

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών Τομέας Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη και μελέτη εκλεκτικών ηλεκτροδίων με ακινητοποιημένα αγώγιμα πολυμερή ως ενζυμικά συνυποστρώματα

Καραφουλίδη-Ρέτσου Χαρά

Επιβλέπων: Αντώνης Καραντώνης, Επικ. Καθηγητής

Σεπτέμβριος 2018

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-18 στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας. Σκοπός της εργασίας ήταν εύρεση υλικών τα οποία όχι μόνο να αποτελούν ενζυμικά συνυποστρώματα, αλλά συγχρόνως να μπορούν να πολυμεριστούν ηλεκτροχημικά και να δημιουργήσουν ένα εκλεκτικό ηλεκτρόδιο. Τα αποτελέσματα δεν ήταν από την αρχή ενθαρρυντικά και πολλές φορές κρίθηκε απαραίτητο να υπάρξουν τροποποιήσεις και αναπροσαρμογές στην πειραματική διαδικασία. Στα πλαίσια της πορείας μου αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Αντώνη Καραντώνη για τις ελευθερίες, την εμπιστοσύνη και το χρόνο που μου έδωσε, ούτως ώστε να εμβαθύνω στο θέμα, να αποκτήσω άνεση με την πειραματική διαδικασία και εμπιστοσύνη στην κρίση μου. Από την άλλη η βοήθειά του ήταν καίρια και άμεση όποτε αυτό κρινόταν απαραίτητο. Ευχαριστώ επίσης το Δημήτρη Ζουράρη, καθώς με βοήθησε στο να προσαρμοστώ στο εργαστήριο και ήταν πάντα πρόθυμος να απαντήσει σε ερωτήσεις μου. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Γιάννη Αντωνόπουλο και το Γιώργο Στέφα για τη βοήθειά τους και τη στήριξή τους. Συνολικά ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και τον καθηγητή μου, καθώς όλοι μαζί δημιουργούν ένα πολύ ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ επιπλέον το φίλο μου και συμφοιτητή μου Δημήτρη Παπαδημητρίου, για την παρέα τη στήριξή του και τη μετάδοση προς εμένα μιας θετικής και αισιόδοξης ματιάς για κάθε πρόβλημα μικρό ή μεγαλύτερο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου, Μαρίνα Σοφρά που ήταν το πρώτο άτομο που γνώρισα στη σχολή, όπως και τη φίλη μου Έλενα Κρικιγιάννη που γνωριστήκαμε λίγο αργότερα και αποτέλεσαν σταθερές αξίες όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης ευχαριστώ πολύ τις φίλες μου Παναγιώτα Κολώνη και Γαβριέλα Μαργαρίτη για τη στήριξή τους και την κατανόηση τους όχι μόνο αυτά τα πέντε χρόνια, αλλά και άλλα δέκα, πριν από αυτά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδελφό μου και τους γονείς μου για την συμπαράστασή τους, τη βοήθειά τους σε κάθε σημαντική και κρίσιμη απόφαση για εμένα και την εμπιστοσύνη που δείχνουν στις ικανότητες μου, από την οποία αντλώ πάντα κουράγιο.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ηλεκτροδίων με ακινητοποιημένα αγώγιμα πολυμερή, με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως ενζυμικά συνυποστρώματα. Συγκεκριμένα, τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτά της ανιλίνης και του κυανού του μεθυλενίου. Ως ένζυμο χρησιμοποιήθηκε η υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας, (horseradish peroxidase, HRP). Η ανιλίνη πολυμερίστηκε σε ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt), ενώ το κυανό του μεθυλενίου, σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα. Για την ηλεκτροχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις τεχνικές, η κυκλική βολταμετρία, βολταμετρία.

Η ανιλίνη πολυμερίστηκε με κυκλική βολταμετρία σε δυναμικά από 0 έως 1200mV ή από -100 έως 1100mV ως προς Ag/AgCl (3.5M KCl) για να διαπιστωθεί, αν η υπεροξείδωση μπορεί να επηρεάζει το φιλμ του πολυμερούς. Πράγματι, ένα μεγάλο μέρος των ηλεκτροδίων που πολυμερίστηκαν με το πρώτο ζεύγος δυναμικών δεν έδωσαν κατάλυση.

Για την ανιλίνη το ένζυμο αρχικά τοποθετήθηκε ελεύθερο στο διάλυμα και μετά επιχειρήθηκε να ακινητοποιηθεί με δύο τρόπους. Δοκιμάστηκε να ακινητοποιηθεί ηλεκτροχημικά με πόλωση και με τη χρήση Nafion. Με τον πρώτο τρόπο επιχειρείται να εισέλθει στους πόρους του πολυμερούς, ενώ με το δεύτερο ακινητοποιείται επιφανειακά.

Στην περίπτωση που το ένζυμο ήταν ελεύθερο στο διάλυμα, το σύστημα μελετήθηκε με τις μεθόδους της κυκλικής και γραμμικής βολταμετρίας. Η εξάρτηση της απόκρισης του ρεύματος από τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου είναι ορατή, ωστόσο δεν είναι γραμμική. Επίσης η μέγιστη συγκέντρωση που μπορεί να προστεθεί και να μην είναι επιβλαβής είναι τα 200μΜ υποστρώματος.

Στην περίπτωση που το ένζυμο ήταν ακινητοποιημένο ηλεκτροχημικά δοκιμάστηκε η μέθοδος της χρονοαμπερομετρίας, καθώς η μέθοδος της κυκλικής βολταμετρίας δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επίσης δοκιμάστηκαν διαφορετικά δυναμικά πόλωσης και διαπιστώθηκε ότι το εφαρμοζόμενο δυναμικό δεν είναι ένας παράγοντας που επιδρά σημαντικά, αρκεί να συμβαίνει η αναγωγή του πολυμερούς. Η μέγιστη συγκέντρωση υποστρώματος που μπορεί να προστεθεί χωρίς να είναι επιβλαβής για το ένζυμο είναι περίπου 300μΜ.

Στην περίπτωση της ακινητοποίησης με Nafion, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρονοαμπερομετρίας και της γραμμικής βολταμετρίας με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας να δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά δυναμικά πόλωσης και επιφάνειες με διαφορετικά εμβαδά. Για μεγαλύτερες επιφάνειες τα ρεύματα ήταν πιο ενισχυμένα, ωστόσο δεν είχαν κάποια επιπλέον επίδραση στο σύστημα, ενώ το δυναμικό πόλωσης δεν ήταν μία σημαντική παράμετρος, εφόσον συμβαίνει η αναγωγή του πολυμερούς. Σημειώνεται ωστόσο ότι για δυναμικά θετικότερα των -100mV, η κατάλυση δεν είναι ορατή σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις. Ιδανικά, το δυναμικό πόλωσης πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ -200 και -300mV σε κάθε περίπτωση. Η μέγιστη συγκέντρωση υποστρώματος που μπορεί να προστεθεί στο διάλυμα είναι 1mM.

Όταν το ένζυμο ήταν ακινητοποιημένο παρατηρήθηκε γραμμική απόκριση μεταξύ της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου και του ρεύματος, εν αντιθέσει με την περίπτωση που ήταν ελεύθερο, που η εξάρτηση υπήρχε, αλλά δεν ήταν γραμμική. Επίσης όταν το ένζυμο είναι ελεύθερο στο διάλυμα η αντοχή σε υπεροξείδιο ήταν μικρότερη. Τη μεγαλύτερη αντοχή σε

υπεροξείδιο είχε το ηλεκτρόδιο με ένζυμο ακινητοποιημένο με Nafion, καθώς το Nafion λειτουργεί ως μεμβράνη που μπορεί να ελέγχει το ρυθμό διάχυσης υποστρώματος.

Το κυανό του μεθυλενίου πολυμερίστηκε με επιβολή δυναμικού από -400 έως 1200 mV με ταχύτητα σάρωσης 50mV/s. Ο πολυμερισμός είναι πολύ αργός, το στρώμα που δημιουργείται είναι ιδιαιτέρως λεπτό και τα χωρητικά ρεύματα του ηλεκτροδίου είναι μικρά. Για τον έλεγχο της κατάλυσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γραμμικής βολταμετρίας. Το ένζυμο τοποθετείται ελεύθερο στο διάλυμα και η μέγιστη συγκέντρωση υπεροξειδίου που προστίθεται είναι 400μΜ. Μετά τον πολυμερισμό πρέπει να λαμβάνεται το αποτύπωμα του ηλεκτροδίου με κυκλική βολταμετρία και να επιβεβαιώνεται ότι το πολυμερές έχει ακινητοποιηθεί γιατί όπως διαπιστώθηκε το υπεροξείδιο μπορεί να αναχθεί στην επιφάνεια του υαλώδους άνθρακα. Επίσης το πολυμερές του κυανού μεθυλενίου αντιδρά με το ένζυμο και χωρίς την προσθήκη υπεροξειδίου. Η συγκεκριμένη υπεροξειδάση περιέχει το μόριο της αίμης στο ενεργό της κέντρο και το πολυμερές του κυανού του μεθυλενίου μπορεί να αντιδράσει με αυτό, όπως φαίνεται και από την ιατρική του χρήση για τον προσδιορισμό της αιμογλοβίνης στο αίμα, μέσω της οξειδοαναγωγής του ζέυγους Fe(II)/Fe(III).

Στην περίπτωση του πολυμερισμένου με ανιλίνη ηλεκτροδίου, παρατηρήθηκε το ιδιαίτερο φαινόμενο των ηλεκτροχημικών ταλαντώσεων. Η εμφάνισή τους αποδίδεται συγχρόνως στο πολυμερές, το υπεροξείδιο και το ένζυμο. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε όταν το ένζυμο ήταν ελεύθερο στο διάλυμα. Στην περίπτωση που προέκυψαν ταλαντώσεις με ηλεκτροχημικά ακινητοποιημένο ένζυμο, οι ταλαντώσεις προέκυψαν μετά από προσθήκη 300μL υπεροξειδίου στα -100mV πρώτη φορά και για μεγάλο εύρος δυναμικών. Για δυναμικά πιο αρνητικά των -100mV, η περίοδος είναι T=2s. Στα -180 mV, η περίοδος είναι ίση με 20s. Για δυναμικά από -14, έως 128mV, η περίοδος των ταλαντώσεων είναι T=1s. Για πόλωση στα 200mV ή θετικότερα, η περίοδος είναι T=0.5s.

Στην ακινητοποίηση με Nafion οι ταλαντώσεις εμφανίστηκαν μετά από 300μL υπεροξειδίου. Εμφανίζονται για πιο αρνητικά δυναμικά, στα -500mV, ενώ έχει προηγηθεί πόλωση στα 1300mV. Η εμφάνιση των ταλαντώσεων μετά από την απότομη μεταβολή δυναμικού προϊδεάζει ότι πρόκειται για μία συνθήκη αστάθειας για το σύστημα, το οποίο οδηγείται σε ευστάθεια ταλαντούμενο.

Abstract

In this diploma thesis the development of electrodes with immobilized conductive polymers was studied in order to be used as enzymatic cosubstrates. In particular the polymers that were used were aniline and methylene blue. Horseradish peroxidase (HRP) was used as enzyme. The aniline was polymerized on a platinum electrode (Pt), while the methylene blue on a glassy carbon electrode. For the electrochemical study three techniques were used: cyclic voltammetry, linear voltametry and chronoamperometry.

The aniline was polymerized with cyclic voltammetry on voltages ranging from 0 to 1200mV and -100 to 1100mV vs Ag/AgCl (3.5M KCl) in order to determine if hyperoxidization can affect the film. Actually a big proportion of the electrodes that were polymerized with the first voltage range did not produce catalysis.

For the aniline, the enzyme was initially inserted free in the solution and then immobilization was attempted using two ways: electrochemically with polarization and by using Nafion. With the first way it is attempted to enter the polymer pores while with the second way it is immobilized on the surface.

In the case where the enzyme is free in the solution the system was studied using cyclic and linear voltammetry. The dependence of the electric response on the concentration of the peroxidase is visible, although not linear. Moreover the maximum concentration that can be added and not negatively interfere is 200μ M.

In the case where the enzyme is electrochemically immobilized the chronoamperomentry method was tested because cyclic voltammetry gave no significant result. Also different polarization voltages were used and it was determined that it is not a significant factor. The maximum concentration that can be added without being detrimental to the enzyme is 300μ M.

In the case of Nafion immobilization two methods were used, linear voltammetry and chronoamperometry, with the second one giving better results. Different polarization voltages and surface sizes were used. For larger surfaces the electric signals were more amplified although they had no additional effect on the system, while the polarization voltage proved to be an insignificant parameter, if the reduction of polyaniline film has already happened. It is important to note that for voltages lower than -100mV the catalysis is not visible for either case. Ideally the polarization voltage should be between -200 and -300mV in any case. The maximum concentration that can be added to the solution is 1mM.

In general when the enzyme was immobilized, linear response was observed between the concentration of the peroxide and the current, in contrast with the case where the enzyme is free where the correlation was not linear and the peroxide tolerance was lower. The enzyme that was immobilized using Nafion has the greatest tolerance of all since Nafion acts like a membrane that can control the diffusion rate of the substrate.

The methylene blue was polymerized using a voltage range of -400 to 1200mV with a scan rate of 50mV/s. The polymerization is very slow, the layer that is created is especially thin and the capacity currents of the electrode are small. For the catalysis control, cyclic voltammetry was used. The enzyme is freely added to the solution and the maximum concentration of peroxide added, is 400 μ M. After the polymerization the fingerprint of the electrode must be taken using cyclic voltammetry and confirm that the polymer is immobilized because glassy carbon reacts with the peroxide as was noted. Also the methylene blue polymer reacts with

the enzyme without the addition peroxide as well. This particular peroxidase includes the heme molecule at its active center and the methylene blue polymer is used medically for the determination of hemoglobin in blood by redox of the Fe(II)/Fe(III) pair.

In the case of aniline electrode polymerization the interesting phenomenon of electric oscillations was observed. Their appearance can be attributed to polymer, peroxide and enzyme, at the same time. This phenomenon was not observed when the enzyme was free in the solution. In the case of an electrochemically immobilized enzyme the oscillations occurred after adding 300μ L of peroxide at -100mV for the first time and for a wide range of voltages. For voltages more negative than -100mV the period is T=2s. At -180mV it is 20s. For the range of -14 to 128mV it was 1s. For a polarization at 200mV of more positive it is T=0.5s.

When immobilized with Nafion the oscillations appeared after 300μ L of peroxide were added. They appear for more negative voltages at -500mV while previously polarization at 1300mV has happened. The appearance of oscillations after a sudden voltage change gives the idea that it is an instability factor for the system which is heading to a steady state while oscillating.

Περιεχόμενα

Πρόλογος - Ευχαριστίεςii
Κεφάλαιο 11
Εισαγωγή1
Υπεροξειδάσες1
Κατηγοριοποίηση υπεροξειδασών φυτικής προέλευσης2
Κλάση Ι2
Καταλάσες Περοξειδάσες2
Υπεροξειδάσες ασκορβικού (ΑΡx) και κυτόχρωμα C2
Κλάση ΙΙ2
Κλάση ΙΙΙ: Υπεροξειδάσες που εκκρίνονται από φυτά2
Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών3
Οξειδοαναγωγικά είδη κατά την κατάλυση4
Compound 05
Compound Ι: Ρίζα Πορφυρίνης5
Compound II6
Compound III6
Βιοαισθητήρες6
Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων7
Γενιές βιοαισθητήρων8
Μέθοδοι ακινητοποίησης9
Αγώγιμα Πολυμερή9
Βιοαισθητήρας υπεροξειδίου10
Κεφάλαιο 211
Η πολυανιλίνη ως διαμεσολαβητής (mediator)11
Ιδιότητες, χρήσεις και σύνθεση πολυανιλίνης11
Συμμετοχή της ΡΑΝΙ στον βιοκαταλυτικό κύκλο19
Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ελεύθερο στο διάλυμα21
Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ακινητοποιημένο κατόπιν ηλεκτροχημικής διεργασίας28
Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια με Nafion32
Κεφάλαιο 342
Το κυανό του μεθυλενίου ως διαμεσολαβητής (mediator)42
Ιδιότητες, χρήσεις και σύνθεση42
Συμμετοχή του ΜΒ στον ηλεκτρολυτικό κύκλο46
Βιοηλεκτροκατάλυση με τροποποιημένο ηλεκτρόδιο κυανού του μεθυλενίου47

Επίδραση πάχους ηλεκτροπολυμερισμού στην απόκριση σε H_2O_2	51
Επίδραση των ορίων δυναμικού του ηλεκτροπολυμερισμού στην απόκριση σε H_2O_2	52
Έλεγχος απόκρισης τροποποιημένου ηλεκτροδίου απουσία ενζύμου	54
Έλεγχος μη τροποποιημένου GC ηλεκτροδίου απουσία H_2O_2	55
Έλεγχος μη τροποποιημένου GC ηλεκτροδίου απουσία ενζύμου	55
Έλεγχος τροποποιημένου ηλεκτροδίου απουσία H2O2	56
Έλεγχος ύπαρξης χωρητικών ρευμάτων	57
Κεφάλαιο 4	58
Ηλεκτροχημικές Ταλαντώσεις	58
Εξωτερική Αντίσταση	59
Παθητικοποίηση	59
Πόλωση συγκέντρωσης	59
Ταλαντώσεις ως στοιχείο αυτοοργάνωσης σε ζώντα συστήματα	60
Χαρακτηριστικά των βιοχημικών ταλαντωτών	61
Ενδείξεις ταλαντώσεων	61
Ταλαντώσεις για ηλεκτρόδιο με ηλεκτροχημικά σταθεροποιημένο ένζυμο	61
Ταλαντώσεις για ηλεκτρόδιο με ένζυμο σταθεροποιημένο με Nafion	71
Κεφάλαιο 5	73
Σχολιασμός Αποτελεσμάτων	73
Πρόταση για τη βελτίωση της πειραματικής διαδικασίας	76
Συμπεράσματα	77
Βιβλιογραφία	78

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες απαντώνται ευρέως στη φύση σε όλες τις μορφές ζωής. Καταλύουν την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων, που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων ταυτόχρονα (συνυποστρώματα) με την αποσύνθεση του H₂O₂. Μία κατηγοριοποίησή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με κριτήριο την παρουσία ή απουσία αίμης στο μόριό τους. Ακολούθως αυτές οι οποίες περιέχουν μόριο αίμης στο ενεργό τους κέντρο χωρίζονται σε δύο υπεροικογένειες τις κυκλοοξυγενάσες και τις καταλάσες. Η δεύτερη κατηγορία χωρίζεται σε τρεις κλάσεις. Οι μη ζωικές φυτικές υπεροξειδάσες της Κλάσης ΙΙΙ, εμπλέκονται σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες ανάπτυξης των φυτών. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψιν την ικανότητα των υπεροξειδασών να καταλύουν την οξειδοαναγωγική αντίδραση για ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, θεωρούνται ως ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα από την άποψη των ποικίλων φαρμακευτικών, βιοχημικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες με βάση την υπεροξειδάση, βρίσκουν εφαρμογή σε αναλυτικά συστήματα όπως για παράδειγμα για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, της γλυκόζης, των αλκοολών και άλλων [1].



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της κατηγοριοποίησης των υπεροξειδασών [1]

Κατηγοριοποίηση υπεροξειδασών φυτικής προέλευσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι μη ζωικής προέλευσης υπεροξειδάσες μπορούν να κατανεμηθούν σε τρεις κλάσεις οι οποίες επεξηγούνται εν συντομία στη συνέχεια.

