **243**: 49 – 54 (1995).  
c.Flahaut, E.; Bacsá R, Peigney A, Laurent C. *Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes*. Chemical Communications **12**: 1442 – 1443 (2003).
- 6 M. I. Ionescu , I. Stamatín F. Nastase C. Nastase C. Serban, *High-quality carbon nanotubes production using plasma-chemistry deposition method*, Molecular Crystals and Liquid Crystals, vol 415, 133-140, (2004)
- 7 a.Saito R G Dresselhaus & M S Dresselhaus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, CRC press, ISBN 978-1-86094-093-4, (1998)  
b.M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, and P.Avoorís, eds., *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, (2001).
- 8 Stamatín I., Matei C., Buliga E., *The closing of the Carbon structures sheets in fullerenes C60* Rom. Rep. Phys., 48, N78, p599, (1996)
- 9 Tans S.J., M.H. Devoret, Dai H.J., Thess A., Smalley R.E., Geerligs L.J., Dekker C., Nature 386 474–477. (1997)
- 10 J.W.G. Wildoer, L.C. Venema, A.G. Rinzler, R.E. Smalley, C. Dekker, Nature 391 59–62. (1998)
- 11 Odom T.W., Huang J.L., Kim P., Lieber C.M., Nature 391 62–64. (1998)
- 12 Tans S.J., Verschueren A.R.M., Dekker C., Nature 393 49–52 (1998)
- 13 Chen J., Hamon M.A., Hu H., Chen Y.S., Rao A.M., Eklund P.C., Haddon R.C., Science 282 95–98, (1998)
- 14 Kong J., Franklin N.R., Zhou C.W., Chapline M.G., Peng S., Cho K.J., H.J. Dai, Science 287 622–625. (2000)
- 15 Duesberg G.S., Blau W.J., Byrne H.J., Muster J., Burghard M., Roth S., Chem. Phys. Lett. 310 8–14. (1999)
- 16 Krstić V., Roth S., Burghard M., Phys. Rev. B 62 R16353–R16355. (2000)
- 17 Kong J., E Yenilmez., Tomblér T.W., Kim W., Dai H.J., Laughlin R.B., Liu L., Jayanthi C.S., Wu S.Y., Phys. Rev. Lett. 87 Art. no. 106801. (2001)

- 
- 18 Derycke V, Martel R., Appenzeller J., Avouris P., Nano Lett. 1 453–456. (2001)
- 19 Bachtold A., Hadley P., Nakanishi T., Dekker C., Science 294 1317–1320. (2001)
- 20 Postma H.W.C., Teepe T., Yao Z., Grifoni M., Dekker C., Science 293 76–79. (2001)
- 21 M.J. O’Connell, et al. Science 297 593–596. (2002)
- 22 M. Freitag, V. Perebeinos, J. Chen, A. Stein, J.C. Tsang, J.A. Misewich, R. Martel, P. Avouris, Nano Lett. 4 1063 -1066. (2004)
- 23 Vitali L., Burghard M., Schneider M.A., Liu L., Wu S.Y., Jayanthi C.S., Kern K., Phys. Rev. Lett. 93, Art. no.136103. (2004)
- 24 Harris P.J.F., *Carbon Nanotubes and Related Structures*, Cambridge Univ. Press, (1999).
- 25 Kukovecz A., Pichler T., Pfeiffer R., Kramberger C., Kuzmany H., Phys. Chem. Chem. Phys. 5 582–587. (2003)
- 26 Hulman M., Plank W., H. Kuzmany, Phys. Rev. B 6308, Art. no. 081406(2001)
- 27 Journet C., Maser W.K., Bernier P., Loiseau A., De la Chapelle M.L., Lefrant S., P. Deniard, R. Lee, J.E. Fischer, Nature 388 756–758. (1997)
- 28 A. Kukovecz, C. Kramberger, V. Georgakilas, M. Prato, H. Kuzmany, Eur. Phys. J. B 28 223–230. (2002)
- 29 An L., Owens J.M., McNeil L.E., Liu J., J. Am. Chem. Soc. 124 13688–13689,(2002)
- 30 Choi H.C., Kim W., Wang D.W., Dai H.J. J. Phys. Chem. B 106 12361–12365,(2002)
- 31 Bachilo S.M., et all, J. Am. Chem. Soc. 125,11186– 11187 (2003)
- 32 Zhao X., et all, Phys. Rev. Lett. 92 Art. no. 125502. (2004)
- 33 a. Monthieux M., et all, Carbon 39 1251–1272. (2001)
- b. Girifalco L.A., Hodak M.,Lee R.S., Phys. Rev. B 62, 13104–13110. (2000)
- 34 Itkis M.E., et all NanoLett. 2 ,p. 155. (2002)
- 35 Tang Y.H., Lee C.S., Lee S.T., Appl. Phys. Lett. 73, 3902-3904 (1998)
- 36 Marshall Matthew W., Popa-Nita Simina, Shapter Joseph G.,Carbon 44 1137–1141, (2006)
- 37 Hamon M. A., et all, *Appl. Phys. A* 74, 333 (2002).
- 38 .a Sun Y.P., Fu K., Lin Y. Huang W., *Acc. Chem. Res.* 35, 1096 (2002);
- b. Niyogi S.,et all, *Acc. Chem. Res.* 35, 1105 (2002);
- c. Hirsch A., *Angew. Chem.Int. Ed.* 41, 1853 (2002);
- d. Banerjee S, Kahn C, Wong S., *Chem.Eur. J.* 9, 1898 (2003);
- e. Tasis D., Tagmatarchis N., Georgakilas V. Prato M.,*Chem. Eur. J.* 9, 4000 (2003);
- 39 Naotoshi Nakashima, Int.J. of Nanoscience vol. 4, no. 1 119–137, (2005)





## 11 Nanofire, nanosenzori

Detecția speciilor chimice și biologice constituie placa turnantă din multe arii din sănătate și științele vieții acoperind diagnoza bolilor, descoperirea de noi medicamente sau de noi droguri. Dezvoltarea de noi dispozitive senzoriale pentru analize rapide a acestor specii la limita de sub picomoli va avea un impact asupra societății în multiple moduri. Dispozitive ultrasensibile dezvoltate pe nanofire va crea o nouă clasă de nanosenzori capabili să detecteze proteine, ADN, molecule specifice designului de noi medicamente. Cheia centrală în recunoașterea moleculară este transducția semnalului asociată cu recunoașterea selectivă a speciilor de interes. Nanostructuri cum sunt nanofirele [1-7] și nanocristale [8-12] oferă posibilitatea unică de a construi dispozitive nanometrice de senzare. Diametrele lor sunt comparabile cu dimensiunile speciilor biologice și chimice, prin urmare, intuitiv, reprezintă un promițător mijloc de transducție de semnal și interfațare cu instrumentele macroscopice. Nanofirele anorganice și nanocristalele prezintă proprietăți electrice [2-5, 13-28] și optice [8-12] unice ce pot fi exploatate pentru senzare.

Dependența de dimensiunea nanocristalelor a proprietăților de emisie și a culorii deschide mari oportunități de etichetare respectiv marcare și detecție optică a speciilor biologice prin comparație cu coloranții și markerii chimici fluorescenți utilizați curent [8-12]. Proprietățile de comutație electronică a nanofirelor semiconductoare furnizează modalitatea de senzare și indexare electrică cu citire directă. Aceasta devine extrem de atractiv pentru multiple aplicații [29-37]. Semnalele electrice de la un asemenea tip de nanodispozitiv pot fi direct rutate spre exterior iar acesta pot fi direct integrat în sisteme miniaturizate. Detecția de semnale electrice direct de la speciile moleculare reduce timpul de indexare cu markeri chimici. În paragrafele următoare se vor prezenta câteva din aplicațiile dispozitivelor pe bază de nanofire care se pare vor revoluționa, prin proprietățile lor remarcabile, detecția în biologie și medicină.

### 11.1 Senzori FET cu nanofire

Principiile de construcție ale FET-urilor prezentate în capitolul 6 se transpun direct în conceperea de senzori pe bază de nanofire, NFET. Într-un FET standard, (figura 6.1) siliciul dopat, p-Si, este conectat la sursă și drenă prin două contacte metalice prin care trece un curent electric sub un potențial dat. Conductanța semiconductorului este modificată de al treilea electrod (poarta) cuplat capacitiv printr-un strat dielectric. În cazul p-Si dacă se aplică pe poartă un potențial pozitiv are loc o diminuare a sarcinilor iar conductanța se reduce. Invers dacă se aplică un potențial negativ atunci are loc o acumulare de sarcini și conductanța crește. Dependența conductanței de tensiunea aplicată pe poartă face din FET un candidat firesc pentru senzarea pe bază electrică deoarece câmpul electric va depinde de speciile de sarcini electrice ce se pot atașa pe nanofir.