Κλάση Ι

Καταλάσες Περοξειδάσες

Οι καταλάσες-υπεροξειδάσες λειτουργούν κυρίως ως καταλάσες και η λειτουργικότητά τους ως υπεροξειδάσες είναι υπό συζήτηση. Τα KatG γονίδια αποκαλύπτουν μία ιδιότυπη δομή. Σε αλληλουχία KatG γονιδίων υπάρχει μία αλληλεπικαλυπτόμενη αλληλουχία γονιδίων με διαφορετική λειτουργία για κάθε ένα. Αυτή η δομή γονιδίου είναι μοναδική όχι μόνο στην στην υπεροικογένεια των υπεροξειδασών καταλασών, αλλά μεταξύ όλων των οικογενειών υπεροξειδασών αίμης.

Υπεροξειδάσες ασκορβικού (ΑΡχ) και κυτόχρωμα C

Οι υπεροξειδάσες αυτές διαχωρίζονται πολύ νωρίς φυλογενετικά από τα katG γονίδια, αλλά οι λεπτομέρειες αυτού του γεγονότος και η διαδικασία της γονιδιακής ειδοπλασίας ως προς το διαφορετικό υπόστρωμα δεν είναι σαφείς.

Κλάση ΙΙ

Οι φυλογενετικές σχέσεις των υπεροξειδασών της Κλάσης ΙΙ έχουν αποκρυπτογραφηθεί. Οι εξωκυτταρικές αιμοπεροξειδάσες της κατηγορίας ΙΙ, είναι γνωστές στο βασίλειο των μηκύτων και συμμετέχουν με διάφορους μηχανισμούς στην υποβάθμιση της λιγνίνης. Υπάρχουν τρεις εξελικτικές ομάδες που εκκρίνονται από βασιδιομύκητες λευκής σήψης: υπεροξειδάσες (VP).

Κλάση ΙΙΙ: Υπεροξειδάσες που εκκρίνονται από φυτά

Οι υπεροξειδάσες αίμης, της κλάσης ΙΙΙ είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνονται από φυτά και εμπλέκονται σε ποικίλες διεργασίες του κυττάρου όπως είναι η επιμήκυνση του κυττάρου, η κατασκευή κυτταρικού τοιχώματος και η διαφοροποίηση του κυττάρου. Κωδικοποιούνται από μεγάλο αριθμό γονιδίων, αλλά κυρίως από γονιδιώματα των αγγειόσπερμων φυτών.

Οι υπεροξειδάσες της κλάσης ΙΙΙ, χωρίζονται σε οκτώ διακριτές ομάδες, μεγάλη ποικιλία αυτών βρίσκεται στο ρύζι, καθώς περιέχει από την ομάδα Ι έως ΙV. Ο πιο γνωστός εκπρόσωπος των υπεροξειδασών της κατηγορίας ΙΙΙ, είναι η υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας (Armoracia Rusticana), HRP. Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί υπεροξειδάσες της Κλάσης ΙΙΙ έχει εντοπιστεί σε πράσινα άλγη και άλλα τέσερα γονίδια σε κόκκινα άλγη. Επομένως ο ισχυρισμός ότι τα γονίδια που εκφράζουν τα ένζυμα της κλάσης ΙΙΙ, εμφανίστηκαν με της χλωρίδα του εδάφους, θα πρέπει να αναδιατυπωθεί. Επίσης μία περίπλοκη υψηλού επιπέδου ανάλυση της εξελικτικής πορείας των γονιδίων και από τις τρεις κλάσεις τοποθετεί τρία άγνωστα γονίδια υπεροξειδάσης από το μυκητικό φυτοπαθογόνο M.grisea, στην απαρχή της αλυσίδας εξέλιξης της κλάσης ΙΙΙ. Επιπλέον γονίδια υπεροξειδάσης από μονοκύτταρους ευκαρυώτες χρειάζεται να συμπεριληφθούν για να καθορίσουν την εξελικτική αλυσίδα της κλάσης ΙΙΙ με μεγαλύτερη ακρίβεια. [2]

Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών

Τα ένζυμα τα οποία καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες το οξυγόνο δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: Αυτά που καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος με μεταφορά ηλεκτρονίων στον δέκτη (οξειδάσες, υπεροξειδάσες) και αυτά που καταλύουν την οξείδωση με ενσωμάτωση του οξυγόνου στο μόριο (μονοξυγενάσες και δυοξυγενάσες).

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό Ε_ο, διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ικανότητα της υπεροξειδάσης να καταλύει οξειδωτικές αντιδράσεις. Εντούτοις, δεν είναι ο μόνος παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ενεργότητα. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ο προσανατολισμός του υποστρώματος και η τοπογραφία του ενεργού κέντρου.

Το ζεύγος Fe(III)/Fe(II), έχει σταθερό οξειδοαναγωγικό δυναμικό στα 0.77 vs SHE, ωστόσο όταν εμπλέκεται με πρωτοπορφυρίνη για το σχηματισμό της ελεύθερης αίμης, το δυναμικό μπορεί να μειωθεί μέχρι και στα -0.115V vs SHE. Όταν η αίμη μπει σε πρωτεϊνική μήτρα, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό παρουσιάζει μία διακύμανση της τάξεως του 1V.

Στις πρώτες ηλεκτροχημικές έρευνες αναγνωρίστηκε ότι η πολικότητα του περιβάλλοντος της αίμης στην πρωτεΐνη θα μπορούσε να είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Εφόσον η υποσιδηρούχος αίμη είναι ουδέτερη και η σιδηρούχος αίμη έχει ένα θετικό φορτίο, η δεύτερη μορφή θα αποσταθεροποιούνταν σε περιβάλλον με χαμηλή διηλεκτρική σταθερά. Για το λόγο αυτό, όσο πιο υδρόφοβο είναι το περιβάλλον της αίμης, τόσο πιο σταθερή θα είναι η υποσιδηρούχος αίμη και τόσο πιο θετικό θα είναι το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Έκτοτε, έχει αποδειχθεί ότι η διαμόρφωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο και η συνεισφορά του κάθε παράγοντα ίσως ποικίλλει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη.

Η σημασία της ικανότητας των υπεροξειδασών να υπάρχουν σε σταθερή βασική κατάσταση και να παράξουν ικανοποιητικά οξειδωτικά ενδιάμεσα για τις αιμοπρωτεΐνες εξηγείται μέσω των ιδιοτήτων δραστικότητας των ειδών σιδήρου. Σε νερό, η ελεύθερη υποσιδηρούχος αίμη οξειδώνεται γρήγορα από το οξυγόνο σε σιδηρικό ιόν, το οποίο δεν μπορεί να προσδέσει οξυγόνο. Από την άλλη όμως σε πρωτεϊνική μήτρα, οι αιμοπρωτεΐνες που δεσμεύουν οξυγόνο, όπως η αιμογλοβίνη και η μυογλοβίνη αυξάνουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του Fe(III)/Fe(II) σε σχέση με την ελεύθερη αίμη και συνεπώς σταθεροποιούν την αναγωγική κατάσταση. Επίσης η αυθόρμητη οξείδωση μειώνεται in vivo λόγω χαμηλής διηλεκτρικότητας του περιβάλλοντος. Συγκριτικά οι υπεροξειδάσες παρουσιάζουν ένα πιο αρνητικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό τόσο in vivo, όσο και in vitro. Επίσης τα πιο αρνητικά οξειδοαναγωγικά δυναμικά υποδεικνύουν έμμεσα, ότι μέσα στην πρωτεϊνική μήτρα, υψηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες σιδήρου όπως αυτές του Fe(IV) ή Fe(V), θα μπορούσαν να σταθεροποιηθούν και έτσι να είναι παρούσες στην αντίδραση. Επιπρόσθετα, το Fe(III) είναι σε θέση να αντιδράσει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, να παράξει ρίζες υδροξυλίου και για το λόγο αυτό, ένα άλλο πλεονέκτημα από το χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, είναι να αποτρέψει το σχηματισμό τόσο αντιδραστικών ειδών. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά υπεροξειδασών αίμης, που ανήκουν στην υπεροικογένεια της υπεροξειδάσης-καταλάσης και παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. [2]



Σχήμα 2: Οξειδοαναγωγικές Μορφές Υπεροξειδάσης

Πίνακας 1: Οξειδοαναγωγικά	Δυναμικό	Fe(III)/Fe(II)	των πρωτεΪνών	<i>αίμης</i> [2]
----------------------------	----------	----------------	---------------	------------------

Protein	pН	Redox potential	Function
		vs. SHE (mV)	
Cytochrome c	7	247	Mitochondrial electron transfer
Myoglobin	7	52	Oxygen transport
Myeloperoxidase	7	5	Innate immune system
Versatile peroxidase	7.5	5	Ligninolytic activity
Manganese peroxidase	7	-88 to -93	Ligninolytic activity
Lignin peroxidase	7	-120 to -140	Ligninolytic activity
Eosinophil peroxidase	7	-126	Innate immune system
Chloroperoxidase	6.9	-140	Halogenation of metabolites
C. cinereus peroxidase	7	-183	Lignification
Nitrophorin 4	5	-187	NO transport
Lactoperoxidase	7	-176	Innate immune system
Cytochrome c peroxidase	6.1	-194	Hydrogen peroxide metabolism
Horseradish peroxidase	7	-278	Lignification, cell wall formation
Turnip peroxidase	8	-233 to -160	Lignification, cell wall formation
Catalase-peroxidase	7	-226	Hydrogen peroxide metabolism
Human peroxiredoxin	7	-290	Hydrogen peroxide metabolism
Soybean peroxidase	7	-310	Cell wall formation

Για την βιοκατάλυση των υπεροξειδασών, τα σχετικά οξειδοαναγωγικά είδη είναι τα Compound I και Compound II. Ωστόσο, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ζεύγους Fe (III)/Fe(II) μπορεί να φανεί επίσης χρήσιμος δείκτης του οξειδοαναγωγικού χαρακτήρα των υπεροξειδασών [2]

Οξειδοαναγωγικά είδη κατά την κατάλυση

Η πιο κοινή, γενική αντίδραση των περοξειδασών μπορεί να γραφτεί όπως ακολουθεί στην παρακάτω εξίσωση, όπου το RH είναι το κατάλληλο υπόστρωμα της περοξειδάσης και R['], είναι μία ελεύθερη ρίζα που προκύπτει από αυτό.

$$2RH + H_2O_2 \rightarrow 2R' + 2H_2O$$

Στην πραγματικότητα η κινητική είναι αρκετά περίπλοκη λόγω πολλών μετατροπών του ενζύμου. Μία γενική εικόνα των οξειδοαναγωγικών ειδών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Σχήμα 3: Αποτύπωση των ειδών περοξειδάσης που συμμετέχουν στον καταλυτικό κύκλο

Compound 0

Το πρώτο στάδιο της κατάλυσης της υπεροξειδάσης περιλαμβάνει τη δημιουργία δεσμού, συνήθως H₂O₂ στο άτομο σιδήρου της αίμης για να παράγει ενδιάμεσο υδροϋπεροξειδίου τρισθενούς σιδήρου [Fe (III) − OOH]. Τα κινητικά δεδομένα πιστοποιούν την ύπαρξη ενός ενδιάμεσου πριν από το Compound I, του οποίου ο σχηματισμός μπορεί να είναι κορεσμένος σε μεγάλες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Η συγκεκριμένη ενδιάμεση ένωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κατά την αντίδραση του HRP με H₂O₂.

Compound Ι: Ρίζα Πορφυρίνης

Η μετατροπή του Compound 0 σε Compound I απαιτεί την πρωτονίωση του απομακρυσμένου οξυγόνου του συμπλόκου υδροϋπεροξειδίου τρισθενούς σιδήρου, έτσι ώστε ο σχηματισμός των ειδών φερυλλίου να μπορεί να συνδεθεί με την απομάκρυνση του απομακρυσμένου οξυγόνου ως μορίου νερού. Θεωρείται ότι το περιφερειακό μόριο ιστιδίνης στην ενεργό περιοχή της υπεροξειδάσης είναι η βάση που αποπρωτονιώνει το υπεροξείδιο κατά το σχηματισμό του Compound 0. Αυτό το πρωτόνιο είναι στη συνέχεια που παρέχεται από την ιμιδαζόλη στο απομακρυσμένο οξυγόνο του συμπλόκου του υδροϋπεροξειδίου του σιδήρου, που καταλύει τη διάσπαση του δεσμού Ο-Ο και παράγει το Compound I.

Compound II

Αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του Compound Ι παράγει το Compound ΙΙ, στο οποίο ο σίδηρος είναι παρών υπό την κατάσταση [Fe(IV)], αλλά η ρίζα πορφυρίνης έχει σβήσει.

Compound III

Υποδηλώνει ένα σύμπλεγμα στο οποίο το μόριο του οξυγόνου δεσμεύεται τελικά, σχηματίζοντας μία σιδηρούχο ένωση της υπεροξειδάσης. Πρόκειται λοιπόν για μια δομή που είναι κοντά στις μορφές οξυγόνου που είναι παρούσες στην οξυμυογλοβίνη και στην οξυαιμογλοβίνη. Η κρυσταλλική δομή της HRP (Compound III), δείχνει ότι το οξυγόνο να δημιουργεί διαμόρφωση υπό γωνία με το σίδηρο.

Το Compound III, στο οποίο ο σίδηρος είναι σιδηρούχο κατάσταση, συνήθως σχηματίζεται όταν υπάρχει μεγάλη περίσσεια H_2O_2 . Είναι πιθανό αυτό το ενδιάμεσο να σχηματίζεται ιδιαίτερα όταν το σουπεροξείδιο αναγεννάται από την οξείδωση του H_2O_2 από το σιδηρούχο ένζυμο, αν και το υπεροξείδιο θα μπορούσε επίσης να δημιουργηθεί με μεταφορά ηλεκτρονίων από οξειδωμένα υποστρώματα προς μοριακό οξυγόνο. Το Compound III, δεν είναι ένα καταλυτικά ενεργό ενδιάμεσο. [2]

Βιοαισθητήρες

Το ενδιαφέρον για τους βιοαισθητήρες είναι ιδιαίτερα έντονο τις τελευταίες δεκατίες. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες συνδυάζουν την ευαισθησία των ηλεκτροαναλυτικών μεθόδων, σε συνδυασμό με την εκλεκτικότητα του βιολογικού συστατικού. Το βιολογικό συστατικό του αισθητήρα αναγνωρίζει το δικό του αναλύτη που έχει σαν αποτέλεσμα μία καταλυτική δράση ή μία αντίδραση που τελικά παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο καταγράφεται από ένα μετατροπέα. Το σήμα είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση του αναλύτη. Μερικές από τις συσκευές αισθήρων έχουν φτάσει σε εμπορικό στάδιο και χρησιμοποιούνται συτηματικά σε κλινικές, περιβαλλοντικές, βιομηχανικές και γεωργικές εφαρμογές. Ωστόσο η μετατροπή ενός βιολογικού σήματος σε ένα εύκολα επεξεργάσιμο σήμα είναι κάπως σύνθετο, λόγω της δυσκολίας του να συνδέσεις μία ηλεκτρονική συσκευή με ένα βιολογικό περιβάλλον. [3]

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται σχηματικά τα τμήματα που αποτελούν ένα τυπικό βιοσένσορα:

- 1. Βιοϋποδοχείς που συνήθως συνδέονται με τον αναλύτη.
- Μία επιφάνεια όπου μία βιολογική δράση λαμβάνει μέρος και έτσι δημιουργείται το σήμα.
- 3. Το σήμα του μετατροπέα μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρονικό σήμα και ενισχύεται. Κατόπιν αποστέλλεται για επεξεργασία.
- Μετατροπή μέσω του λογισμικού του υπολογιστή σε μία παράμετρο με φυσική σημασία.
- 5. Επεξεργασία από τον ανθρώπινο παράγοντα προς εκμαίευση ποσοτικών αποτελεσμάτων. [4]



Σχήμα 4: Σχηματική Απεικόνιση Βιοσένσορα με Ηλεκτροχημικό Διαμεσολαβητή [3]

Τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να πληρεί ένας βιοαισθητήρας είναι:

- Ο βιοκαταλύτης πρέπει να είναι ιδιαίτερα εκλεκτικός ως προς το υλικό που θέλουμε να ανιχνεύσουμε
- 2. Σταθερότητα αποθήκευσης και χρήσης
- 3. Η αντίδραση θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν ανεξάρτητη ως προς το pH, τη θερμοκρασία και την ανάδευση. Τα παραπάνω θα επιτρέψουν την ανάλυση των δειγμάτων με μηδένικη προετοιμασία.
- 4. Η απόκριση θα πρέπει να είναι *ακριβής*, κατά το δυνατόν απαλλαγμένη από σφάλματα παρατήρησης και συστηματικά σφάλματα.
- 5. Η απόκριση θα πρέπει να είναι *επαναλήψιμη* και γραμμική με τη συγκέντρωση τουλάχιστον για το εύρος συγκεντρώσεων που μας ενδιαφέρει.
- 6. Χαμηλό όριο ανίχνευσης
- 7. Μικρός χρόνος απόκρισης [4]

Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων

Ο αμπερομετρικός βιοαισθητήρας είναι ένας τύπος ηλεκτροχημικού αισθητήρα, καθώς μετρούν συνεχώς την απόκριση ρεύματος ως αποτέλεσμα της οξείδωσης ή της μείωσης ενός ηλεκτρενεργού είδους σε μια βιοχημική αντίδραση. Τα ηλεκτρόδια οξυγόνου Clark αποτελούν ίσως τη βάση για τις απλούστερες μορφές των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, όπου παράγεται ρεύμα ανάλογα με τη συγκέντρωση οξυγόνου. Τα παραπάνω μετρώνται σε ένα ηλεκτρόδιο εργασίας ως προς ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl για δεδομένη τιμή δυναμικού. Συνήθως το ρεύμα μετριέται με σταθερό δυναμικό και αυτό αναφέρεται ως αμπερομετρία. Στην περίπτωση που μετρηθεί ένα ρεύμα κατά τη διάρκεια ελεγχόμενων μεταβολών δυναμικού, αυτό αναφέρεται ως βολταμετρία. Επιπλέον η μέγιστη τιμή του ρεύματος που μετράται σε ένα εύρος γραμμικού δυναμικού πρέπει να είναι ανάλογη τη συγκέντρωσης του αναλύτη, δηλαδή τα ηλεκτρενεργά είδη.

Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας μετρά τη συσσώρευση του δυναμικού φόρτισης στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς σε ένα ηλεκτροχημικό κελί όταν δεν υπάρχουν ροές ρεύματος μεταξύ τους (συνθήκες μηδενικού ρεύματος) και το παραγόμενο δυναμικό είναι ευθέως ανάλογο του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του αναλυτή. Για τις ποτενσιομετρικές μετρήσεις η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και του δυναμικού διέπεται από την εξίσωση Nernst:

$$E_{cell} = E_{cell}^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q,$$

όπου n ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλάσσονται ανά mol, F η σταθερά Faraday, το E_{cell} αντιπροσωπεύει το δυναμικό του κελιού σε μηδενικό ρεύμα, Ε₀, μία σταθερή

δυνητική συνεισφορά δυναμικού, Τ η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και R η γενική σταθερά των αερίων.