Există o multitudine de tipuri de nanofire crescute pe substratul de siliciu. Utilizând diferite metode de evaporare termică, procese de depunere chimică din vapori (CVD) sau construcții pe șabloane cu fascicule moleculare. Unul din cele mai studiate exemple este nanofirul de Si ce poate fi preparat ca o structură cristalină singulară cu diametre de 2-3nm [1-4,42,43]. Ambele tipuri de Si dopat p sau n (n-Si) prezintă performanțele și caracteristicile comparabile cu cele atinse de industria electronică în privința stabilității și reproductibilității [24]. Caracteristicile electronice ale nanofirelor de Si sunt controlate cu precizie în timpul procesului de creștere ceea ce este un avantaj raportat la nanotuburile de carbon. Nanofirele de Si prezintă caracteristici de comutație de înaltă performanță ceea ce este un factor decisiv care afectează sensibilitatea. Nanofirele de Si au depășit inconvenientele de limitare a sensibilității pentru tranzistorii FET obținuți prin tehnologia planară (vezi capitolul 6). FET urile cu nanofire de Si sunt structuri unidimensionale ce facilitează atașarea pe suprafață de specii de biomolecule și markeri de recunoaștere moleculară. Acumularea sau săracirea de sarcini are loc în „volumul” nanostructurii față de dispozitivul planar care conducea la modificarea regiunii superficiale [29]. În acest context sensibilitatea de a detecta o singură moleculă ar putea deveni posibilă. În figura 11.1 este prezentat metoda de trecere de la FET construit pe o structură planară de Si la un NFET unde nanofirele de Si sunt conectate între sursă și drenă. Cele două tipuri de NFET prezintă fiecare avantaje și dezavantaje. Structura din figura 11.1b permite atașarea directă de grupe funcționale sau molecule. Tipul (c) deși are caracteristici superioare nu permite o atașare directă, în particular grupele funcționale sunt în contact cu electrodul de Au al porții. În figura 11.2 este prezentat principiul de construcție a unui NFET ce are nanofirul de Si (SiNW) funcționalizat și expus direct la o soluție ce conține analitul. Răspunsul este măsurat prin variația conductanței cu timpul.

Atașarea de molecule receptoare (figura 11.2b) se realizează direct pe stratul oxidic al nanofirului nefiind necesar alte modificări chimice. Când dispozitivul este expus direct cu suprafața la o soluție ce conține macromolecule cum ar fi proteine ce au o sarcină pozitivă netă atunci legarea va conduce la descreșterea în conductanță pentru un nanofir din Si dopat p. În figura 11.3 este descris principiul de funcționare a unui pH-NFET și răspunsul în conductanță. Pentru grupările naturale de silanol, Si-OH, (figura 11.3-1) răspunsul în conductanță este continuu crescător funcție de echilibrul protonare/ deprotonare care schimbă starea suprafeței prin cumularea sau săracirea de sarcină.

Prin funcționalizarea cu grupări amino (de exemplu 3-aminopropiltriethoxisilan) modificarea de sarcină se realizează în trepte funcție de valoarea pH ului iar răspunsul în timp este definit cu mare precizie. De notat că grupările amino și silanol funcționează ca receptori pentru reacțiile de protonare-deprotonare care schimbă starea de sarcină a suprafeței nanofirului.

Rezultatele și observațiile anterioare confirmă pe deplin astăzi realizările cu nanofire de Si [29-46].

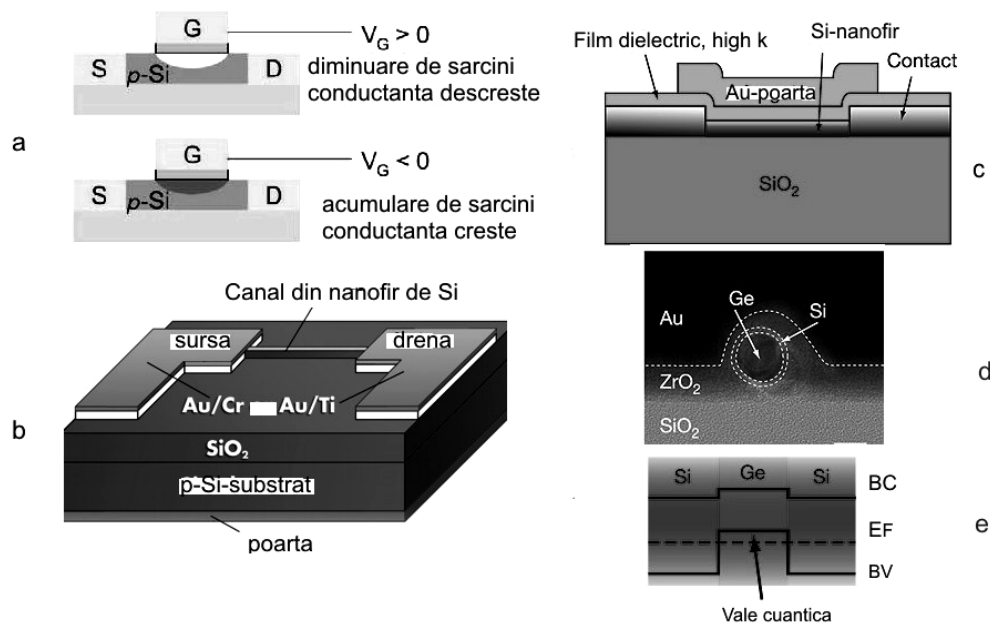


Figura 11.1-Trecerea FET de la tehnologia planară (a) unde potențialul de pe poarta G modulează sarcina superficială dintre sursă și drenă , respectiv conductanța la tehnologia pe nanofire (b,c). În (b) este descris formarea unui nanofir de Si prin corodare în plasmă sau creștere pe structura Si-SiO<sub>2</sub> între contactele sursă-drenă. În (c) este descrisă conectarea unui nanofir de Si construit pe un șablon de Ge iar poarta este un electrod de Au deșus pe un film dielectric cu permitivitate înaltă. Acest tip de structură este proiectat pe un strat complex de poartă format din 2 oxizi SiO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub>- dielectric high k. Nanofirul Ge-Si formează o structură de benzi de tipul vale cuantică (e) , BV-banda de valență, BC-banda de conducție, E<sub>F</sub> – nivelul Fermi.

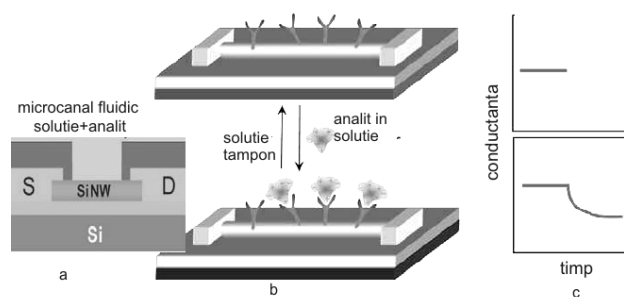


Figura 11.2- Principiul de construcție a unui NFET (a) pe structura din figura 11.1b. Fluidul cu analit este condus spre nanofirul de Si (SiNW) printr-un microcanal. Atașarea de grupe funcționale (b) conduce la modificarea acumulărilor de sarcină și în consecință conductanța se modifică în timp (c).

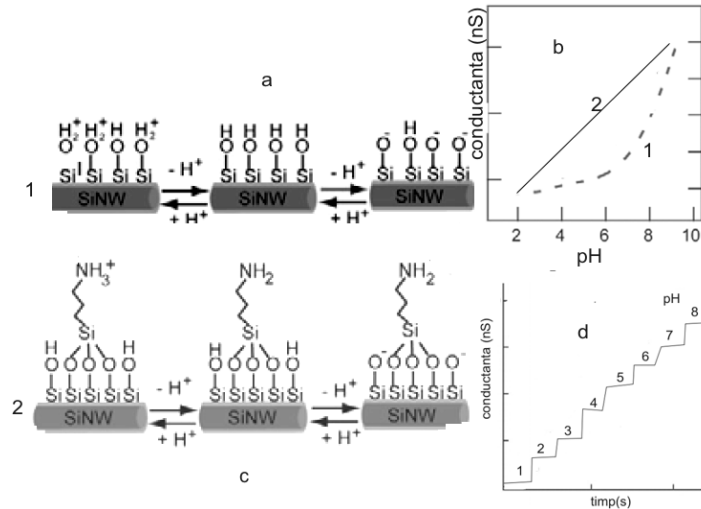


Figura 11.3-Schemă de realizare a unui NFET funcționalizat cu grupe silanol (a) respectiv amino (b) pentru măsurarea de pH. Răspunsul ipotetic în conductanță pentru silanol(1) respectiv amino (2), graficul (d) corespunde răspunsului în timp la diferite valori de pH.