Ο αγωγιμομετρικός βιοαισθητήρας μετρά την ικανότητα ενός αναλύτη, όπως είναι ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα, για να άγει ηλεκτρικό ρεύμα μεταξύ ηλεκτροδίων. Οι βιοαισθητήρες αυτοί συνδέονται στενά με τα ένζυμα εκεί όπου η ιοντική ισχύς και κατά συνέπεια η αγωγιμότητα ενός διαλύματος μεταξύ δύο ηλεκτροδίων αλλάζει λόγω της ενζυμικής αντίδρασης. Για το λόγο αυτό οι αγωγιμόμετρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται για να φορτισμένων ειδών στο διάλυμα. [5]

Γενιές βιοαισθητήρων

Η πρώτη γενιά βιοαισθητήρων γλυκόζης βασίζεται στη χρήση φυσικού οξυγόνου ως συνυποστρώματος για την αναγέννηση και ανίχνευση του υπεροξειδίου. Η βιοκαταλυτική αντίδραση περιλαμβάνει την αναγωγή της ομάδας φλαβίνης (FAD) του ενζύμου, με την αντίδραση με γλυκόζη για να δώσει την ανηγμένη μορφή του ενζύμου (FADH₂)

 $GO_X(FAD) + glucose \rightarrow GO_X(FADH_2) + glucose_{ox}$

Έπειτα ακολουθείται από την οξείδωση εκ νέου της φλαβίνης από μόριο οξυγόνου και αναγεννάται η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου GO_x(FAD)

$$GO_X(FADH_2) + O_2 \rightarrow GO_X(FAD) + H_2O_2$$

Τελικά, μετράται το παραγόμενο υπεροξείδιο σε ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου εφαρμόζοντας δυναμικό (+0.6 V vs Ag/AgCl).

 Η δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων γλυκόζης σχετίζεται με την αντικατάσταση του μοριακού οξυγόνου από τεχνητά συνυποστρώματα τα οποία δέχονται τα ηλεκτρόνια από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και τα μεταφέρουν κατόπιν στην ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

 $GOx_{(OX)}$ + Glucose \rightarrow GOx_{red} + Gluconic Acid

 GOx_{red} +2 $M_{OX} \rightarrow GOx_{ox}$ + 2 M_{red} + 2 H^+

 $2M_{red} \rightarrow 2M_{OX} + 2e^{-1}$

Η τρίτη γενιά βιοαισθητήρων έχει ως στόχο την άμεση ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Εφόσον ισχύει αυτό, ο βιοαισθητήρας μπορεί να λειτουργήσει σε δυναμικά μικρότερα και κοντά στα οξειδοαναγωγικά δυναμικά του ενζύμου. Οι παραπάνω στόχοι έχουν οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων ακινητοποίησης του ενζύμου, έτσι ώστε το ενεργό του κέντρο του ενζύμου να έρχεται σε άμεση επαφή με το ηλεκτροδίο. [6]

Μέθοδοι ακινητοποίησης

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις φυσικές, όπως για παράδειγμα είναι η προσρόφηση και τις χημικές, όπου πραγματοποιείται σύζευξη με χημικούς δεσμούς μεταξύ του ηλεκτροδίου και του υποστρώματος.

Για να θεωρείται μία ακινητοποίηση επιτυχής θα πρέπει να ικανοποιούνται κάποιες *προϋποθέσεις όπως:*

- Το ένζυμο και το ηλεκτρόδιο να είναι σε άμεση επαφή μεταξύ τους
- Κατά τη διάρκεια της ακινητοποίησης να μην παρεμποδιστεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου και να μην αλλάξει η στερεοδομή του
- Ο τελικός βιοσένσορας να είναι σταθερός, επαναχρησιμοποιούμενος και να διατηρεί την εκλεκτικότητα του ενζύμου.

Μία αξιόπιστη μέθοδος είναι η παγίδευση του ενζύμου μεταξύ σχηματισμένων μεμβρανών στο ηλεκτρόδιο. Η εσωτερική μεμβράνη προστατεύει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου από ουσίες που μπορεί να το ρυπάνουν μέσω προσρόφησης. Η εξωτερική μεμβράνη παρέχει κάποια επιλεκτικότητα με βάση το μέγεθος πόρου ή τη χημική φύση του πολυμερούς και σταθεροποιεί την απόκριση του ηλεκτροδίου σταθεροποιώντας το ρυθμό διάχυσης του υποστρώματος στο στρώμα του ενζύμου.

Στη φυσική ακινητοποίηση η μορφή του ενζύμου παραμένει εφόσον η μέθοδος αυτή δεν περιλαμβάνει τη δημιουργία ηλεκτροχημικών δεσμών. Από την άλλη οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του ενζύμου και το υλικό του ηλεκτροδίου.

Κοινές μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων περιλαμβάνουν την παγίδευση ενζύμων έναντι του ηλεκτροδίου σε προσχηματισμένη μεμβράνη ενθυλάκωση, ενσωμάτωση σε ηλεκτροπολυμερισμένη μεμβράνη, ενσωμάτωση σε πάστα άνθρακα,προσρόφηση, δικτύωση. Η δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος.

Αγώγιμα Πολυμερή

Η παραγωγή αγώγιμων πολυμερών έχει τεράστιο βιομηχανικό ενδιαφέρον εξαιτίας του ευρέως φάσματος εφαρμογών τους, συμπεριλαμβανομένου του ηλεκτρονικού εξοπλισμού, των πλαστικών μπαταριών. Οι ηλεκτροαγώγιμες ιδιότητες των πολυμερών αυτών (Electroconductive Polymers-EPs), προκύπτουν από συγκεκριμένους απλούς και διπλούς δεσμούς που δημιουργούν συζεύξεις (π-συζευγμένο σύστημα) γύρω από τον κύριο κορμό της αλυσίδας. Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα των EPs να αλλάζουν την αγωγιμότητα τους. Αυτό είναι ανάλογο των ουσιών που χρησιμοποιούνται ως dopents κατά τον πολυμερισμό τους. Γενικά οι αγώγιμες ιδιότητές τους μπορούν να παραπέμψουν σε μεταλλικούς αγωγούς, ημιαγωγούς ή μονωτές. Τα οξειδωτικά πρόσθετα (dopents) που χρησιμοποιούνται κατά τον πολυμερισμό είναι ενώσεις όπως BF₃, FeCl₃ και οξέα τύπου HX, όπου X=F, Cl, Br, I. Διάφοροι μηχανισμοί εξηγούν τη μεταφορά φορτίου κατά μήκος ή εσωτερικά της αλυσίδας του ΕΡ. Σε μία από αυτές θεωρείται ότι η ροή φορτίου είναι φαυσμάτων των αλυσίδων των ΕΡ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων ή και οπών. [7]

Οι παρακάτω χημικές ιδιότητες των ΕΡ χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των βιοχημικών αισθητήρων:

- 1. Δυνατότητα εύκολης ακινητοποίησης διαφορετικών βιοχημικά ενεργών φορέων (ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊνικά οξέα, θραύσματα κυττάρων)
- 2. Δυνατότητα εμφύτευσης ιόντων στο πολυμερές
- 3. Αντιδράσεις ανταλλαγής ιόντων μεταξύ του πολυμερούς και του ηλεκτρολύτη
- 4. Ιδιότητες οξειδοαναγωγικού διαμεσολαβητή
- 5. Εξάρτηση της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης από την εφαρμοζόμενη τάση
- 6. Επιλεκτική διαπερατότητα από συγκεκριμένες ουσίες

Βιοαισθητήρας υπεροξειδίου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε διάφορες εφαρμογές. Είναι ένας σημαντικός διαμεσολαβητής στην φαρμακευτική, στην κλινική και περιβαλλοντική έρευνα. Επιπρόσθετα, αποτελεί ένα σημαντικό ρύπο σε αρκετά βιομηχανικά προϊόντα και απόβλητα. Ως εκ τούτου, μια αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος για τον προσδιορισμό του H₂O₂ έχει μεγάλη σημασία. Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές προτιμώνται λόγω της απλότητάς τους, του χαμηλού κόστους τους, της υψηλής ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας. Ειδικά ένας αμπερομετρικός βιοαισθητήρας είναι ένα ελκυστικό εργαλείο για την ανίχνευση του H₂O₂. Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης και η μέθοδος της κυκλικής βολταμετρίας. Το ένζυμο υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας (HRP) είναι ένα από τα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την τροποποίηση του ηλεκτροδίου. Στις ηλεκτροχημικές μεθόδους διαφορετικοί τύπου συνυποστρωμάτων (mediators), έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως η υδροκινόνη, η κατεχόλη, το κυανό του μεθυλενίου, το πράσινο του μεθυλενίου, η θειονίνη, η ανιλίνη και άλλα, προκειμένου να παραχθούν τροποποιημένα με ένζυμα, ηλεκτρόδια. Ωστόσο έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά και βιοαισθητήρες που βασίζονται στο HRP, χωρίς διαμεσολαβητή. [8]

Κεφάλαιο 2

Η πολυανιλίνη ως διαμεσολαβητής (mediator)

Ιδιότητες, χρήσεις και σύνθεση πολυανιλίνης

Η πολυανιλίνη (PANI), είναι ένα ημι-ελαστικό πολυμερές που μαζί με άλλα αγώγιμα πολυμερή όπως το πολυακετυλένιο και η πολυπυρρόλη, αποτελούν ένα σύγχρονο αντικείμενο έρευνας κυρίως λόγω της δυνατότητας χρήσης τους σε πολλές πρακτικές εφαρμογές. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα που παρουσιάζουν είναι ότι το κόστος κατασκευής τους είναι αρκετά χαμηλό. Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν ημιαγώγιμες ιδιότητες και ομοίως με τους ανόργανους ημιαγωγούς αντιδρούν σε εξωτερικές επιδράσεις με αλλαγή της αγωγιμότητάς τους, του χρωματός τους, της πυκνότητάς τους και με αλλαγή στις μαγνητικές τους ιδιότητες και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αισθητήρες. Η πολυανιλίνη ειδικά ξεχωρίζει ως υλικό για αισθητήτες λόγω:

- της υψηλής χημικής σταθερότητάς της σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα
- της μη τοξικότητάς της
- της υψηλής θερμικής σταθερότητάς της
- του χαμηλού κόστους κατασκευής της
- της άμεσης και εύκολης εναπόθεσή της στο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα
- του εύκολου ελέγχου του πάχους του φιλμ
- της αγωγιμότητάς της που εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της πρόσμιξης
- τη μεγάλη επιφάνεια επαφής που είναι ανάλογη και με το πορώδες της
- της μακροχρόνιας σταθερότητάς σε συνθήκες περιβάλλοντος

Το πολυμερές αποτελείται από πάρα-υποκατεστημένα μονομερή συζευγμένα υπό μορφή head-to-tail. Το σχηματιζόμενο πολύμερες μπορεί να σχηματίζει μονοδιάστατες δομές (nanofibers, nanotubes), διδιάστατες δομές (nanobelts, nanoplates) και τρισδιάστατες δομές (μικρόσφαιρες, νανόσφαιρες). Κατά της δημιουργίας πολυανιλίνης με οξειδωτικό πολυμερισμό, σχηματίζονται όλες αυτές οι μοριακές δομές που προηγουμένως αναφέρθηκαν. Κατά το στάδιο του πολυμερισμού, το μονομερές υφίσταται αλυσιδωτή αντίδραση με το σχηματισμό κανονικών μακρομορίων και οι αναπτυσσόμενες αλυσίδες οργανώνονται ταυτόχρονα σε πολύπλοκες υπερμοριακές δομές. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, δημιουργείται ένα αγώγιμο πολυμερές που περιλαμβάνει σταθερές υπερμοριακές δομές και αποτελείται από ποικίλη μορφολογία, εφόσον υπάρχει ποικιλία στις διδιάστατες μορφές οι οποίες συνολικά σχηματίζουν μια ποικιλόμορφη τρισδιάστατη δομή. Οι περισσότερες από αυτές τις δομές δεν μπορούν να διαλυθούν ή να τήκονται χωρίς να σπάσουν οι αλυσίδες του πολυμερούς και χωρίς να αλλάξουν οι ιδιότητες του πολυμερούς. Επομένως, η σύνθεση είναι πολύ βασικό στάδιο για τον έλεγχο της μορφολογίας του πολυμερούς. Χαρακτηριστικά όπως η αγωγιμότητα του φιλμ εξαρτώνται από το είδος του ηλεκτρολύτη και την οξύτητα του διαλύματος όπου πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις [9].

Οι αλυσίδες του αγώγιμου πολυμερούς έχουν διατεταγμένη δομή, περιλαμβάνουν φαινολικούς δακτυλίους και ομάδες που περιέχουν άζωτο. Η δομή που σχηματίζεται προσφέρεται για πολυσύζευξη. Η αλυσίδα του πολυμερούς σχηματίζει δομές zig-zag, που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και τα π-ηλεκτρονιακά νέφη αλληλοεπικαλύπτονται πάνω και κάτω του επιπέδου. Τα νέφη αυτά και οι απομακρυσμένοι δεσμοί είναι ως επί το πλείστον

υπεύθυνοι για τη μεταφορά φορτίου στο πολυμερές. Το ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου πραγματοποιεί την ίδια λειτουργία με τα π-ηλεκτρόνια και εξασφαλίζει την πολυσύζευξη. Το πολυσυζευγμένο σύστημα είναι ένα μονοπάτι μεταφοράς φορτίου και δημιουργείται από αυστηρώς δομημένες μονάδες μονομερούς. Θα μπορούσε να ισχυριστεί κανείς ότι τα πηλεκτρονιακά νέφη λειτουργούν σα νησίδες αγωγιμότητας σε ένα κατά τα άλλα μη αγώγιμο περιβάλλον.

Όταν το υλικό αυτό βρίσκεται σε οξύ, πρωτονιώνεται και σχηματίζει ένα διπολικό ιόν, που τελικά μετασχήματιζεται σε μία πιο σταθερή δομή όπως φαίνεται στο Σχ. 1. Αυτή η πολική δομή είναι υπεύθυνη για την αγωγιμότητα του φιλμ μέσω μηχανισμών αναπήδησης η οποία μπορεί να συμβαίνει, είτε εντός της αλυσίδας ή μεταξύ των αλυσίδων. Σε αυτή τη δομή ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταφέρεται από γειτονικά ουδέτερο άτομο αζώτου σε μία ρίζα αζώτου, καθιστώντας τη ουδέτερη και κατά αυτόν τον τρόπο γίνεται η μεταφορά φορτίου, είτε εντός της αλυσίδα σε αλυσίδα. Ωστόσο, στη διπολική δομή αυτό δεν είναι εφικτό όταν δύο άτομα αζώτου είναι σε όμοια κατάσταση ως προς το φορτίο και γειτνιάζουν μεταξύ τους, όπως για παράδειγμα στη μορφή της λευκοεμεραλδίνης και της πενιγρανιλίνης, που όλα τα άτομα αζώτου είναι στην ίδια κατάσταση ως προς το φορτίο, κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Εφόσον βρίσκονται σε όξινο περιβάλλον ίσως ορισμένα από τα άτομα αζώτου - είτε σε αλυσίδες, είτε ελεύθερα - μπορούν να πρωτονιωθούν αλλά εφόσον είναι σε μικρό ποσοστό και γειτνιάζουν είναι στατιστικά δύσκολο να υπάρξει πολικότητα και μεταφορά φορτίου σε όλο το φιλμ. [10]



Σχήμα 5:Πολικότητα αλυσίδας [11]

Οι μεταφορείς φορτίου σχηματίζονται στο πολυμερές κατά τη διάρκεια της οξείδωσης όπου τα άτομα αζώτου της PANI λειτουργούν ως κέντρα οξείδωσης. Κατά την οξείδωση, όταν υπάρχει μετακίνηση ηλεκτροδίου, δημιουργείται θετικό πολαρόνιο (polaron) στην αλυσίδα και η δομή της αλλάζει συνολικά. Η πιο σταθερή μορφή του πολυμερούς ανιλίνης είναι η εμεραλδίνη, όπου κάθε δεύτερο άτομο αζώτου είναι οξειδωμένο και η αλυσίδα του πολυμερούς περιλαμβάνει εξίσου οξειδωμένα και ανηγμένα είδη. Υπό την απουσία επιβολής εξωτερικού δυναμικού, η πλήρως ανηγμένη και πλήρως οξειδωμένη μορφή του πολυμερούς τείνουν να μετατρέπονται συνεχώς σε αυτή την μορφή. Στην περίπτωση της λευκοεμεραλδίνης, η μετατροπή σε εμεραλδίνη μπορεί να πραγματοποιηθεί από την αργή οξείδωση μέσω της επαφής του φιλμ με το οξυγόνο του αέρα. Αυτή η αντίδραση είναι αντιστρεπτή. Όμοια και η πενιγρανιλίνη έχει την τάση να μειώνει την οξείδωση του φιλμ, τότε αυτό υπαβαθμίζεται, οι δεσμοί σπάνε, σχηματίζονται κάποια περαιτέρω μονομερή, όπως κινόνες, και τότε πλέον η κατάσταση του φιλμ δεν είναι αντιστρεπτή.



Σχήμα 6: Κύριες μορφές πολυανιλίνης [12]

Στο Σχ.2 παρουσιάζονται οι κύριες μορφές πολυανιλίνης οι οποίες μεταξύ τους διαφέρουν ως εξής:

- Η μετατροπή της εμεραλδίνης σε νιγρανιλίνη πραγματοποιείται με προσθήκη δύο ατόμων οξυγόνου
- Η μετατροπή της εμεραλδίνης σε πενιγρανιλίνη πραγματοποιείται με προσθήκη δύο ατόμων οξυγόνου
- Η αναγωγή της εμεραλδίνης σε λευκοεμεραλδίνη απαιτεί τέσσερα άτομα υδρογόνου
- Η αναγωγή της νιγρανιλίνης σε λευκοεμεραλδίνη απαιτεί έξι άτομα υδρογόνου
- Η αναγωγή της πενιγρανιλίνης σε λευκοεμεραλδίνη απαιτεί οχτώ άτομα υδρογόνου



Σχήμα 7: Μετατροπή πολυμερούς από τη μία μορφή στην άλλη [12]

Ο πολυμερισμός της ΡΑΝΙ μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, ο πρώτος είναι ο χημικός πολυμερισμός και ο δεύτερος είναι ο ηλεκτροχημικός πολυμερισμός. Η σύνθεση της PANI με χημικό τρόπο οξείδωσης περιλαμβάνει τη χρήση ενός οξειδωτικού (κατά κανόνα, χρησιμοποιούνται δύο οξέα, είτε HCl, είτε H2SO4) παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (NH₄)₂S₂O₈. Η βασική λειτουργία του οξειδωτικού είναι η αφαίρεση ενός πρωτονίου από το μόριο της ανιλίνης, χωρίς να σχηματίζει ισχυρές δομές συντονισμού με το υπόστρωμα ή κάποια ενδιάμεσο. Πολλές φορές η ποσότητα του οξειδωτικού μειώνεται και ρυθμίζεται προς αποφυγή της οξειδωτικής αποδόμησης του πολυμερούς. Συνεχώς προστίθενται στην άκρη της αλυσίδας μέσω οξειδοαναγωγικής διεργασίας. Η υψηλή μονομερή συγκέντρωση ενός ισχυρού οξειδωτικού (NH₄)₂S₂O₈, στο αρχικό στάδιο πολυμερισμού δίνει τη δυνατότητα της γρήγορης οξείδωσης των ολιγομερών και της πολυανιλίνης, όπως και την ύπαρξη τους σε οξειδωμένη μορφή. Η οξειδοαναγωγική διεργασία που πραγματοποιείται προς ανάπτυξη της αλυσίδας φαίνεται στο επόμενο Σχήμα. Όπως φαίνεται ένα μονομερές ανιλίνης οξειδώνεται αποκτώντας θετικό φορτίο και προς σταθεροποίησή του σχηματίζει μια δομή συντονισμού. Το μονομερές αυτό ενώνεται με την ανηγμένη μορφή του που έχει αρνητικό φορτίο και κάπως έτσι αναπτύσσεται σταδιακά η αλυσίδα.