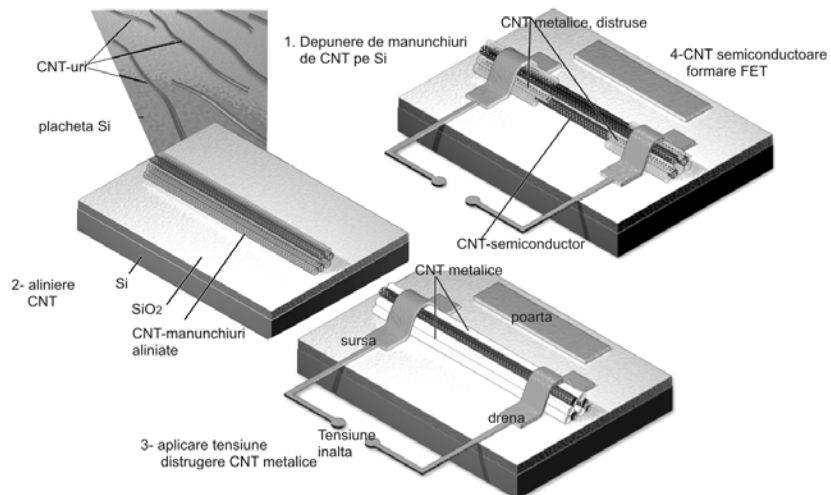


Figura 11.4- Formarea de NFET din mănunchiuri de nanotuburi prin evaporarea celor metalice și selectarea SWNT semiconductoare

În cazul nanotuburilor de carbon trebuie abordată o altă metodă. Proprietatea lor de conducție unidimensională respectiv dificultatea de a selecta formele metalice de cele semiconductoare impune o metodă oarecum diferită. În figura 11.4 este prezentată o metodă de formare a unui FET din mănunchiuri de SWCNT unde formele metalice sunt evaporate prin aplicarea unei tensiuni înalte între sursă și drenă. În etapa a doua nanotuburile

sunt funcționalizate cu grupări carboxilice sau amidice prin procedeele schițate în secțiunea 10 pe care se pot atașa receptorii. Figura 11.4 arată că SWNT pot fi folosite ca simple nanofire prin care se poate senza un semnal electric prin simplă atașare de molecule sau prin aplicarea unui potențial pe poartă se transformă într-un FET.

Fie că este un nanofir de Si sau SWCNT senzarea de macromolecule biologice cum ar fi proteine sau acizi nucleici care în soluții apoase sunt încărcate electric se poate realiza prin atașarea la suprafața lor de receptori convenabili aleși. Primul exemplu de cuplul de detecție a proteinelor este molecula de biotin care are o selectivitate mare la streptavidin. Când o soluție de streptavidin este în contact cu nanofirul funcționalizat cu biotin interacția lor modifică conductanța. Același procedeu se aplică și la indexarea ADN ului prin atașarea de secvențe complementare pe nanofir [33-48]. Extinderea de atașări de diferiți receptori și crearea de arii cu anticorpi se pot genera platforme de detecție de viruși, droguri.[49-67].

## 11.2 Limitele de detecție și răspuns pentru nanobiosenzori

Din paragraful anterior s-a constatat efortul cercetărilor de a construi nanosenzori ultrasenzitivi pentru detecția moleculelor biochimice, virusuri droguri, ADN, la concentrații mici de analit și în flux rapid. Structurile angajate în designul lor sunt planare (FET) fire cilindrice sau nanosfere. Din considerente electrostatice este cunoscut că structurile cilindrice sunt mai sensibile la adsorbția de sarcini (adică ADN, proteine, etc) în raport cu cele planare de tipul ISFET sau CHEMFET. Din punct de vedere electrostatic ISFET este o structură 1D, firele sunt 2D iar sferele 3D. Răspunsul unui nanosenzor din partea de detecție este mai mult cinetic, când este imersat în soluție el măsoară timpul de captură a unui anumit număr de analiți (timpul de atingere a valorii maxime,  $t_s$ ). Altfel interpretat, dacă există pe nanosenzor  $N_s$  receptori per unitate de arie atunci  $t_s$  este timpul de saturație pentru o reacție analit-receptor dată. Acest timp este deasemeni dependent de dimensionalitatea senzorului. Intuitiv se poate constata că  $t_{s,2D} \leq t_{s,1D}$  pentru o concentrație dată de analit,  $\rho_0$ . Se pune întrebarea care sunt limitele de detecție pentru un timp rezonabil de răspuns. Aceasta se poate estima din considerente de cinetică respectiv de difuzie a analitului.