Σχήμα 8: Ομοπολυμερισμός της ανιλίνης [12]

Για τη σύνθεση της ΡΑΝΙ υπάρχουν τρεις ηλεκτροχημικές μέθοδοι πολυμερισμού:

- Γαλβανοστατική Μέθοδος: Εφαρμογή σταθερού ρεύματος
- Ποτενσιοστατική Μέθοδος: Εφαρμογή σταθερού δυναμικού
- Ποτενσιοδυναμική Μέθοδος: Το ρεύμα και το δυναμικό μεταβάλλονται με το χρόνο,
 π.χ. κυκλικο-βολταμμογραφικά

Όποια από τις παραπάνω και αν είναι η μέθοδος που επιλεγεί, χρησιμοποιείται ηλεκτροχημικό κελί τριών ηλεκτροδίων που αποτελείται από:

- Το ηλεκτρόδιο εργασίας, όπου εκεί αποτίθεται το πολυμερές
- Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο
- Το ηλεκτρόδιο αναφοράς

Η ηλεκτροχημική μέθοδος σύνθεσης υπερέχει της χημικής στα παρακάτω σημεία:

- Απλή διαδικασία και λιγότερο ακριβή
- Αντίθετα από τη χημική μέθοδο, δεν υπάρχει η ανάγκη για καταλύτη και τα πολυμερή που προκύπτουν είναι ομογενή και καθαρά.
- Η πρόσμιξη (doping) του πολυμερούς μπορεί να γίνει αλλάζοντας τη φύση των ιόντων στο διάλυμα.
- Με κατάλληλη επιλογή των τιμών των μεταβλητών που επιδρούν στον ηλεκτροπολυμερισμό, όπως οι προσμίξεις (dopants) ή τα όρια των δυναμικών πολυμερισμού στην περίπτωση που επιλεγεί η κυκλική βολταμετρία ως μέθοδος μπορεί να ελεγχθεί το πορώδες και το πάχος του φιλμ.

Τα στάδια που πραγματοποιούνται κατά τον ηλεκτροχημικό πολυμερισμό είναι τα εξής:

 Δημιουργία κατιονικής ρίζας, όπως φαίνεται στο Σχ. 5. Από την άποψη της κινητικής αυτό είναι το ελέγχον στάδιο. Η κατιονική ρίζα μπορεί να υπάρξει σε τρεις μορφές όπως φαίνεται στο Σχ. 6. Σημειώνεται ότι το πρώτο αυτό στάδιο δεν παρουσιάζει εξάρτηση από το pH του διαλύματος.



Σχήμα 9: Κατιονική ρίζα [12]



Σχήμα 10: Μορφές συντονισμού κατιονκής ρίζας [12]

 Το επόμενο βήμα απαιτεί οξειδωτικό μέσο για να πραγματοποιηθεί. Πρόκειται για την αντίδραση μεταξύ της κατιονικής ρίζας και της μεσαίας μορφής της ρίζας. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται head-to-tail και οδηγεί στο σχηματισμό του διμερούς (Σχ. 7). Μετέπειτα, με διαδοχικές οξειδώσεις ακολουθεί ο σχηματισμός της ρίζας του κατιονικού διμερούς (Σχ. 8).



para-aminodiphenylamine (PADPA)

Σχήμα 11: Δημιουργία διμερούς [12]



Σχήμα 12: Δημιουργία κατιονικής ρίζας διμερούς [12]

 Η σχηματιζόμενη κατιονική ρίζα μπορεί να αντιδράσει, είτε με το μονομερές ή με την αντίστοιχη κατιονική ρίζα σχηματίζοντας ανάλογα ένα τριμερές ή ένα τετραμερές.

Ο πολυμερισμός της ανιλίνης με κυκλική βολταμμετρία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά δυναμικά αλλά συνήθως μεταξύ των δυναμικών -300 έως 1400 mV vs Ag/AgCl. Επιπλέον ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ηλεκτρόδια διαφορετικών υλικών και με διαφορετικές προσμίξεις (doping agents), οι οποίοι είναι: HCl, HF, H₂SO₄, CH₃COOH, Cl₃C-COOH. Τα οξέα τα οποία χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό, επηρεάζουν σημαντικά τη μορφολογία του πολυμερούς. Γενικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κυρίως κατηγορίες (κατηγορίες 1 και 2). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα BF₄⁻, ClO₄⁻, CF₃COO⁻ και δημιουργούν μία συμπυκνωμένη δομή, ενώ τα ιόντα SO₄²⁻, NO₃⁻ και Cl⁻, μία ανοιχτή δομή, ιδιαίτερα πορώδη, η οποία προσβάλλεται εύκολα από τον ηλεκτρολύτη. Επομένως η αλλαγή του ιόντος συνεπάγεται αλλαγή στην κινητική, η οποία φαίνεται και στο ύψος της πρώτης οξειδωτικής κορυφής του βολταμμογραφήματος, οπότε ως προς την κινητική η σχέση που υπάρχει είναι η εξής:

H₂SO₄>HNO₃>HCl>HClO₄

Για τα ιόντα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία (1st class dopants) η σχέση μεταξύ του πάχους της εναπόθεσης, του αριθμού των κύκλων και της ταχύτητας σάρωσης είναι

γραμμική, ενώ για τα ιόντα της δεύτερης κατηγορίας είναι γραμμική του τετραγώνου. Αντίστοιχη σχέση έχει και το φορτίο σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων κατά τον πολυμερισμό. Μετά του 50-60 κύκλους, όμως, η σχέση τείνει να γίνει γραμμική. Άρα μπορεί να υποτεθεί ότι το σύστημα φτάνει σε κάποια στιγμή σε μόνιμη κατάσταση [13], [14].

Acid	c/M	Kn/Mc cm ⁻² cycle ⁻ⁿ
HBF ₄	1	3.8
HBF ₄	2	8.5
HCIO ₄	0.5	1.9
HCIO ₄	1	4.2
HCIO ₄	2	8
HCI	0.5	0.11
HCI	1	0.47
HCI	2	1.9
HNO ₃	1	0.51
HNO₃	2	2.2
HNO ₃	4	7.8
H ₂ SO ₄	0.5	0.95
H ₂ SO ₄	1	2
H ₂ SO ₄	2	5.2

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά φιλμ για διαφορετικές προσμίξεις [13]

Στον παραπάνω Πίνακας 2 φαίνεται ο ρυθμός εναπόθεσης για διαφορετικές προσμίξεις διαφορετικής συγκέντρωσης και φαίνεται ότι ο ρυθμός για HCl 1M είναι ο πιο μικρός.

Τα ηλεκτρόδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι Pt, C, Cu, Fe, Zn, Cr και Pd. Ο πολυμερισμός συνήθως πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και σε pH από 0 έως 2. Η δε εναπόθεση της ανιλίνης πραγματοποιείται με σύντομη έκθεση στα δυναμικά όπου πραγματοποιείται οξείδωση και ακολουθεί αναγωγή των οξειδωμένων ειδών κατά τη διάρκεια του καθοδικού κύκλου. Με τον τρόπο αυτό δεν συναποτίθενται προϊόντα υδρόλυσης στο φίλμ και επιτυγχάνονται φιλμ μεγαλύτερου πάχους και μεγαλύτερης αγωγιμότητας.

Τα πολυμερές που δημιουργείται είναι η πλήρως οξειδωμένη π-φαινυλενοϊμίνη και π-φαινυλενοαμίνη. Το ποσοστό της αμινο-ιμίνης εξαρτάται από το δυναμικό του ηλεκτροδίου. Ανά περιοχή δυναμικού έχουμε:

- 0.2 V vs Ag/AgCl αντιστοιχεί σε περίπου 25% πρωτοεμεραλδίνη στο φιλμ του πολυμερούς.
- 0.65 V vs Ag/AgCl αντιστοιχεί σε περίπου 50% εμεραλδίνη

• 0.85 V vs Ag/AgCl αντιστοιχεί σε περίπου 80% νιγρανιλίνη [15]

Ο βαθμός οξείδωσης αυξάνεται όσο πιο θετικό είναι το δυναμικό. Όμως, αν το δυναμικό ξεπρεράσει ένα άνω όριο, τότε η οξειδοαναγωγή του φιλμ, μπορεί να είναι μη αντιστρεπτή. Λόγω αυτού συχνά προτείνεται πολυμερισμός που μην ξεπερνά τα 0.9 V. Όποια και αν είναι όμως η επιλογή των δυναμικών, είναι σημαντικό ο πρώτος κύκλος να πραγματοποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα το 1 V. Κατά τον πρώτο κύκλο, ξεπερνώντας το 1V, πραγματοποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα το 1 V. Κατά τον πρώτο κύκλο, ξεπερνώντας το 1V, πραγματοποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα το 1 V. Κατά τον πρώτο κύκλο, ξεπερνώντας το 1V, πραγματοποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα το 1 V. Κατά τον πρώτο κύκλο, ξεπερνώντας το 1V, πραγματοποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα το 1 V. Κατά τον πρώτο κύκλο, ξεπερνώντας το 1V, πραγματοποιείται η οξείδωση του αρχικού μονομερούς. Το ουδέτερο μόριο της ανιλίνης οξειδώνεται και αποπρωτεϊνώνεται, οπότε δημιουργείται το κανιόν C₆H₅NH⁺. Μετά την ηλεκτροφιλική 'επίθεση' από άλλο μόριο ανιλίνης δημιουργείται ένα 'head-tail' διμερές, η p-αμινοδιφαινυλαμίνη. Το διμερές οξειδώνεται σε ένα βήμα, σε μία κινοϊδή μορφή με συμμετοχή δύο ηλεκτρονίων λόγω του χαμηλότερου δυναμικού οξείδωσης σε σύγκριση με την ανιλίνη. Επίσης φαίνεται ότι ο πολυμερισμός πραγματοποιείται και μέσω της προσθήκης ανοδικών ιονικών ζευγών ανιλίνης σε πλήρως οξειδωμένες πλευρές (πενιγρανιλίνη), της ήδη οξειδωμένης PANI. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ξεπερνώντας σε δυναμικό του 1 V, το 80% του μονομερούς είναι οξειδοανηγμενό και μετά βρίσκεται σε μία οξειδοαναγωγική ισορροπία στα +500 με +600 mV και +300 mV, όπου αντιστοιχεί σε 50% ιμινοαμίνη.

Όσον αφορά το εμφανιζόμενο βολταμογράφημα, η πρώτη οξειδοαναγωγική κορυφή που βρίσκεται σε ένα εύρος λιγότερο θετικών δυναμικών και μετατοπίζεται με τους κύκλους, ανάλογα και με την ταχύτητα σάρωσης και το είδος του ηλεκτρολύτη. Τα δυναμικά όπου εμφανίζονται οι κορυφές δεν εξαρτώνται από το υλικό του ηλεκτροδίου – εφόσον σε αυτό συμβαίνει ο πολυμερισμός. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και κατά συνέπεια οι κορυφές σταθεροποιούνται μετά από τρεις κύκλους στο λευκόχρυσο και 5 έως 8 κύκλους σε ηλεκτρόδιο άνθρακα. Το οξειδοαναγωγικό ζεύγος κορυφών εμφανίζεται και αυξάνεται συγχρόνως με τη μείωση της κορυφής του μονομερούς. Η οξείδωση του μονομερούς στο πρώτο στάδιο είναι μη αντιστρεπτή. Το πολυμερές σχηματίζεται με κυκλική βολταμετρία η οποία είναι ημιαντιστρεπτή (quasi reversible) στον άνθρακα στους πρώτους κύκλους και μη αντιστρεπτή (irreversible) στο λευκόχρυσο με έναν έντονο αναγωγικό χαρακτήρα. Μετά από μεγάλο αριθμό κύκλων η δράση γίνεται ημιαντιστρεπτή. Βεβαίως ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί και χημικά αλλά τότε η οξείδωση του μονομερούς είναι αντιστρεπτή ενώ του διμερούς μη αντιστρεπτή.

Οι ηλεκτρονικές ιδιότητες του πολυμερούς που κατασκευάζεται εξαρτώνται από την οξειδωτική κατάσταση, το επίπεδο πρόσμιξης και την υγρασία (Polymer Moisture Level). Το πάχος του φιλμ εξαρτάται από τη συγκέντρωση του μονομερούς, τον τύπο του ηλεκτροδίου και τον αριθμό των κύκλων πολυμερισμού [15].

Electrode H₂O Fe^{III} Fe^{III} H₂O₂ 2e-2PANI⁺ Fe^{IV} = O 2PANI⁰ 2H⁺

Συμμετοχή της ΡΑΝΙ στον βιοκαταλυτικό κύκλο

Σχήμα 13: Καταλυτικός Κύκλος [10]

Η μορφή του μορίου της αίμης που προκύπτει από την αντίδραση του τρισθενούς σιδήρου με το υπεροξείδιο αναφέρεται και βιβλιογραφικά ως Compound I (όπου ο σίδηρος έχει αριθμό οξείδωσης IV), ενώ η μορφή της αίμης που προκύπτει από την αναγωγή του ενζύμου πάνω στην PANI αναφέρεται ως Compound II (όπου ο σίδηρος έχει αριθμό οξείδωσης (IV) και δρα ως ενδιάμεσο για την αναγέννηση του ενζύμου όπου ο σίδηρος έχει αριθμό οξείδωσης III.

Το ένζυμο HRP, με μία ομάδα αίμης ανά μόριο, αντιδρά με H_2O_2 . Σε πρώτη φάση το υπεροξείδιο οξειδώνει το ένζυμο όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:

HRP (αρχική μορφή) + 2H₂O₂ → HRP-I (compound I) + 2H₂O	(1)
HRP-I (compound I) + $e^- \rightarrow$ HRP-II (compound II)	(2)
HRP-II (compound II)+ e⁻→ HRP (αρχική μορφή)	(3)

Ταυτόχρονα με τις αντιδράσεις παραπάνω αντιδράσεις, η οξειδωμένη μορφή της ανιλίνης λόγω των αντιδράσεων (2) και (3), ανάγεται ηλεκτροχημικά προς την ανηγμένη μορφή της ανιλίνης, πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια [6].

$$(Pani)_{ox} + 2e^{-} \rightarrow (Pani)_{red}$$

(4)

Συνεπώς, κατά τον βιοκαταλυτικό κύκλο, η PANI δρα ως διαμεσολαβητής (mediator).

Στην προηγούμενη παράγραφο, η δράση της υπεροξειδάσης περιγράφηκε πολύ συνοπτικά. Στην πραγματικότητα η παρουσία της στο βιοκαταλυτικό κύκλο είναι πιο πεπλεγμένη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 14.



Σχήμα 14: Καταλυτικά Μονοπάτια υπεροξειδασών [16]

Η οξειδωτική αφυδρογόνωση περιλαμβάνει διαδικασίες μεταφοράς φορτίου, ενός ηλεκτρονίου μεταξύ της οξο-σιδερο(IV)πορφυρίνης με ελεύθερη ρίζα (Διαδρομή 2) ή της οξοσιδερο(IV)πορφυρίνης και ποικιλίας οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων με υπεροξείδιο του υδρογόνου, οργανικά υδροϋπεροξείδια ή ανόργανα οξείδια όπως το υπεριωδικό ή το χλωριώδες, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες ηλεκτρονίων. Ο πολυμερισμός της ελεύθερων φαινολικών ριζών ή των ριζών ανιλίνης είναι ένα τέτοιο παράδειγμα. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:

$$2RH + H_2O_2 \rightarrow 2R + 2H_2O + R - R$$

Το θέμα της απενεργοποίησης των υπεροξειδασών είναι αρκετά σύνθετο, καθώς στην πραγματικότητα υπάρχει πληθώρα αντιδράσεων που μπορούν να πραγματοποιηθούν σαν αποτέλεσμα της αντίδρασης του σιδήρου στο μόριο της αίμης με το υπεροξείδιο. Το θετικό είναι ότι παρόλο που οι υπεροξειδάσες εμφανίζουν ποικίλα χαρακτηριστικά ανά κατηγορία, θα μπορούσε να προταθεί ένα ενιαίο μοντέλο για το μηχανισμό της απενεργοποίησής τους.

Ελλείψει υποστρώματος λοιπόν ή σε περίπτωση που το ένζυμο έχει εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου, οι υπεροξειδάσες εμφανίζουν την συμπεριφορά μίας "αυτοκτονικής" απενεργοποίησης. Το υπεροξείδιο έχει το ρόλο του υποστρώματος που οδηγεί σε αυτή τη συμπεριφορά το ένζυμο και το μετατρέπει από το Compound II σε μία ιδιαίτερα ενεργή ρίζα υπεροξύ-σίδηρο(III)πορφυρίνης, που ονομάζεται Compound III (Πρώτη διαδρομή, Σχήμα 14). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 13, η μορφή αυτή δε συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο. Η μορφή αυτή προκύπτει από παρατεταμένη έκθεση της προτωνιομένης μορφής Compound II σε οξειδωτικά είδη και αποδίδεται ιδιαίτερα στην ελεύθερη ρίζα υπεροξειδίωση του υπεροξειδίου από κάποια μορφή του ενζύμου.



Σχήμα 15: Μηχανισμός απενεργοποίησης υπεροξειδάσης [16]

Από τη στιγμή που δημιουργηθεί η μορφή Compound III, υπάρχουν τρεις διαφορετικές μετατροπές που μπορούν να συμβούν όπως φαίνονται στο Σχήμα 15. Αρχικά παρατηρεί κανείς ότι η ρίζα υδροϋπεροξειδίου είναι πολύ κοντά στον πορφυρικό δακτύλιο. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι από τη στιγμή που έχουν δημιουργηθεί αυτά τα τόσο ενεργά είδη θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην δομή της τετραπυρρόλης και να οξειδώσουν την πορφυρίνη (Διαδρομή 2). Δεύτερον, ο σχηματισμός Compound III ίσως επιστρέψει στη μορφή η οποία ονομάζεται ground state, είτε καταλύοντας την οξείδωση περιβάλλουσας πρωτεΐνης, είτε με τη βοήθεια υποστρώματος το οποίο μπορεί να λειτουργήσει σα δότης ηλεκτρονίου που θα επιδιορθώσει τη μορφή της πορφυρίνης. (Διαδρομές 3 και 4) [16].

Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ελεύθερο στο διάλυμα

Στην παράγραφο αυτή θα παρουσιαστούν αποτελέσματα όπου το μορφοποιημένο με PANI ηλεκτρόδιο είναι εμβαπισμένο σε διάλυμα που περιέχει το ένζυμο HRP. Η καταλυτική διεργασία θα μελετηθεί είτε με βολταμμογραφία γραμμικής σάρωσης (linear sweep voltammetry) είτε με χρονοαμπερομετρία.

Η διαδικασία κατασκευής και ελέγχου της καταλυτικής δράσης είναι μία διαδικασία πολλών σταδίων, η οποία περιλαμβάνει (α) τη σύνθεση της πολυανιλίνης στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια, (β) τον καθαρισμό του μορφοποιημένου ηλεκτροδίου από υπολείμματα μονομερούς και τον έλεγχο του, (γ) τον έλεγχο της καταλυτικής του δράσης παρουσία ενζύμου και υποστώματος (υπεροξειδίου του υδρογόνου). Κάθε στάδιο εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως τα όρια δυναμικού και η ταχύτητα σάρωσης κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό, οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος και το δυναμικό κατά τον χρονοαμπερομετρικό προσδιορισμό.