Se consideră un senzor izolat imersat într-un electrolit cu analit staționar la  $t=0$ .

Suprafața senzorului este funcționalizată cu receptori pentru moleculele țintă. Vi-teza de conjugare dintre analiți și receptori este descrisă de:

$$\frac{dN}{dt} = k_F(N_0 - N)\rho_S - k_R N \quad 11.1$$

unde  $N$  este densitatea de receptori conjugați,  $N_0$  este densitatea de receptori de pe suprafața senzorului,  $k_F$ ,  $k_R$ , constantele de captură și de disociere,  $\rho_S$ , concentrația de analiți la suprafața senzorului care se determină prin combinare cu ecuația de difuzie:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \Delta \rho \quad 11.2$$

cu  $D$  coeficientul de difuzie a analitului din soluție. Fluxul de molecule de analit spre suprafața senzorului de arie  $A_D$ :

$$I = \int_{A_d} D \nabla_n \rho ds \quad 11.3$$

unde I este fluxul incident de analit pe o arie  $A_D$ . Răspunsul în timp este dat prin rezolvarea ecuațiilor 11.1 și 2 unde este necesar cunoașterea ratelor de captură respectiv de detașare a analitului la receptori. Luînd în considerare dinamica capturii de biomolecule dezvoltate în [65] cu raportul ratelor de regulă  $k_F/k_R \sim 10^5$  [66] și pentru concentrații de  $N_0 \sim 10^4 / m^2$ . [67] ecuația cineticii 11.1 se reduce la:

$$\frac{dN}{dt} \cong k_F N_0 \rho_S \quad 11.4$$

iar fluxul în condiții staționare:

$$I = j A_D = C_{D,SS} (\rho_0 - \rho_S) \quad 11.5$$

unde densitatea fluxului de analit,  $C_{D,SS}$  este capacitanța de difuzie echivalentă pentru cazul cînd concentrația  $\rho_0$  a analitului rămîne constantă la o distanță W de suprafața senzorului (tabela 11.1). Cum fluxul de analit trebuie să fie echilibrat de viteza de atașare analit-receptor avem condiția  $j = dN/dt$ . Rezolvînd ecuațiile 11.4-5 se obține:

$$N(t) = \rho_0 t \left( \frac{A_D}{C_{D,SS}} + \frac{1}{k_F N_0} \right)^{-1} \quad 11.6$$

ecuație ce arată o dependență liniară a concentrației analitului cu timpul și prin urmare un răspuns liniar al senzorului în condiții staționare.

Cu aceste relații se poate estima răspunsul tranzient al unui nanosenzor prin perturbarea stării staționare după cum urmează: cu cît reacția de atașare a analitului progresează concentrația sa se diminuează în apropierea suprafeței senzorului datorită capturii; distanța de sărăcire este  $W(t) = \sqrt{2nDT}$  unde  $n$  este dimensionalitatea senzorului (tabela 11.1). Se poate defini un coeficient de difuzie echivalent cu capacitanța,  $C_D(t)$  ca funcție de  $W(t)$  și inserîndu-l direct în 11.6 se obține:

$$N(t) = \rho_0 t \left( \frac{A_D}{C_D(t)} + \frac{1}{k_F N_0} \right)^{-1} \quad 11.7$$

care pentru  $k_F \rightarrow \infty$  și cu notațiile din tabela 11.1 conduce la timpul de saturație  $t_s$  de a captura  $N_s$  de molecule. Pentru fiecare tip de nanosenzor se obține o relație de scalare unică:

$$\rho_0 t_s^{M_D} \sim k_D \quad 11.8$$

unde  $M_D$  și  $k_D$  sunt constante dependente de dimensionalitatea senzorului (tabela 11.1)

Relațiile de mai sus conduc imediat la un număr de concluzii importante pentru estimarea concentrației minime detectabile pentru un senzor planar, cilindric respectiv sferic, o problemă tipică a detecției de ADN. Să presupunem că timpul maxim de saturație este de 100s iar  $N_s = 10 \mu m^{-2}$  ce corespunde la două conjugări per 1 micron lungime, 30nm diametru de nanofir. Considerînd coeficienții de difuzie pentru biomolecule D de ordinul  $10^{-10} m^2/s$  se poate reprezenta un grafic simplu pentru cele trei tipuri de senzori (figura 11.5).