Αρχικά, επιλέχθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Πολυμερισμός για 6min με ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹
- Πολυμερισμός για 4.5 min, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs⁻¹
- Έλεγχος του αποτυπώματος του ηλεκτροδίου με κυκλική βολταμετρία σε phosphate buffer με scan rate 50mVs⁻¹
- Προσθήκη ενζύμου
- Σταθεροποίηση των ρευμάτων, διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου και γραμμική καθοδική σάρωση του δυναμικού



Σχήμα 16: Πολυμερισμός ανιλίνης με κυκλική βολταμμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, με ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹ (πάνω και κάτω αριστερά) και 20 mVs⁻¹ (πάνω δεξιά))

Στο Σχήμα 16 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό της ανιλίνης σε ηλεκτρόδιο πλατίνας. Τα διαγράμματα αποτυπώνουν τον ηλεκτροπολυμερισμό σε διαφορετικούς χρόνους, με την εικόνα κάτω να αποτυπώνει τους τελευταίους κύκλους του βολταμογραφήματος. Αυτό το οποίο παρατηρείται είναι η άμβλυνση της διαφοράς απόκρισης του ρεύματος μεταξύ των κορυφών.



Σχήμα 17: Αποτύπωμα σε phosphate ταχύτητα σάρωσης 50mVs-1

Στη συνέχεια, το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπιζόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα (απουσία ανιλίνης) και λαμβάνονταν το κυκλικό βολταμμογράφημα (βλ.Σχήμα 17). Στο Σχήμα 18 παρατηρούμε την απόκριση του ρεύματος με τις προσθήκες του H₂O₂, η οποία πραγματοποιείται στα θετικά δυναμικά και ακολουθεί γραμμικό βολταμογράφημα προς τα αρνητικά δυναμικά.



Σχήμα 18: Πάνω: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο μέχρι την σταθεροποίηση του ρεύματος, σε Phosphate buffer 200mM, pH 5.9, ταχύτητα σάρωσης 20mVs⁻¹, Κάτω: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκες H₂O₂, σε Phosphate buffer 200mM, pH 5.9, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs⁻¹

Στο Σχήμα 18 (πάνω) παρουσιάζεται η εξάρτηση του ρεύματος αναγωγής κατά την προσθήκη ενζύμου (HRP) κατά τη διάρκεια ενός πειράματος γραμμικής σάρωσης του δυναμικού από ανοδικές σε καθοδικές τιμές. Κατά την 1^η προσθήκη παρατηρείται έντονο αναγωγικό ρεύμα με μία καθοδική κορυφή περίπου στα -300 mV. Όμως, με περαιτέρω προσθήκες,

παρατηρείται μείωση των αναγωγικών ρευμάτων καθώς η συγκέντρωση του ενζύμου αυξάνεται. Μία υπόθεση θα ήταν ότι ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται στο μόριο της αίμης δημιουργώντας οξειδωτικό ρεύμα και κατά συνέπεια ένα μειούμενο αναγωγικό με τις προσθήκες ενζύμου. Δεδομένης όμως της χαμηλής περιεκτικότητας του διαλύματος σε ένζυμο, η υπόθεση αυτή δεν είναι η επικρατέστερη.

Μία άλλη υπόθεση, ίσως και επικρατέστερη, είναι ότι εφόσον πραγματοποιούνται διαδοχικοί μισοί κύκλοι το φιλμ δεν οξειδώνεται επαρκώς, δηλαδή κατά κάποιο τρόπο έχουμε μία ολοένα αναγωγή του φιλμ και μείωση των αναγωγικών ρευμάτων. Ο ρυθμός αυτής της διαδικασίας ολοένα και μειώνεται, με αποτέλεσμα κάποια στιγμή να φαίνεται ότι σταθεροποιείται.

Στο Σχήμα 18 (κάτω) παρουσιάζονται αποτελέσματα γραμμικής σάρωσης του δυναμικού σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με διαδοχικές προσθήκες υποστρώματος (H_2O_2). Προβλεπόμενο θα ήταν το ρεύμα συνεχώς να μεγαλώνει με τις προσθήκες υπεροξειδίου, ωστόσο φαίνεται να μην υπάρχει μία σταθερή τάση της μεταβολής του ρεύματος. Με την πρώτη προσθήκη το ρεύμα αυξάνεται κατά 150 μΑ από το ρεύμα που καταγράφηκε, μετά και την τέταρτη προσθήκη του ενζύμου και το αποτέλεσμα του καταλυτικού κύκλου είναι ορατό ηλεκτροχημικά. Φαίνεται όμως ότι η συνεχής αναγωγή του φιλμ χωρίς να υπάρχει αντίστοιχη οξείδωσή του συνεχίζεται. Όποτε υπάρχει ένας παράγοντας που οδηγεί στη μείωση του ρεύματος και είναι η συσσώρευση ανηγμένων ειδών στο φιλμ και η δράση του υπεροξειδίου που αναμένεται να οδηγεί στην αυξομείωση του ρεύματος. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των δύο αυτών δράσεων οδηγεί στην αυξομείωση του ρεύματος από προσθήκη σε προσθήκη υποστρώματος.

Η 2^η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται όπως και προηγουμένως με ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹, για δυναμικά μεταξύ 0 και 1200 mV.
- Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε διάλυμα που αποτελείται από 1M HCl και
 0.2M ανιλίνη.
- Το ηλεκτρόδιο που πραγματοποιείται ο πολυμερισμός είναι ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt) και έχει διάμετρο 1mm
- Πραγματοποιούνται διαδοχικές γραμμικές βολταμμετρίες σάρωσης έως το σημείο όπου τα βολταμογραφήματα σταθεροποιούνται.
- Πραγματοποιούνται δύο προσθήκες ενζύμου και τα ρεύματα μειώνονται.
- Έπειτα πραγματοποιούνται διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου. Η κάθε προσθήκη αντιστοιχεί σε 50μM, συγκέντρωση H₂O₂ στο τελικό διάλυμα



Σχήμα 19: Πάνω αριστερά: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο μέχρι την σταθεροποίηση του ρεύματος, σε Phosphate buffer 200mM, pH 5.9, scan rate: 20mVs⁻¹, . Πάνω δεξιά: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό με το χρόνο, με ανάδευση του διαλύματος Κάτω αριστερά:: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, ανά προσθήκη H2O2, Κάτω αριστερά:: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, γραμμική σάρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, ανά προσθήκη H₂O₂, Κάτω δεξιά: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, γραμμική σάρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, μετά τις προσθήκες H₂O₂

Κατά τη διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται καθοδική σάρωση του δυναμικού και περιμένουμε μέχρι τα ρεύματα να σταθεροποιηθούν. Όσο τα ρεύματα τείνουν να μειώνονται δεν είναι εφικτή η αποτίμηση της επίδρασης του H₂O₂. Τελικά τα ρεύματα σταθεροποιούνται με μέγιστη τιμή στα -55μΑ περίπου μέχρι τη στιγμή που πραγματοποιείται και η δεύτερη προσθήκη υπεροξειδίου, καθώς η πρώτη προσθήκη δε φαίνεται να γίνεται αντιληπτή. Έπειτα πραγματοποιούνται διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου. Η κάθε προσθήκη αντιστοιχεί σε 50μΜ, συγκέντρωση ενζύμου στο τελικό διάλυμα και τα ρεύματα αρχίζουν να αυξάνονται, μέχρι και την τέταρτη προσθήκη και μετά μειώνονται, πιθανώς λόγω της απενεργοποίησης του ενζύμου που οφείλεται σε υπερβολική έκθεσή του σε υπεροξείδιο (βλ.Σχήμα 19, κάτω αριστερά). Όπως φαίνεται η απόκριση, ως προς τα ρεύματα μετά την έκτη προσθήκη H₂O₂, είναι η ίδια με την πρώτη προσθήκη.

Παρατηρείται ότι μετά τις προσθήκες τα ρεύματα σε καινούριο διάλυμα φωσφορικών είναι μεγαλύτερα από κάθε άλλη φορά (Σχήμα 19 κάτω δεξιά), δηλαδή μεγαλύτερα, τόσο από τα αντίστοιχα ρεύματα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών πριν τις προσθήκες (Σχήμα 19 πάνω δεξιά), όσο και από τα καταλυτικά ρεύματα που παρουσιάστηκαν μετά τις προσθήκες. Υπενθυμίζεται ότι το μεγαλύτερο καταλυτικό ρεύμα ήταν στα -85μΑ, ενώ μετά στις προσθήκες στο νέο διάλυμα ήταν στα -270μΑ (Σχήμα 19 κάτω αριστερά και δεξιά). Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως στη θεωρία για τις υπεροξειδάσες, σε συνδυασμό με υπεροξείδιο μπορούν να οδηγήσουν σε πολυμερισμό κάποιων ουσιών, όπως είναι η φαινόλες αλλά και η ανιλίνη.

Στο Σχήμα 20 (πάνω) παρουσιάζεται ο πολυμερισμός της ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία στο ηλεκτρόδιο πλατίνας, ενώ στο Σχήμα 20 (κάτω), οι διαδοχικές προσθήκες Η₂O₂. Ομοίως με παραπάνω επιβάλλεται θετικό δυναμικό πόλωσης έως ότου μηδενιστούν τα ρεύματα, πραγματοποιείται η προσθήκη και το δυναμικό μεταβάλλεται καθοδικά.



Σχήμα 20: Πάνω: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹ Κάτω: Γραμμική βολταμμετρία σάρωσης , H₂O₂ adds, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹,Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, γραμμική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H₂O₂, σε Phosphate buffer 200mM, pH=5.9, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹

Ανά προσθήκη, η συγκέντρωση του H₂O₂, αυξάνεται κατά 50μM στο τελικό διάλυμα, ενώ το ρεύμα αυξάνεται μέχρι και την έκτη προσθήκη. Μετά την έκτη προσθήκη, το ένζυμο φαίνεται να δηλητηριάζεται και το ρεύμα ολοένα και να μειώνεται. Σημειώνεται ότι το πάχος του φιλμ ήταν πολύ μικρότερο από τις προηγούμενες μέρες, εφόσον το μέγιστο ρεύμα που καταγράφηκε ήταν ακριβώς μία τάξη μεγέθους κάτω από αυτό των προηγούμενων διαδικασιών ηλεκτροπολυμερισμού που παρουσιάστηκαν. Ακριβώς την ίδια διαφορά είχαν και τα καταλυτικά ρεύματα, δίνοντας μία ένδειξη ότι το καταλυτικό ρεύμα μπορεί να έχει μία ευθέως ανάλογη σχέση με το ρεύμα κατά τον πολυμερισμό.



Σχήμα 21: Πάνω: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, scan rate:50mVs⁻¹, Κάτω: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H₂O₂, 5^η έως 10^η προσθήκη, σε Phosphate buffer 200mM, pH=5.9, scan ταχύτητα σάρωσης:5mVs⁻¹

Αντίστοιχα πειράματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 21. Πραγματοποιείται πολυμερισμός μέχρι το ρεύμα να φτάσει τα 3mA και πραγματοποιούνται προσθήκες με ταχύτητα σάρωσης 5mVs⁻¹. Σκοπός του πειράματος ήταν κατά πρώτον να είναι μεγάλα τα ρεύματα για αυτό δημιουργήθηκε ένα αρκετά παχύ φιλμ και δεύτερον χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ταχύτητα σάρωσης για να διαχωριστούν τα ρεύματα μεταξύ τους. Επίσης η γραμμική βολταμετρία ξεκινούσε από πολύ υψηλά δυναμικά 1.2V, έναντι 800mV στα προηγούμενα πειράματα, αλλά εφόσον και η ταχύτητα σάρωσης ήταν τόσο μικρή δεν προϋπήρξε πόλωση. Εν τέλει, το ρεύμα αυξάνεται με τις προσθήκες, αλλά όχι γραμμικά και δεν υπάρχει διαφοροποίηση των ρευμάτων.

Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ακινητοποιημένο κατόπιν ηλεκτροχημικής διεργασίας

Στην παράγραφο αυτή θα παρουσιασθούν αποτελέσματα όπου το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο. Στην περίπτωση αυτή, η διαδικασία περιλαμβάνει ένα ακόμα στάδιο, αυτό της ακινητοποίησης του ενζύμου.

Η διαδικασία ηλεκτροχημικής ακινητοποίησης του ενζύμου έχει ως εξής:

- Διάλυμα 10mL συνολικά, 0.2M σε ανιλίνη και 1M σε HCl ή H₂SO₄, χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης πάνω στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με κυκλική βολταμετρία μεταξύ -100-1.1V ή 0-1.2mV και ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹.
- Το ηλεκτρόδιο κατόπιν πολώνεται στα -500mV για 20min για τον καθαρισμό του ηλεκτροδίου πολυανιλίνης που έχει πλέον σχηματιστεί, από τα χλωριόντα. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιείται buffer pH=4.
- Κατόπιν το ίδιο διάλυμα οξειδώνεται στα +600mV για 10min
- Τελικά το οξειδωμένο φιλμ πολυανιλίνης τοποθετείται σε phosphate buffer 0.2M, pH=5.6, μαζί με 1.5mg HRP και πολώνεται στα -500mV για 20min. Για να εισέλθει το ένζυμο στο ηλεκτρόδιο.
- Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με PANI, ηλεκτροδίου Pt με προσθήκη H₂O₂ για εφαρμοζόμενο δυναμικό -100mV, -200mV, -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 0.2M, pH=5
- Κατόπιν γίνονται διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου και γίνεται έλεγχος της απόκρισης, είτε κυκλικά, είτε με πόλωση.

Μετά τον πολυμερισμό το ηλεκτρόδιο απομακρύνεται από το διάλυμα ανιλίνηςυδροχλωρίου και τοποθετείται σε διάλυμα καθαρού HCl 1M και συνεχίζεται η διαδικασία της κυκλικής βολταμετρίας στα ίδια όρια δυναμικού με αυτά που χρησιμοποιούνταν και για τον πολυμερισμό. Σκοπός είναι να συνεχιστεί η διαδικασία του πολυμερισμού σε περίπτωση που έχουν εγκλωβιστεί κάποια μονομερή στο φιλμ, τα οποία μπορεί να φράσουν τους πόρους του, χωρίς να ανήκουν στο φιλμ. Πράγματι τα ρεύματα μεγαλώνουν, όπως φαίνεται στο Σχήμα 22, αλλά αυτό που επιπλέον παρατηρείται είναι ότι η κορυφή στα 300mV και στα 800mV, ολοένα και μειώνεται, ενώ αντίθετα η κορυφή που αντιστοιχεί στα 600mV αυξάνεται. Η κορυφή αυτή ανήκει στην πιο αγώγιμη μορφή της ανιλίνης της εμεραλδίνης αντίθετα η υπεροξειδωμένη μορφή που είναι η νιγρανιλίνη φαίνεται να εξαφανίζεται και η λευκοεμεραλδίνη μειώνεται επίσης.


Σχήμα 22:Πάνω αριστερά: σταθεροποίηση φιλμ PANI σε HCl 1M, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹, Πάνω δεξιά: σταθεροποίση Pani σε Phosphate Buffer 0.2M, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹, Κάτω αριστερά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H2O2 για εφαρμοζόμενο δυναμικό -100mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5, Κάτω δεξιά: Εξάρτηση Ρεύματος από συγκέντρωση H₂O₂ για τροποποιημένου ηλεκτρόδιο Pt με Pani για εφαρμοζόμενο δυναμικό -100mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, τα ρεύματα αυξάνονται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου, τουλάχιστον για εύρος συγκεντρώσεων από 0 έως 400μΜ.

Το ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε phosphate buffer 0.2M μετά τη χρήση και παρατηρείται ότι τα ρεύματα είναι μικρότερα κατά 100μΑ, σε σχέση με αυτά πριν τη χρήση.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα όταν τοποθετηθεί το ηλεκτρόδιο σε HCl, φαίνεται πως κάποια μονομερή που δημιουργήθηκαν από τις οξειδοαναγωγές και παρέμειναν μέσα στο φιλμ, τελικά πολυμερίζονται, και πάλι όμως τα ρεύματα δε φτάνουν αυτά πριν τη χρήση, καθώς έχουν μειωθεί κατά 1mA.



Σχήμα 23: Κυκλική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο PANI, σε διάλυμα HCl 1M

Στο Σχήμα 24 παρουσιάζεται ο πολυμερισμός της ανιλίνης σε διάλυμα θειικού οξέος 1M, καθώς και το χρονοαμπερογράφημα με διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου του υδρογόνο,

50μΜ ανά προσθήκη. Παρατηρείται ότι η εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου εμφανίζει ικανοποιητική γραμμικότητα έως τα 350μΜ.



Σχήμα 24: Πάνω αριστερά: Πολυμερισμός Pt-Pani film, σε H₂SO₄=1M, Πάνω δεξιά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H₂O₂ σε phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5, Κάτω: Εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του H₂O₂

Στο Σχήμα 25 παρουσιάζεται ο πολυμερισμός της ανιλίνης σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 1Μ, καθώς και το χρονοαμπερογράφημα με διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου του υδρογόνο, 50μΜ ανά προσθήκη. Παρατηρείται ότι η εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου εμφανίζει ικανοποιητική γραμμικότητα έως τα 300μΜ.





Σχήμα 25: Πάνω αριστερά:Πολυμερισμός ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη,d=1mm, scan rate:50mVs, range 1mA, 1M HCl, 0.2M ανιλίνη Πάνω δεξιά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H₂O₂ σε phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5, Κάτω: Εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του H₂O₂

Το ηλεκτρόδιο πολώνεται στα -300mV πραγματοποιούνται 7 προσθήκες των 50μM, η καθεμία εκ των οποίων οι πέντε είναι γραμμικές. Γραμμική συμπεριφορά υπάρχει μέχρι τα 300μM.

Αντίστοιχη διαδικασία με την παραπάνω, αλλά χρονοαμπερομετρία στα-200mV, δείχνει τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 26.





τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H₂O₂ σε phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5, Κάτω: Εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του H₂O₂

Το ηλεκτρόδιο παρουσίασε γραμμική συμπεριφορά έως συγκέντρωση H₂O₂, ίση με 250μΜ.

Βιοηλεκτροκατάλυση με ηλεκτρόδιο πολυανιλίνης και ένζυμο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια με Nafion

Το Nafion είναι ένα συμπολυμερές φθοροπολυμερούς με βάση σουλφωνομένο τετραφθοροαιθυλένιο που ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκατίας του 1960. Είναι η πρώτη από μία κατηγορία συνθετικών πολυμερών με ιοντικές ιδιότητες που ονομάζονται ιοντομερή. Το Nafion αποτελείται από ένα σκελετό τετραφθοροαιθυλενίου, που αποτελείται από ομάδες υπερφθοροβινυλαιθέρα οι οποίες τερματίζονται από σουλφονικές ομάδες. Το Nafion παρουσιάζει εξαιρετική θερμική και μηχανική σταθερότητα. Εφόσον έχει δημιουργηθεί μεμβράνη από Nafion, οι πόροι επιτέπουν την κίνηση κατιόντων, αλλά όχι ανιόντων και ηλεκτρονίων.



Σχήμα 27 :Χημικός Τύπος του Nafion

Για τη διεξαγωγή αυτής της σειράς πειραμάτων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο εμβαδού 1cm². Πρόκειται για επιπλατινωμένο τιτάνιο, σε σχήμα πλάκας, που η μία του πλευρά είναι επιπλατινωμένη, ενώ η άλλη είναι καλυμμένη με σιλικόνη
- Ο πολυμερισμός γίνεται όπως στο ίδιο διάλυμα όπως και στα προηγούμενα πειράματα, όμως με δυναμικό σάρωσης -100 έως 1.1mV
- Το ηλεκτρόδιο μετά τον πολυμερισμό αφήνεται να στεγνώσει
- Κατόπιν με χρήση πιπέτας, καλύπτεται με πυκνό διάλυμα ενζύμου και αφήνεται να στεγνώσει
- Έπειτα καλύπτεται με διάλυμα Nafion και αφήνεται να στεγνώσει
- Τοποθετείται σε Phosphate buffer 200mM
- Το ηλεκτρόδιο πολώνεται στα -200 με -300mV
- Πραγματοποιούνται διαδοχικές προσθήκες Η₂O₂, ανά 50μM στο τελικό διάλυμα



Σχήμα 28: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1Μ HCl 0.2M ανιλίνη, ταχύτητα σάρωσης:50mVs⁻¹

Στην Σχήμα 28 παρουσιάζεται ο πολυμερισμός στο επιπλατινωμένο ηλεκτρόδιο. Πραγματοποιούνται δεκαοχτώ κύκλοι για τον πολυμερισμό. Στόχος είναι να καλυφθεί όλη η επιφάνεια με στρώμα το οποίο να είναι λεπτό και να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή ομοιογένεια σε πάχος, έτσι ώστε και το ένζυμο να απλωθεί ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια. Σημειώνεται ότι στο μικρό ηλεκτρόδιο όταν πολυμεριζόταν για περισσότερους από 10 με 15 κύκλους, δημιουργούνταν μία καμπύλη επιφάνεια στο ηλεκτρόδιο η οποία ήταν πιο παχιά στο κέντρο. Σε αυτή την περίπτωση το ένζυμο δεν κάλυπτε ομοιόμορφα το ηλεκτρόδιο και συγκεντρωνόταν περισσότερο στις άκρες του ηλεκτροδίου, ενώ μερικές φορές φαινόταν και σα να μην είχε ακινητοποιηθεί καθόλου ένζυμο. Για το λόγω αυτό όταν το ένζυμο ακινητοποιείται με Nafion και όχι ηλεκτροχημικά, προτιμάται η δημιουργία λεπτού φιλμ.



Σχήμα 29: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H2O2, 5^η έως 10^η προσθήκη, η 10^η διπλή σε Phosphate buffer 200mM, pH=5.9, ταχύτητα σάρωσης:10mVs⁻¹

Στο Σχήμα 29 μπορεί κανείς να παρατηρήσει τις μεταβολές στο ρεύμα για τις τελευταίες πέντε από δέκα συνολικά προσθήκες υπεροξειδίου εκ των οποίων η τελευταία ήταν 100μΜ, αντί για 50μΜ που ήταν οι υπόλοιπες. Οι μεταβολές αν και ξεκάθαρες δεν είναι γραμμικές. Σημειώνεται ότι η προσθήκη πραγματοποιείται κάθε φορά, από κύκλο σε κύκλο σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, στα 450mV.



Σχήμα 30: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H₂O₂, 11^η έως 14^η προσθήκη, σε Phosphate buffer 200mM, pH=5.9, ταχύτητα σάρωσης:10mVs⁻¹

Στο ίδιο διάλυμα οι προσθήκες συνεχίζονται και τα ρεύματα μεγαλώνουν από την 11^η, έως και την 14^η προσθήκη, Σχήμα 30. Υπάρχει ένδειξη ότι το ρεύμα αυξάνεται γραμμικά ανά προσθήκη.

Η επίδραση του πάχους του φιλμ PANI, μπορεί να διευρευνηθεί, σχηματίζοντας ένα λεπτότερο στρώμα όπως φαίνεται στο Σχήμα 31, όπου έχουν πραγματοποιηθεί μόνο δέκα κύκλοι πολυμερισμού.



Σχήμα 31: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹, 1M HCl, 0.2M ανιλίνη



Σχήμα 32: Πάνω αριστερά:Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H2O2, σε Phosphate buffer 200mM, pH=5.9, Πάνω δεξιά: Το προηγούμενο σχήμα σε μεγέθυνση, Κάτω: Εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του H2O2

V vs Ag/AgCI

= 0.924

Πραγματοποιούνται δέκα προσθήκες υπεροξειδίου και οι μεταβολές του ρεύματος είναι ιδιαίτερα ορατές κάτω από τα 300mV, ενώ φαίνονται και γραμμικά ανάλογες της συγκέντρωσης του H₂O₂ στο διάλυμα. Η απόκριση είναι γραμμική μέχρι τη συγκέντρωση των 800μM.

Η επίδραση της επιφάνειας μπορεί να διερευνηθεί χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρόδιο εμβαδου 1.8cm². Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Διάλυμα 10mL συνολικά, 0.2M σε ανιλίνη και 0.8M σε HCl, χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης πάνω στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με κυκλική βολταμετρία μεταξύ -100-1.1V και ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹ για του πρώτους κύκλους και μετά έως τα 900mV.
- Το ηλεκτρόδιο αφήνεται να στεγνώνει

65

- Επικαλύπτεται με πυκνό διάλυμα ενζύμου και αφήνεται να στεγνώσει
- Επικαλύπτεται με διάλυμα Nafion και αφήνεται να στεγνώσει
- Το τροποποιημένο με PANI ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε ηλεκτροχημικό κελί σε phosphate buffer 0.2M



Σχήμα 33: Πάνω αριστερά: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, 8 κύκλοι, Πάνω δεξιά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H₂O₂ για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9, Κάτω: Εξάρτηση Ρεύματος από συγκέντρωση H₂O₂ για τροποποιημένου ηλεκτρόδιο Pt με Pani για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9

Γενικά πρέπει έστω και ο πρώτος κύκλος να φτάσει μέχρι τα 1.1mV, για να δημιουργηθούν κάποιες κατιονικές ρίζες για τον πολυμερισμό του ηλεκτροδίου, ενώ μετά μπορεί και να συνεχίσει σε μικρότερα δυναμικά γιατί ο μηχανισμός πολυμερισμού της ανιλίνης είναι αυτοκαταλυτικός. Υπάρχει επίσης η άποψη ότι αν ο πολυμερισμός συνεχιστεί σε υψηλά δυναμικά, όχι μόνο δε βοηθάει, αλλά μπορεί και να υποβαθμίσει το φιλμ. Μπορεί να το υπεροξειδώσει με αποτέλεσμα τμήματα της αλυσίδας του πολυμερούς να υδρολύονται και να δίνουν βενζοκινόνη στα θετικά δυναμικά που εγκλωβίζονται στο φιλμ. Επίσης μεταβάλλεται η αγωγιμότητα και η ηλεκτροχημική δραστικότητα της PANI. Η απόκριση είναι γραμμική μέχρι συγκέντρωση 500μΜ.

Μία επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας, οδηγεί στα αποτελέσματα του Σχήμα 34.



Σχήμα 34:Αριστερά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H2O2 για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9, 5 τελευταίες από 13 συνολικά προσθήκες, 50μM η καθεμία, Δεξιά: Εξάρτηση Ρεύματος από συγκέντρωση H₂O₂ για τροποποιημένου ηλεκτρόδιο Pt με Pani για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9, 5 τελευταίες από 12 συνολικά προσθήκες, 50μM η καθεμία

Όπως φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα, το ηλεκτρόδιο παρουσιάζει ικανοποιητική γραμμική απόκριση και μέχρι συγκέντρωση 550μΜ.

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι η ακινητοποίηση του ενζύμου σε Nafion λειτουργεί ικανοποιητικά, όταν το φιλμ της πολυανιλίνης είναι επαρκώς λεπτό. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκε λεπτό φιλμ πολυανιλίνης σε ηλεκτρόδιο Pt, επιφάνειας 0.078cm². Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

- Διάλυμα 10mL συνολικά, 0.2M σε ανιλίνη και 0.8M σε HCl, χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης πάνω στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με κυκλική βολταμετρία μεταξύ -100-1.1V και ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹.
- Το ηλεκτρόδιο αφήνεται να στεγνώνει
- Επικαλύπτεται με πυκνό διάλυμα ενζύμου και αφήνεται να στεγνώσει
- Επικαλύπτεται με διάλυμα nafion και αφήνεται να στεγνώσει
- Το τροποποιημένο με Pani και HRP ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας σε ηλεκτροχημικό κελί, σε phosphate buffer 0.2M. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ως αντίθετο ένα ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα.
- Με κυκλική βολταμετρία μελετάται η εξάρτηση του ρεύματος από το δυναμικό και αναμένεται να σταθεροποιηθεί η μεταξύ τους εξάρτηση πριν την προσθήκη H₂O₂
- Χρονοαμπερομετρικά μετράται η απόκριση ρεύματος με διαδοχικές προσθήκες H₂O₂



Σχήμα 35: Αριστερά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H2O2 για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9, προσθήκες, 50μM η καθεμία, Δεξιά: Εξάρτηση Ρεύματος από συγκέντρωση H₂O₂ για τροποποιημένου ηλεκτρόδιο Pt με Pani

για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.9, 5 τελευταίες από 12 συνολικά προσθήκες, 50μM η καθεμία

Η χρονοαμπερομετρική απόκριση σε ένα μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο με ακινητοποιημένο ένζυμο όπου ο πολυμερισμός της ανιλίνης έγινε σε όρια δυναμικού από -100 έως 1100mV, παρουσιάζεται στο Σχήμα 36. Παρατηρείται ότι η απόκριση εμφανίζει ικανοποιητική γραμμικότητα και σε αυτή την περίπτωση και για συγκέντρωση έως 600μM.



Σχήμα 36: Αριστερά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H₂O₂ για εφαρμοζόμενο δυναμικό -500mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.3, 11 προσθήκες σε νέο διάλυμα, 50μM η καθεμία, Δεξιά: Εξάρτηση Ρεύματος από συγκέντρωση H₂O₂ για τροποποιημένου ηλεκτρόδιο Pt με Pani για εφαρμοζόμενο δυναμικό -500mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=5.3, 7 τελευταίες από 11 συνολικά προσθήκες, 50μM η καθεμία

Ακολουθώντας αντίστοιχη διαδικασία, αλλά εκτελώντας τη χρονοαμπερομετρική μέτρηση στα -200mV, προκύπτει η απόκριση που παρουσιάζεται στο Σχήμα 37.



Σχήμα 37: Αριστερά: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου με Pani ηλεκτροδίου με προσθήκη H2O2 για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs Ag/AgCl, phosphate buffer με συγκέντρωση 200mM, pH=6, Δεξιά: προσθήκες, 100μM η καθεμία

Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε γραμμικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων έως 1mM.

Σε buffer διάλυμα έχουν πραγματοποιηθεί δώδεκα προσθήκες H_2O_2 και στο ίδιο διάλυμα πραγματοποιούνται διαδοχικοί κύκλοι με ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹ αφού πρώτα πολωθεί το σύστημα στα 800 περίπου mV, για διαφορετικού χρόνους και παρατηρείται ότι με αύξηση του χρόνου πόλωσης αυξάνονται τα αναγωγικά ρεύματα. Οι ακριβείς χρόνοι και τα δυναμικά πόλωσης έχουν ως εξής:

- Πόλωση για 30sec με δυναμικό πόλωσης 787mV
- Πόλωση για 60sec με δυναμικό πόλωσης 784mV
- Πόλωση για 90sec με δυναμικό πόλωσης 796mV
- Πόλωση για 120sec με δυναμικό πόλωσης 790mV
- Πόλωση για 300sec με δυναμικό πόλωσης 783mV



Σχήμα 38: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Κυκλική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Pt με Pani, σε Phosphate buffer 200mM, pH=5, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹, είχαν γίνει ήδη 12 προσθήκες H₂O₂, 50μM η κάθε προσθήκη, πόλωση στα +800mV για κάποιο χρόνο

Κατόπιν πραγματοποιείται πόλωση από τα -500mV, έως τα 1500mV, και παρατηρούνται τα εξής: Τα ρεύματα ολοένα και μεγαλώνουν μέχρι που σιγά σιγά σταθεροποιούνται. Κατόπιν πραγματοποιείται η διαδικασία σε διάλυμα όπου δεν περιέχεται υπεροξείδιο και τα αναγωγικά ρεύματα είναι ακόμη μεγαλύτερα. Αυτό ίσως σημαίνει πως το υπεροξείδιο οξειδώνει εν μέρει το φιλμ σε εκείνα τα δυναμικά, οδηγώντας σε μείωση των αναγωγικών ρευμάτων. Όμοια μεγαλύτερα είναι και τα αναγωγικά στην περίπτωση που δεν υπάρχει υπεροξείδιο στο διάλυμα.



Σχήμα 39: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Κυκλική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Pt με Pani, σε Phosphate buffer 200mM, after 12 adds H₂O₂, pH=5, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹, ρεύματα ολοένα και μεγαλύτερα



Σχήμα 40: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Κυκλική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Pt με Pani, σε Phosphate buffer 200mM, after 12 adds H_2O_2 , pH=5, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹, ρεύματα ολοένα και μεγαλύτερα, final cycle



Σχήμα 41: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Κυκλική βολταμετρία για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Pt με Pani, σε Phosphate buffer 200mM, new solution, pH=5, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹

Από τα παραπάνω μπορούν να διαξαχθούν τα εξής συμπεράσματα: Η μείωση των ρευμάτων μπορεί να εξαρτάται από τη μη επαρκή αναγωγή του φιλμ. Η αύξηση της απόκρισης είναι ανάλογη του χρόνου πόλωσης. Ισοδύναμα η οξείδωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με κυκλική βολταμετρία έως πολύ μεγάλο θετικό όριο δυναμικού. Κατά αυτόν τον τρόπο εμφανίζεται ένα οξειδοαναγωγικό ζεύγος, το οποίο υποδηλώνει ημιαντιστρεπτή αντίδραση. Τα ρεύματα φθάνουν μέχρι το 1mA.

Μετά τοποθετείται σε νέο διάλυμα των ηλεκτροδίων και διαπιστώνεται ότι τα ρεύματα είναι ακόμη μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά μετά την οξείδωση στο διάλυμα που περιείχε H_2O_2 . Αν το φαινόμενο αυτό οφειλόταν σε πολυμερισμό των μονομερών του φιλμ λόγω του υπεροξειδίου και του ενζύμου θα έπρεπε το φαινόμενο της αύξησης του ρεύματος μέχρι τα 1.5mA, να παρατηρούνταν και στο διάλυμα με το υπεροξείδιο μετά της προσθήκες, που όμως σταθεροποιήθηκε στα 1mA.Επομένως ανεξάρτητα από το αν συμβαίνει και πολυμερισμός των μονομερών, το βέβαιο είναι ότι υπάρχει και κάποια αντίδραση που δρα ανταγωνιστικά στην αύξηση του ρεύματος και αυτή είναι μάλλον η οξείδωση του υπεροξειδίου πάνω στο φιλμ, στα καθοδικά ρεύματα.

Κεφάλαιο 3

Το κυανό του μεθυλενίου ως διαμεσολαβητής (mediator)

Ιδιότητες, χρήσεις και σύνθεση

Το κυανό του μεθυλενίου (methylene blue), μαζί με μία πληθώρα άλλων οξειδοαναγωγικών χρωστικών, όπως το πράσινο του μεθυλενίου (methylene green) και το κυανό του κρεζυλίου (cresyl blue), χρησιμοποιούνται ως δότες και δέκτες ηλεκτρονίων για την κατασκευή ενζυμικών ηλεκτροδίων. Μεταξύ αυτών δε, το κυανό του μεθυλενίου (MB) ξεχωρίζει καθώς το σχηματιζόμενο πολυμερές είναι ένα υλικό υψηλής σταθερότητας. Η άμεση οξειδοαναγωγή ενζύμων και *πρωτεϊνών* σε ακάλυπτο (μη μορφοποιημένο) ηλεκτρόδιο, όπως για παράδειγμα το ηλεκτρόδιο πλατίνας, έχει δοκιμαστεί, αλλά πολλές φορές οι μεγάλες πρωτεΐνες έχουν την τάση να προσροφώνται μη αντιστρεπτά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και να οδηγούν στην παθητικοποίησή του. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η ύπαρξη κάποιου ενδιάμεσου διαύλου μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου το πολυμερές αντιδρά άμεσα με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.



Σχήμα 42:Προτεινόμενος μηχανισμός πολυμερισμού του MB [17]



Σχήμα 43: Μηχανισμός οξειδοαναγωγής πολυμερισμένου φιλμ ΜΒ [17]

Το MB μεταξύ των άλλων χρωστικών, φαίνεται πως πολυμερίζεται μέσω πυρηνόφιλων αντιδράσεων σε διαλύματα ουδέτερου έως βασικού pH, καθώς μόνο τότε το πολυμερές που σχηματίζεται είναι ηλεκτρικά αγώγιμο. Όσον αφορά τον πολυμερισμό έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός του αυξάνεται με την αύξηση του pH. Ο μηχανισμός πολυμερισμού του MB παρουσιάζεται στο Σχήμα 42.

Όσον αφορά το υλικό του ηλεκτροδίου και αυτό παίζει ρόλο στον τελικό πολυμερές που σχηματίζεται με βασική διαφορά όχι τόσο στη μορφολογία αλλά τις μετέπειτα ηλεκτροχημικές ιδιότητες. Ο μηχανισμός οξειδοαναγωγής του αγώγιμου πολυμερούς του MB παρουσιάζεται στο Σχήμα 43. [17]

Τα δυναμικά στα οποία συμβαίνει πολυμερισμός του MB είναι από -400 έως 1100mV ως προς Ag/AgCl και το pH όπου συνήθως πραγματοποιείται ο πολυμερισμός είναι από 2 έως 8. Τα ρεύματα τόσο των ανοδικών όσο και των καθοδικών καθοδικών κορυφών είναι ανάλογα της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης, για ταχύτητες σάρωσης από 25 έως 600mV/s. Από την άλλη, τα δυναμικά στα οποία εμφανίζονται οι κορυφές είναι ανεξάρτητα των scan rates.

Με την έναρξη του πολυμερισμού το κυκλικό βολταμογράφημα μεταβάλλεται και από εκεί που δεν υπάρχει καμία κορυφή, νέες οξειδοαναγωγικές κορυφές εμφανίζονται και αυξάνονται σε ένταση με αύξηση των κύκλων, επομένως αυτές οι κορυφές δεν αποδίδονται πλέον στο μονομερές αλλά στο πολυμερές. Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί στον τομέα των πολυμερισμένων ημιαγώγιμων φιλμ, θεωρείται ότι ιδιαίτερα όταν οι κορυφές είναι πεπλατισμένες, τότε το αποτύπωμά τους αυτό οφείλεται στο πολυμερές και όχι στο μονομερές.

Ένας παράγοντας που σύμφωνα με μελέτες παίζει ρόλο στην τελική μορφολογία του φιλμ είναι το ανώτερο θετικό δυναμικό που επιλέγεται κατά τον πολυμερισμό. Για παράδειγμα για φιλμ του MB τα οποία παρήχθησαν σε δυναμικά έως 900 με 950 mV, παρουσιάζουν μία καλά διατεταγμένη και λεία επιφάνεια. Τα φιλμ αυτά εμφανίζουν μία μόνο κορυφή, αυτή του πολυμερούς. Όταν το άνω θετικό όριο ξεπερνά τα 1000mV, τότε εμφανίζονται δύο κορυφές, η μία αντιστοιχεί στο μονομερές και η άλλη στο πολυμερές. Όσον αφορά τη μορφολογία, σε αυτήν την περίπτωση δημιουργείται ένα τραχύ πολυμερές. [18]



Σχήμα 44:(3μm x 3μm) noncontact mode AFM images of Au (111) electrode modified with poly(MB) films prepared by thirty potentiodynamic scans between -275mV and different potentials of (a)900, (b)950, (c)1100mV in 0.1M borate buffer solution (pH 9.0) containing 0.1mM MB [18]

Κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό με κυκλική βολταμετρία εμφανίζονται δύο ζεύγη οξειδοαναγωγικών κορυφών. Αυτές οι οποίες εμφανίζονται στα αρνητικά δυναμικά συνδέονται μάλλον με το μονομερές ενώ αυτές οι οποίες βρίσκονται στα θετικά συνδέονται με το πολυμερές. Διάφορες τεχνικές έχουν δοκιμαστεί για την εξάλειψη των κορυφών που αντιστοιχούν στο μονομερές, από απλό ξέπλυμα με δις απιονισμένο νερό έως και την παραμονή του ηλεκτροδίου για ορισμένη ώρα σε σύστημα υπερήχων. Φαίνεται όμως ότι με κάποιο τρόπο μονομερή απομακρύνονται δύσκολα, παραμένοντας, με κάποιο τρόπο συζευγμένα με το φιλμ.