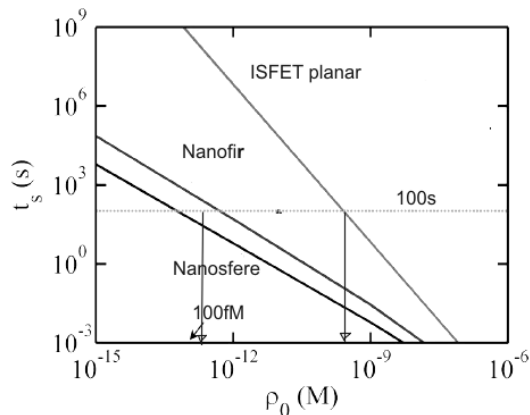


Figura 11.5-Estimarea concentrației limită ( $\rho_0$ ) de detecție pentru un timp prestabilit de saturare ( $t_s$ ). Pentru un timp de detecție prestabilit la 100s structurile cilindrice (nanofirele) respectiv sferice pot detecta concentrații de ordinul pmol în timp ce ISFET ca structură planară are limita de detecție de ordinul nanomolar.

Tabela 11. 1- Geometrii 1D, 2D și 3D de nanosenzori și caracteristicile lor pentru regim staționar de detecție a analiților

Tip de senzor	model	W	$A_D$	$C_{D,SS}$	$C_D(t)$	$M_D$	$k_D$
ISFET planar 1D		$W = (2Dt)^{1/2}$	1	$\frac{D}{W}$	$\frac{D}{\sqrt{2Dt}}$	1/2	$N_S \sqrt{\frac{2}{D}}$
Nano-senzor cilindric 2D		$W = (4Dt)^{1/2}$	$2\pi a_0$	$\frac{2\pi D}{\log \frac{W + a_0}{a_0}}$	$\frac{2\pi D}{\log \frac{\sqrt{4Dt} + a_0}{a_0}}$	1	$\frac{N_S a_0}{D}$
Nano-senzor sferic 3D		$W = (6Dt)^{1/2}$	$4\pi a_0^2$	$\frac{4\pi D}{a_0^{-1} - (W + a_0)^{-1}}$	$\frac{4\pi D}{a_0^{-1} - (\sqrt{6Dt} + a_0)^{-1}}$	1	$\frac{N_S a_0}{D}$

$a_0$ -raza senzorului; distanța W a analitului de concentrație constantă raportată la suprafața senzorului

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu o serie de referințe și articole de sinteză

□

### 11.3 Referințe

1. Morales, A. M., and Lieber, C. M., *Science* 279, 208(1998)
2. Hu, J., et al., *Acc. Chem. Res.* 32 (5), 435(1999)
3. Lieber, C. M., *MRS Bull.* 28 (7), 486(2003)
4. Cui, Y., et al., In: *Nanowires and Nanobelts – Materials, Properties and Devices*, Wang, Z. L., (ed.), Kluwer Academic Publishers (2003), 3
5. Samuelson, L., *Materials Today* 6 (10), 22 (2003)
6. Xia, Y., et al., *Adv. Mater.* 15 (5), 353 (2003)
7. Wang, Z. L., *Materials Today* 7 (6), 26 (2004)
8. Niemeyer, C. M., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 40 (22), 4128 (2001)
9. Chan, W. C. W., et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (1), 40 (2002)
10. West, J. L., and Halas, N. J., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 285 (2003)
11. Alivisatos, P., *Nat. Biotechnol.* 22, 47 (2004)
12. Gould, P., *Materials Today* 7 (2), 36 (2004)
13. Cui, Y., et al., *J. Phys. Chem. B* 104 (22), 5213 (2000)
14. Duan, Y., et al., *Nature* 409, 66 (2001)
15. Cui, Y., and Lieber, C. M., *Science* 291, 851 (2001)
16. Huang, Y., et al., *Science* 294, 1313 (2001)
17. Gudiksen, M. S., et al., *Nature* 415, 617 (2002)
18. Huang, Y., et al., *Nano Lett.* 2 (2), 101 (2002)
19. Lauhon, L. J., et al., *Nature* 420, 57 (2002)
20. Cui, Y., et al., *Nano Lett*3 (2), 149. (2003)
21. McAlpine, M. C., et al., *Nano Lett*3 (11), 1531.(2003)
22. Zhong, Z., et al., *Science* 302, 1377 (2003)
23. Panev, N., et al., *Appl. Phys. Lett.* 83 (11), 2238 (2003)
24. Jin, S., et al., *Nano Lett.* 4 (5), 915 (2004)
25. Greytak, A. B., et al., *Appl. Phys. Lett.* 84 (21), 4176 (2004)
26. Wu, Y., et al., *Nature* 430, 61 (2004)
27. Zheng, G., et al., *Adv. Mater.* 16 (21), 1890 (2004)
28. Bjork, M. T., et al., *Nano Lett.* 4 (9), 1621 (2004)
29. Cui, Y., et al., *Science* 293, 1289 (2001)
30. Comini, E., et al., *Appl. Phys. Lett.* 81 (10), 1869 (2002)
31. Zhou, H. T., et al., *Chem. Phys. Lett.* 369 (1-2), 220 (2003)
32. Li, C., et al., *Appl. Phys. Lett.* 82 (10), 1613 (2003)
33. Hahm, J., and Lieber, C. M., *Nano Lett.* 4 (1), 51 (2004)
34. Wang, W., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3208 (2005)
35. Patolsky, F., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14017 (2004)
36. Kolmakov, A. and Moskovits, M., *Annu. Rev. Mater. Res.* 34, 151 (2004)
37. Wan, Q., et al., *Appl. Phys. Lett.* 84 (18), 3654 (2004)
38. Sze, S. M., *Physics of Semiconductor Devices*, Wiley, New York), 431(1981)



39. Bergveld, P., IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-19, 342 (1972)
40. Blackburn, G. F., In: Biosensors: Fundamentals and Applications, Turner, A. P. F., et al. (eds.), Oxford University Press, (1987),
41. Hafeman, D. G., et al., Science 240, 1182 (1988)
42. Cui, Y., et al., Appl. Phys. Lett. 78 (15), 2214 (2001)
43. Wu, Y., et al., Nano Lett. 4 (3), 433 (2004)
44. Iler, R. K., The chemistry of silica, John Wiley & Sons, New York (1979)
45. Bartlett, P. N., In: Handbook of Chemical and Biological Sensors, Taylor, R. F., Schultz, J. S. (eds.), IOP Publishing, Philadelphia 139 (1996),
46. Bolt, G. H., J. Phys.Chem. 61 (9), 1166 (1957)
47. Bayer, E. A., and Wilchek, M., Methods Enzymol. 184, 49 (1990)
48. Nielsen, P. E., et al., Science 254, 1497 (1991)
49. Jensen, K. K., et al., Biochem. 36 (16), 5072 (1997)
50. He, L., et al., J. Am. Chem. Soc. 122 (38), 9071 (2000)
51. Hook, F., et al., Langmuir 17 (26), 8305 (2001)
52. Grosios, K., Traxler, P., Drugs Future 28, 679 (2003)
53. Strausberg, R. L., Schreiber, S. L., Science 300, 294 (2003)
54. Stockwell, B. R., Trends Biotechnol. 18 (11), 449 (2000)
55. Becker, J., Nat. Biotechnol. 22, 15 (2004)
56. Blume-Jensen, P., and Hunter, T., Nature 411, 355 (2001)
57. Stadler, K., et al., Nat. Rev. Microbiol. 1, 209 (2003)
58. Atlas, R. M., Nat. Rev. Microbiol. 1, 70 (2003)
59. Niiler, E., Nat. Biotechnol. 20, 21(2002)
60. Weiss, S., Nat. Struct. Biol 7, 72. (2000)4
61. Zhuang, X., Rief, M., Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (1), 88 (2003)
62. Huang, Y., et al., Science 291, 630 (2001)
63. Whang, D., et al., Nano Lett3 (9), 1255 (2003)
64. Whang, D., et al., Jpn. J. Appl. Phys. 43 (7B), 4465(2004)
65. Berg H. C., *Random Walks in Biology* Princeton University Press,NJ,(1993).
66. Lohse J., Dahl O. Nielsen P. E, Proc. Natl. Acad. Sci (PNAS). 96,11804 (1999)
- 67.Fritz J, E. B. Cooper, Gaudet S., Sorger P. K, Manalis S. R., PNAS.. 99, 14142 (2002).
- 68.Gruner G.,Anal Bioanal Chem 384: 322–335 (2006)