Για να χαρακτηριστεί ο ηλεκτροπολυμερισμός του MB, μελετάται η εξάρτηση του πολυμερούς από το δυναμικό οξείδωσης και επίσης επιχειρείται να συσχετιστεί το πάχος του φιλμ με το φορτίο που έχει περάσει από το ηλεκτρολυτικό κελί. Σε γενικές γραμμές, ο πολυμερισμός του φιλμ είναι αποτέλεσμα ηλεκτρικής οξείδωσης και πρέπει να συνδέεται και με κάποιες παράλληλες αντιδράσεις και αυτό γιατί φαίνεται πως η ποσότητα του σχηματιζόμενου πολυμερούς, βρέθηκε να μη συνδέεται άμεσα με το ρεύμα οξείδωσης του μονομερούς. Για το λόγο αυτό το ρεύμα του αρνητικού οξειδοαναγωγικού ζεύγους χρησιμοποιείται συχνά για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του πάχους το ενεργού φιλμ. Αντίθετα, η θετική ανοδική κορυφή βρέθηκε να είναι το πιο σταθερό και αναπαραγωγίσιμο χαρακτηριστικό του βολταμογραφήματος. Επομένως, τα χαρακτηριστικά της ανοδικής

Όσον αφορά το pH του πολυμερισμού, αυτός δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε pH μικρότερο του 6. Ωστόσο για pH>12, παρόλο που το φιλμ φαίνεται να πολυμερίζεται και το αποτύπωμα είναι ίδιο με το pH 6, στην πράξη προκύπτει ένας εκφυλισμός των ηλεκτροχημικών του ιδιοτήτων.

Μετά τον πολυμερισμό, το φιλμ του πολυμερούς έχει καλή ηλεκτροχημική δραστηριότητα για pH από 2 έως 8. Ο ρυθμός πολυμερισμού αυξάνεται με την αύξηση του pH από τα ουδέτερα μέχρι και τα βασικά. Το γεγονός αυτό είναι αξιόλογο καθώς τα περισσότερα υλικά πολυμερίζονται κατά κύριο λόγο σε όξινα pH. Ιδιαίτερο γεγονός είναι το κατά πόσο τα ανιόντα υπεροξειδίου (OH⁻), μπορούν τελικά να επιδράσουν στην αύξηση του πολυμερισμού. Τα ανιόντα αυτά είναι ισχυρά πυρηνόφιλα αντιδραστήρια. Επιπλέον μπορούν να λειτουργήσουν ως μέσο θωράκισης και να αποφορτίσουν το πολυμερές του MB και από θετικό να το μετατρέψουν σε ουδέτερο.

Στην περίπτωση του MB, ο φέρων ηλεκτρολύτης ή το ρυθμιτικό διάλυμα δεν επιδρούν στο ρυθμό ανάπτυξης του πολυμερούς, εφόσον αποτελούνται από τα εξής ανιόντα, Cl⁻ και SO₄²⁻, παρόλο που το αποτύπωμα κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό διαφέρει, καθώς αποτελείται από μία κορυφή. Από την άλλη τα ClO₄⁻ και BF₄⁻, δημιουργούν ισχυρούς ιονικούς δεσμούς με το MB⁺. Έχουν δοκιμαστεί πολλοί πυρηνόφιλοι φορείς και έχει δοκιμαστεί αν προσομοιάζουν την επίδραση των ανιόντων υπεροξειδίου. Μεταξύ άλλων έχει δοκιμαστεί το σουλφίδιο SO₃²⁻, η σχέση της συγκέντρωσής του με την αύξηση του πολυμερούς, βρέθηκε να είναι υπερβολή, μέχρι να ξεπεράσει τα 10⁻²M, όπου υπάρχει η μέγιστη καταλυτική επίδραση. Όμοια λειτουργεί και το NO₃⁻ και λειτουργεί ως φορέας θωράκισης. Καταλυτικά η λειτουργία του είναι όμοια, απλώς μικρότερη από του σουλφιδίου. Είναι αξιοσημείωτο ότι και υπό την παρουσία πυρηνόφιλου μέσου, ο ρυθμός πολυμερισμού δεν είναι ο ίδιος όπως σε βασικό μέσο. Πάντως και η πυρηνόφιλη προσθήκη και η θωράκιση επιδρούν θετικά στον πολυμερισμό του MB. Ακόμη και η επίδραση και των δύο παραγόντων είναι μικρότερη όταν πραγματοποιείται από άλλα ανιόντα και όχι το OH⁻. [19]

Το πολυμερισμένο MB έχει καλές ηλεκτροχημικές ιδιότητες για pH μεταξύ 2 και 8 και το δυναμικό όπου εμφανίζονται οι κορυφές είναι ανεξάρτητο της ταχύτητας σάρωσης, scan rate. Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του πολυμερισμένου MB εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των πρωτονίων. Τα πρωτόνια περνούν στο φιλμ, ήδη κατά τον πολυμερισμό, στη φάση της οξείδωσης και λειτουργούν ενάντια στην αναγωγή. Για pH από 2 έως 5, με την αύξηση του pH, τα δυναμικά όπου εμφανίζονται οι κορυφές μετατοπίζονται προς τα αρνητικά, και τα αναγωγικά ρεύματα των κορυφών μειώνονται. Για pH=6, υπάρχει πλέον μία μόνο κορυφή. Όταν το pH του διαλύματος φτάσει το 7 και το 8, οι κορυφές εξαφανίζονται. Όλα αυτά ισχύουν για φιλμ πολυμερισμένο σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα. Για φιλμ πολυμερισμένο σε λευκόχρυσο, για pH=7 και 8 τα peaks εμφανίζονται στα ίδια περίπου δυναμικά όπως στο pH=2 (αντίστοιχα και τα ρεύματα), ενώ από αυτό το pH και πάνω σταθεροποιούνται.

Συμμετοχή του ΜΒ στον ηλεκτρολυτικό κύκλο

Η συμμετοχή του MB στον ηλεκτροκαταλυτικό κύκλο, φαίνεται στον παρακάτω καταλυτικό σενάριο. Κατά το πρώτο στάδιο, το υπεροξείδιο ανάγεται προς νερό, ενώ η HRP οξειδώνεται προς HRP-I.

 $H_2O_2 + HRP \rightarrow H_2O + HRP-I$

Κατά το 2° στάδιο, η οξειδωμένη μορφή HRP-I ανάγεται από την ανηγμένη μορφή του MB προς HRP-II με ταυτόχρονη οξείδωση του MB στην οξειδωμένη του μορφή.

 $HRP-I + (MB)_{red} \rightarrow HRP-II + (MB)_{OX}$

Η HRP-II ανάγεται προς HRP από ένα δεύτερο μόριο ανηγμένου MB, κατά το 4° στάδιο.

 $HRP-II + (MB)_{red} \rightarrow HRP+(MB)_{OX}$

Ταυτόχρονα με τα στάδια 3 και 4, η οξειδωμένη μορφή του MB ανάγεται ηλεκτροχημικά προς την ανηγμένη μορφή του MB, πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια.

 $(MB)_{OX} + 2e \rightarrow (MB)_{red}$

Η ανακύκλωση του MB στο ηλεκτρόδιο οδηγεί σε αύξηση του αναγωγικού ρεύματος, καθώς το MB δρα ως διαμεσολαβητής.

Για να μετρηθεί η απόκριση στο υπεροξείδιο, χαράσσονται διαγράμματα μεταξύ της απόκρισης του ρεύματος για συγκεκριμένη προσθήκη υπεροξειδίου σε διαφορετικές οξύτητες του ρυθμιστικού διαλύματος.



Σχήμα 45: Απόκριση Ρεύματος πολυμερισμένου φιλμ με HRP, σε σχέση με το δυναμικό για διάλυμα phosphate buffer pH=7, το οποίο περιέχει 0.91mmol/L H₂O₂ [20]

Στο Σχήμα 45 παρουσιάζεται η απόκριση του ρεύματος ηλεκτροδίου τροποποιημένου με MB. Εντός αυτού του εύρους δυναμικών, είναι και τα δυναμικά στα οποία επιλέγεται να λειτουργήσει το ηλεκτρόδιο. Όσον αφόρα το pH του διαλύματος Σχήμα 46, φαίνεται ότι για pH από 5 έως 7 λειτουργεί αποτελεσματικά, ενώ για pH μετά το 7, η απόδοση πέφτει πάρα πολύ απότομα. Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέγεται acetate buffer με pH = 5.



Σχήμα 46:Επίδραση του pH στην καταλυτική απόκριση ρεύματος σε phosphate buffer που περιέχει 0.48mM H₂O₂ [20]

Βιοηλεκτροκατάλυση με τροποποιημένο ηλεκτρόδιο κυανού του μεθυλενίου

Η μορφοποίηση του ηλεκτροδίου με πολυμερές κυανού του μεθυλενίου γίνεται ως εξής: ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα εμβαπτίζεται σε διάλυμα MB συγκέντρωσης 2.5x10⁻⁴M. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 9.14 με χρήση 20mM ρυθμιστικού διαλύματος βορικού (borate buffer). Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιείται 0.1M KCI. Το δυναμικό σαρώνεται κυκλικά από -400 έως 1200 mV με ταχύτητα σάρωσης 50mV/s. Έπειτα το ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (pH=5), με φέρων ηλεκτρολύτη 0.1M KCI και λαμβάνεται το αποτύπωμα του ηλεκτροδίου χωρίςτην επίδραση του ενζύμου και του υπεροξειδίου. Η ταχύτητα σάρωσης που χρησιμοποιείται στα περισσότερα πειράματα είναι 20mVs⁻¹.

Μετά από κάθε χρήση το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα καθαρίζεται με διαμαντόπαστα, ξεπλένεται με δις απιονισμένο νερό και τοποθετείται σε σύστημα υπερήχων.

Στα παρακάτω σχήματα παρατηρούνται χαρακτηριστικά παραδείγματα ηλεκτροπολυμερισμού του Methylene Blue (MB) σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών 20mM και τα αντίστοιχα αποτυπώματά τους σε ρυθμιστικό διάλυμα ακετόνης. Συγκεκριμένα στο παρακάτω σχήμα η πορτοκαλί και η γκρι γραμμή αντιστοιχούν στους πρώτους κύκλους πολυμερισμού, ενώ η μπλε γραμμή από την άλλη, αντιστοιχεί στους τελευταίους κύκλους.



Σχήμα 47: Πάνω αριστερά: Πολυμερισμός Methylene Blue με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 20mM borate buffer, pH=9.14, supporting electrolyte: 0.1M KCl, scan rate: 50mVs⁻¹, Πάνω δεξιά: Κυκλική βολταμετρία σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, scan rate: 20mVs⁻¹, Κάτω αριστερά: Πολυμερισμός Methylene Blue με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 20mM borate buffer, pH=9.14, supporting electrolyte: 0.1M KCl, scan rate: 50mVs⁻¹, Κάτω δεξιά: Κυκλική βολταμετρία σε αcetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Παραπάνω (Σχήμα 47, πάνω αριστερά) παρατηρεί κανείς ότι υπάρχει μία κορυφή στα 1.3V η οποία ολοένα και μειώνεται και ο λόγος είναι ότι το φιλμ υπεροξειδώνεται. Καθώς από κύκλο σε κύκλο δεν υπάρχει πλέον πολυμερές να οξειδωθεί, η κορυφή αυτή ολοένα και μειώνεται. Η υπεροξείδωση του φιλμ σύμφωνα με τη βιβλιογραφία καλό είναι να αποφεύγεται καθώς καθυστερεί τον πολυμερισμό όλου του φιλμ.

Στο παραπάνω σχήμα παρατηρείται επίσης μία μετατόπιση των οξειδοαναγωγικών κορυφών προς τα θετικά δυναμικά.

Όσον αφορά το αποτύπωμα (Σχήμα 47, πάνω δεξιά) αυτό το οποίο είναι βιβλιογραφικά γνωστό και επαληθεύεται από το πείραμα είναι ότι σε περίπτωση που ο ηλεκτροπολυμερισμός πραγματοποιείται και για μεγαλύτερα δυναμικά του 1V, τότε στο αποτύπωμα φαίνονται δύο κορυφές εν αντιθέσει με όταν πραγματοποείται μόνο για μικρότερα αυτού δυναμικά, που τότε φαίνεται μία μόνο κορυφή. Σχετικά με την ηλεκτροχημική απόκριση με και χωρίς την προσθήκη ενζύμου αυτή αξιολογείται ως αμελητέα για το κυκλικό βολταμογράφημα του τροποποιημένου ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα (acetate) pH=5.

Στο Σχήμα 47 (κάτω αριστερά), στα 1.2V φαίνεται κατά πρώτον ότι το σχήμα είναι όλο μετατοπισμένο κατά 300mV προς τα αρνητικά δυναμικά και δεύτερον η πολύ απότομη κορυφή στα +1.1V παραμένει πιο σταθερή.

Στο Σχήμα 47 (κάτω δεξιά), φαίνονται και τα δύο οξειδοαναγωγικά ζεύγη, το οποίο είναι αναμενόμενο για δυναμικά ηλεκτροπολυμερισμού μεγαλύτερα του 1V. Τα δύο οξειδοαναγωγικά ζεύγη είναι και ευκρινέστερα λόγω της μικρότερης ταχύτητας σάρωσης σε σχέση με το προηγούμενο αποτύπωμα.

Ακολούθως, πολυμερίζεται εκ νέου το ηλεκτρόδιο και ελέγχεται η απόκριση του τροποποιημένου ηλεκτροδίου.



Σχήμα 48: Πολυμερισμός Methylene Blue με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 20mM borate buffer, pH=9.14, supporting electrolyte: 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹

Σε επόμενο πείραμα μετά τον πολυμερισμό του MB σε δυναμικά από -400 έως 1100 mV και το κυκλικό βολταμογράφημα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, δοκιμάζεται και η απόκριση του ηλεκτροδίου. Πραγματοποιούνται μισοί κύκλοι, κυκλικού βολταμογραφήματος. Ξεκινώντας από θετικά δυναμικά στα +500mV πραγματοποιούνται προσθήκες H₂O₂ και το δυναμικό μεταβάλλεται μέχρι τα -500mV. Συνήθως σαν δυναμικό για την παρατήρηση της διαφοράς της απόκρισης του ρεύματος με το δυναμικό επιλέγονται τα -300mV.



Σχήμα 49: Κυκλική βολταμετρία σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs⁻¹

Το αποτύπωμα του τροποποιημένου ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσιάζει δύο ζεύγη οξειδοαναγωγικών κορυφών όπωςκαι αναμενόταν για το συγκεκριμένο άνω όριο δυναμικού που χρησιμοποιήθηκε κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό.



Σχήμα 50: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Στην παραπάνω Εικόνα φαίνεται η απόκριση του ηλεκτροδίου με τις προσθήκες H₂O₂. Συγκρίνοντας την καμπύλη χωρίς προσθήκη H₂O₂ και την καμπύλη μετά την τέταρτη προσθήκη διαπιστώνεται ξεκάθαρα η απόκριση η οποία αποδίδεται στην κατάλυση. Η αναγωγή, του οξειδωμένου από το ένζυμο MB το οποίο με τη σειρά του έχει οξειδωθεί από το H₂O₂, οδηγεί σε αύξηση του αναγωγικού ρεύματος με κάθε προσθήκη H₂O₂.



Σχήμα 51: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, τελευταίες προσθήκες ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Στην παραπάνω εικόνα λαμβάνεται ένα πολύ μεγάλο καταλυτικό ρεύμα και μάλιστα η απόκριση είναι δυσανάλογα μεγαλύτερη σε σχέση με πριν. Έπειτα το ρεύμα μειώνεται με της προσθήκες. Όπως εξηγήθηκε στο κομμάτι της ανιλίνης όταν το ένζυμο εκτεθεί σε μεγάλη συγκέντρωση υπεροξειδίου ή εκτεθεί πολύ ώρα σε αυτό τότε μετατρέπεται σε μία μορφή η οποία δεν ανήκει στον καταλυτικό κύκλο, ουσιαστικά το ένζυμο γίνεται μη λειτουργικό σε κάποιες περιπτώσεις κι έτσι ακόμη και όταν προστίθεται επιπλέον H₂O₂ δεν λαμβάνεται μεγαλύτερη απόκριση του ρεύματος, αντιθέτως το ρεύμα ολοένα και μειώνεται λόγω της σταδιακής απενεργοποίησης του ενζύμου.

Επίδραση πάχους ηλεκτροπολυμερισμού στην απόκριση σε H₂O₂

Πραγματοποιείται εκ νέου πολυμερισμός στα ίδια όρια με πριν, αλλά για περισσότερη ώρα όπως φαίνεται και από το αποτύπωμα, καθώς τα ρεύματα αυξάνονται κατά 1.5μΑ περίπου.



Σχήμα 52: Κυκλική βολταμετρία σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs⁻¹

Με το μεγαλύτερο πάχος του φιλμ, φαίνονται πλέον κορυφές στο κυκλικό βολταμογράφημα και μία μετατόπιση της κορυφής αυτής με τις προσθήκες. Επίσης όπως φαίνεται το ένζυμο μάλλον αντέχει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις H₂O₂ και μάλιστα τη διπλάσια συγκέντρωση. Λόγω του γεγονότος ότι το ένζυμο βρίσκεται στην ίδια μορφή στο σύστημα, με το προηγούμενο πείραμα, δηλαδή ελεύθερο στο διάλυμα. Τελικά η μείωση των ρευμάτων από μία συγκέντρωση και μετά ίσως να μην οφείλεται αποκλειστικά στο ένζυμο, αλλά και στο πάχος του φιλμ. Το οποίο ενδεχομένως να υπαβαθμίζεται με το υπεροξείδιο.



Σχήμα 53: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Επίδραση των ορίων δυναμικού του ηλεκτροπολυμερισμού στην απόκριση σε H₂O₂

Πραγματοποιούνται κυκλικά βολταμογραφήματα, συγκεκριμένα πέντε κύκλοι, με το ανώτερο θετικό δυναμικό να μην ξεπερνά τα 1V για να διαπιστωθεί αν επιδρά στο τελικό πολυμερές. Τα υπόλοιπα κυκλικά βολταμογραφήματα πραγματοποιούνται για δυναμικά μεγαλύτερα του 1V.



Σχήμα 54:Πολυμερισμός Methylene Blue με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 20mM borate buffer, pH=9.14, supporting electrolyte: 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹



Σχήμα 55: Κυκλική βολταμετρία σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι το αποτύπωμα του κυκλικού βολταμογραφήματος έχει πλεόν αλλάξει και φαίνεται μόνο μία κορυφή στα +100mV περίπου και κάτω από αυτά τα δυναμικά φαίνεται ένα πλατώ, παρόλο που δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλοί κύκλοι σε δυναμικά μεγαλύτερα του 1V.



Σχήμα 56: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί λίγοι κύκλοι πολυμερισμού όπως φαίνεται και στο αποτύπωμα στο ρυθμιστικό διάλυμα, το σύστημα αντιδρά με σταδιακή και συνεχή αύξηση του ρεύματος απόκρισης μέχρι και την έβδομη προσθήκη. Πολύ μεγάλη απόκριση ρεύματος, που είναι δείγμα, ότι η επιπλέον προσθήκη υπεροξειδίου δεν είναι δυνατή, φαίνεται με την ένατη προσθήκη.



Σχήμα 57: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Είναι σημαντικό μετά από τα παραπάνω πειράματα να διαπιστωθεί τι συμβαίνει αν εν αγνοία του πειραματιστή κάποιο από τα αντιδρώντα δεν είναι λειτουργικό και έτσι παρατηρείται η δράση δύο εκ των τριών αντιδρώντων (πολυμερισμένου συνυποστρώματος, υποστρώματος, ενζύμου). Αρχικά πραγματοποιείται πείραμα για να διαπιστωθεί αν σε περίπτωση που το ένζυμο έχει γίνει μη λειτουργικό, θα διαπιστωθούν μεγάλα αναγωγικά ρεύματα και ίσως μάλιστα μεταβαλλόμενα με την αύξηση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται πείραμα με τροποποιημένο ηλεκτρόδιο και αυξάνεται η συγκέντρωση του H_2O_2 . Το επόμενο πείραμα πραγματοποιείται με στόχο να διαπιστωθεί, αν στην περίπτωση που το φιλμ του MB έχει φθαρεί και το γυμνό πλέον ηλεκτρόδιο (glassy carbon), είναι εκτεθιμένο στο διάλυμα, θα αντιδράσει, είτε με το υπεροξείδιο, είτε με το ένζυμο. Για το σκοπό χρησιμοποιείται μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο glassy carbon και στη μία περίπτωση προστίθεται υπεροξείδιο, χωρίς την ύπαρξη ενζύμου, ενώ την άλλη σε διαφορετικό φυσικά διάλυμα προστίθεται ένζυμο, χωρίς την ύπαρξη υπεροξειδίου. Στο τέλος αυτής της σειράς πειραμάτων ελέγχεται αν το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο αντιδρά με το ένζυμο. Επομένως προστίθεται ένζυμο στο ρυθμιστικό διάλυμα. Με την πρώτη προσθήκη ελέγχουμε αν ανιχνεύεται η ύπαρξή του και με κάθε επόμενη αν η απόκριση μεταβάλλεται σημαντικά με την προσθήκη.

Έλεγχος απόκρισης τροποποιημένου ηλεκτροδίου απουσία ενζύμου



Σχήμα 58: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Όπως διαπιστώνεται από το παραπάνω σχήμα για τα ίδια δυναμικά με αυτά που χρησιμοποιούνταν στο πείραμα της κατάλυσης, τα ρεύματα είναι της τάξης των μΑ. Σε αυτά τα όρια δυναμικού το υπεροξείδιο δεν ανιχνεύεται καθόλου. Επομένως δεν υπάρχει φόβος σύγχυσης των ρευμάτων που είναι αποτέλεσμα του καταλυτικού κύκλου, με αυτά της δράσης του υπεροξειδίου πάνω στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο προς σχηματισμό νερού.

Έλεγχος μη τροποποιημένου GC ηλεκτροδίου απουσία H2O2



Σχήμα 59: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹

Όπως φαίνεται για την αντίδραση του glassy carbon με το ένζυμο, το ένζυμο δεν αντιδρά πάνω σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο glassy carbon.



Έλεγχος μη τροποποιημένου GC ηλεκτροδίου απουσία ενζύμου

Σχήμα 60:: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για ηλεκτρόδιο glassy carbon, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 10mVs⁻¹, προσθήκες H₂O₂

Όπως φαίνεται παραπάνω το μη τροποποιημένο GC ηλεκτρόδιο αντιδρά με το H₂O₂. Τα ρεύματα είναι ίδιας τάξης μεγέθους με τα καταλυτικά αν και δε μεταβάλλονται με το χρόνο παρόλο που οι συγκεντρώσεις H₂O₂, είναι διπλάσιες από αυτές στο πείραμα για την κατάλυση.



Έλεγχος τροποποιημένου ηλεκτροδίου απουσία Η2O2

Σχήμα 61: Εξάρτηση ρεύματος από δυναμικό vs Ag/AgCl, Half cycle για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs⁻¹, range: 100μA

Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο αντιδρά με προσθήκη ενζύμου και δίνει αντιστοίχως μεγάλα ρεύματα με τα καταλυτικά, τα οποία δε φαίνονται να μεταβάλλονται με τις προσθήκες και αυτό είναι μία σημαντική διαφορά για να μπορέσουμε να τα ξεχωρίσουμε από τα καταλυτικά. Η αντίδραση του ενζύμου με το φιλμ δεν προκαλεί εντύπωση καθώς είναι γνωστό και από τη βιβλιογραφία ότι το πολυμερισμένο MeB χρησιμοποιείται ως σένσορας ο οποίος μετρά την αιμογλοβίνη στο αίμα και ουσιαστικά μετρά την οξείδωση της ανηγμένης αιμογλοβίνης (μορφή σίδηρος (ΙΙ)), στη μεθεμογλοβίνη (μορφή σίδηρος (ΙΙΙ)) και αυτό αποτελεί μία ένδειξη ότι ενδεχομένως αντιδρά ανάλογα και με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Την προηγούμενη δράση με την αιμογλοβίνη εφόσον η πρωτεΐνη είναι σε ανηγμένη μορφή και αναμένεται να οξειδωθεί πάνω στο οξειδωμένο φιλμ, περιμένει κανείς να την παρατηρήσει στα θετικά δυναμικά και πράγματι όπως διαπιστώνεται η δράση αυτή πραγματοποιείται στα +500mV. Στα αναγωγικά λοιπόν ρεύματα όπου εργαζόμαστε ενδεχομένως πραγματοποιείται η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή το ένζυμο χωρίς το υπεροξείδιο δεν οξειδώνεται, άρα έχω στην αρχική του κατάσταση του ενζύμου (ground state) αυτό να ανάγεται, στο ανηγμένο πολυμερές του MB, οπότε να προκύπτει δισθενής σίδηρος.

Έλεγχος ύπαρξης χωρητικών ρευμάτων



Σχήμα 62:Κυκλική βολταμετρία σε acetate buffer 50mM, pH=5, supporting electrolyte 0.1M KCl, έλεγχος χωρητικών ρευμάτων, για διαφορετικά scan rates

$$I_{o\lambda} = i_C + i_F$$

$$i_c = \frac{dq}{dt} = \frac{d(CE)}{dt} = C\left(\frac{dE}{dt}\right) + V(\frac{dC}{dt})$$

Όπου $\frac{dE}{dt}$, είναι ουσιαστικά η ταχύτητα σάρωσης, άρα με μείωση σε μεγάλο βαθμό της ταχύτητας σάρωσης, η κύρια συνιστώσα του ολικού ρεύματος η οποία μετράται είναι τα φαρανταϊκά ρεύματα. Από την παραπάνω εικόνα θα περιμέναμε ίσως να εμφανιστούν περισσότερες κορυφές και πιο οξύ σχήμα με εξάλειψη των χωρητικών ρευμάτων, ωστόσο το σχήμα δε μεταβάλλεται. Άρα μάλλον δεν υπάρχουν μεγάλα χωρητικά ρεύματα που να υπερκαλύπτουν τα φαρανταϊκά. Σημειώνεται δε, ότι το I_c είναι ανάλογο της ταχύτητας σάρωσης, ενώ το I_F ανάλογο της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης. Όσο μειώνεται η ταχύτητα σάρωσης τα φατανταϊκά ρεύματα μειώνονται περισσότερο από τα χωρητικά και αυτό δρα ανταγωνιστικά με την όξυνση των κορυφών του σχήματος.

Κεφάλαιο 4

Ηλεκτροχημικές Ταλαντώσεις

Έως σήμερα έχει καταγραφεί μία πληθώρα ηλεκτροχημικών συστημάτων τα οποία εμφανίζουν μία πολύπλοκη μη γραμμική συμπεριφορά, όπως αυθόρμητες ταλαντώσεις του ρεύματος ή του δυναμικού. Οι ταλαντώσεις σε ένα σύστημα μπορεί να παρουσιάζουν κάποια σταθερά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα σταθερή περίοδο ή να είναι σύνθετες και χαοτικές. Οι παρατηρήσεις των περιοδικά μεταβαλλόμενων δυναμικών υπήρχαν ήδη από το 1970, ωστόσο η εν μέρει ερμηνεία των ταλαντώσεων είναι σχετικά πρόσφατη και οφείλεται στο ενδιαφέρον για τη μη γραμμική χημική κινητική, η ερμηνεία της οποίας απαιτεί τη χρήση περίπλοκων μαθηματικών μοντέλων για την προσομοίωση των δυναμικών συστημάτων. Οι παρισότερες ηλεκτροχημικές ταλαντώσεις έχουν παρατηρηθεί.

Αξιοσημείωτο είναι ότι η κυματομορφές των ταλαντώσεων ρεύματος παρουσιάζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, ακόμη και αν δημιουργούνται σε διαφορετικά ηλεκτροχημικά συστήματα. Οι παρακάτω τέσσερις φάσεις μπορούν να αναγνωριστούν στα περισσότερα συστήματα.

- 1. Το ρεύμα αυξάνεται απότομα μέχρι τη μέγιστη τιμή του.
- 2. Το ρεύμα μειώνεται, με μειούμενο ρυθμό.
- 3. Εφόσον φτάσει μία συγκεκριμένη τιμή η μείωση του ρεύματος επιταχύνεται έως ότου φτάνει μία πολύ μικρή τιμή ρεύματος.
- 4. Το ρεύμα παραμένει σχεδόν σταθερό σε πολύ χαμηλή τιμή μέχρι που ανακάμπτει και φθάνει στη μέγιστη τιμή του.

Ένα γενικό χαρακτηριστικό των ηλεκτροδίων που είναι ικανά να δώσουν ταλαντώσεις είναι το γεγονός ότι έχουν μία περιοχή μεταβολής ρεύματος αρνητικής κλίσης σε σχέση με την καμπύλη του δυναμικού. Το φαινόμενο του μειούμενου ρεύματος με αύξηση του δυναμικού καλείται παθητικοποίηση. Αυτό το στοιχείο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό που δημιουργεί τις ταλαντώσεις, χωρίς να τις εξηγεί από μόνο του. Μία χρονικά εξαρτούμενη συνάρτηση πρέπει να συμπεριληφθεί. Το δυναμικό σε μία ηλεκτροχημική αντίδραση προκαλεί μεταβολές στις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων στο στρώμα του ηλεκτρολύτη κοντά στο ηλεκτρόδιο. Υπάρχει υπό μορφή υπόθεσης η θεωρία ότι οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις του υδρογόνου στο στρώμα ηλεκτρολύτη κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, είναι ένα χρονικά εξαρτώμενο φαινόμενο στο μηχανισμό των ταλαντώσεων. Το δυναμικό παθητικοποίησης υποτίθεται ότι εξαρτάται στη συγκέντρωση του ιόντος υδρογόνου με τέτοιο τρόπο που η εξάντλησή των ιόντων υδρογόνου λόγω του υψηλού ρεύματος, να έχουν σαν αποτέλεσμα την παθητικοποίησή του. Το χαμηλό κατά συνέπεια ρείμα έχει σαν αποτέλεσμα να επανέρχονται μέσω διάχυσης τα ιόντα υδρογόνου στο στρώμα και η διαδικασία να επαναλαμβάνεται.

Εξωτερική Αντίσταση

Αν το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου μετριέται με αναφορά ένα καλώδιο counter, όταν το ρεύμα μεταβάλλεται, το μετρούμενο δυναμικό υπερβαίνει το πραγματικό κατά ένα παράγοντα RI, όπου το R είναι η εξωτερική αντίσταση και I το δυναμικό. Οι πιο σημαντικές συνεισφορές στην εξωτερική αντίσταση είναι η ωμική αντίσταση του ηλεκτρολύτη και η αντίσταση στην πόλωση του counter ηλεκτροδίου. Η εσωτερική αντίσταση της πηγής του ρεύματος μπορεί να είναι και αυτή σημαντική. Παρόλο που δεν επηρεάζει της μετρήσεις του δυναμικού, έχει σαν αποτέλεσμα το δυναμικό της πηγής να μεταβάλλεται με το ρεύμα. Με τη χρήση ποτενσιοστάτη η εξωτερική αντίσταση μπορεί να μειωθεί πάρα πολύ. Ωστόσο εξωτερική αντίσταση συνδεδεμένη με ένα ηλεκτρόδιοπου μπορεί να παθητικοποιηθεί,ακόμη και μία μικρή εξωτερική αντίσταση είναι σημαντική γιατί μία αρνητική κλίση στο διάγραμμα δυναμικού ρεύματος μπορεί να καταστεί αδύνατη.

Παθητικοποίηση

Συνήθως υποτίθεται ότι η παθητικοποίηση προκαλείται από την απόθεση ενός στρώματος στο ηλεκτρόδιο που λειτουργεί σαν αντιστάτης. Η χημική απόθεση της επιφάνειας παθητικοποίησης αποτελεί αντικείμενο διαφωνιών. Μία γενικώς αποδεκτή θεωρία είναι ότι το στρώμα της επιφάνειας αποτελείται από οξείδια μετάλλου. Ωστόσο αυτή η θεωρία δενεξηγεί όλες τις περιπτώσεις παθητικοποίησης. Για παράδειγμα, μία άνοδος πλατίνας όπου οξειδώνεται Η₂, μπορεί να παθητικοποιηθεί και να δώσει ταλαντώσεις σε έναν ηλεκτρολύτη ελεύθερο από οξυγόνο, όπως είναι το ακετονιτρίλιο κορεσμένο σε HCl.

Πόλωση συγκέντρωσης

Η προσωρινή σχέση δυναμικού ενός ηλεκτροδίου εξαρτάται από το χρόνο. Για παράδειγμα ας θεωρηθεί η σντίδραση:

 $A \rightarrow B^+ + e$

Όταν ένα εξωτερικό ρεύμα οδηγεί στην κατανάλωση του Α προς παργωγή του B^+ , αυτό θα οδηγήσει στην εξάντληση του Α και στον αντίστοιχο εμπλουτισμό του B^+ στο στρώμα του ηλεκτρολύτη, στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αν το δυναμικό διατηρηθεί σταθερό το ρεύμα θα τείνει ασυμπτωτικά σε ένα όριο, καθώς το δυναμικό διάχυσης του Α και B^+ στο στρώμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια θα τείνει σε μία σταθερή τιμή. Όμοια και αν το ρεύμα διατηρείται σταθερό, το δυναμικό θα τείνει ασυμπτωτικά σε ένα όριο, καθώς το δυναμικό σταθερή τιμή. Όμοια και αν το ρεύμα διατηρείται σταθερό, το δυναμικό θα τείνει ασυμπτωτικά σε μία οριακή τιμή. Αν το ρεύμα διακοπεί και μετρηθεί το δυναμικό θα είναι διαφορετικό από το δυναμικό ισορροπίας του ηλεκτροδίου. Η διαφορά είναι η υπέρταση συγκέντρωσης. Μετά τη διακοπή της διέλευσης του ρεύματος το δυναμικό διάχυσης, θα εξαφανιστεί σταδιακά και το δυναμικό του ηλεκτροδίου θα επιστρέψει στο δυναμικό ισορροπίας.

Πλέον το πραγματικό δυναμικό του ηλεκτροδίου είναι κατά RI μικρότερο από το εξωτερικά μετρούμενο δυναμικό. Όταν το εξωτερικό δυναμικό διατηρείται σταθερό, το ρεύμα δεν είναι σταθερό και κατά συνέπεια ούτε το πραγματικό δυναμικό. Η ταλάντωση μπορεί να εξηγηθεί σε αυτό το πλαίσιο. Αν το εξωτερικό δυναμικό παραμένει σταθερό σε μία τιμή που είναι υψηλότερη από το δυναμικό παθητικοποίησης, τότε δεν υπάρχει πόλωση συγκέντρωσης και και το ρεύμα είναι υψηλό, ο παράγοντας RI κρατά το πραγματικό δυναμικό του ηλεκτροδίου σε μία τιμή δυναμικού χαμηλότερη από αυτό της παθητικοποίησης του ηλεκτροδίου. Το ρεύμα μειώνεται με το χρόνο λόγω της αυξανόμενης πόλωσης συγκέντρωσης και σα συνέπεια το πραγματικό δυναμικό του ηλεκτροδίου θα αυξάνεται με το χρόνο.Τελικά το πραγματικό δυναμικό του ηλεκτροδίου σε μία τιμή,

όπου η παθητικοποίηση λαμβάνει χώρα και το δυναμικό λαμβάνει μία χαμηλή τιμή. Η πόλωση συγκέντρωσης τώρα θα μειώνεται με το χρόνο. Κατά συνέπεια το ρεύμα θα αυξάνεται και το πραγματικό δυναμικό του ηλεκτροδίου θα μειώνεται με το χρόνο. Τελικά το πραγματικό του ηλεκτροδίου θα πέσει κάτω από το δυναμικό παθητικοποίησης και το ηλεκτρόδιο θα γίνει ενργό και πάλι. Από εκεί και πέρα η διαδικασία θα επαναλαμβάνεται από μόνη της. [21]

Ταλαντώσεις ως στοιχείο αυτοοργάνωσης σε ζώντα συστήματα

Η δυνατότητα αυτοοργάνωσης είναι είναι βασικό χαρακτηριστικό των ζώντων συστημάτων. Μακροσκοπικά, αντανακλάται σε πληθώρα βιολογικών και βιοχημικών λειτουργιών, οι μηχανισμοί των οποίων είναι αντικείμενο μελέτης σε πολλά εργαστήρια. Η ακρίβεια της αυτορύθμισης, η ποιότητα και η οργάνωση των ζώντων συστημάτων είναι αποτέλεσμα θερμοδυναμικών και κινητικών περιορισμών, υπό το θεωρητικό πλαίσιο των δομών διασκορπισμού (dissipative structures). Πρόκειται για ανοιχτά θερμοδυναμικά συστήματα τα οποία λειτουργούν εκτός και συχνά μακριά από τη θερμοδυναμική ισορροπία σε ένα περιβάλλον με το οποίο ανταλάσσουν ενέργεια και ύλη. Το γεγονός ότι λειτουργούν μακριά από την ισορροπία έχει σαν αποτέλεσμα τη μη αντιστρεψιμότητα των διεργασιών και το μονόδρομη εξέλιξή τους με το χρόνο.

Οι ταλαντώσεις λοιπόν είναι ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί ευρέως στα ζώντα συστήματα και παρόλο που ο μηχανισμός τους διαφέρει από σύστημα σε σύστημα και εξαρτάται από το πόσο σύνθετες είναι, μερικά χαρακτηριστικά είναι κοινώς παρατηρητέα στις βιοχημικές αντιδράσεις. Τα βιολογικά συστήματα αποτελούνται από σύνθετα χημικά δίκτυα που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οδηγούν σε ένα μεγάλο ποσοστό μη γραμμικών κινητικών. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει από διαφορετικούς πηγές:

- 1. Διάφοροι τύποι αντιδράσεων ανατροφοδότησης (feedbacks) έχουν ως ρόλο την πραγματοποίηση σημαντικών ενζυμικών αντιδράσεων, κυκλικά
- Πολλές διεργασίες που ελέγχονται από αλλοστερικά ένζυμα και ανταποκρίνονται σε μικρές αλλαγές στο υπόστρωμά ή στα προιόντα τους αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους κυκλικά από τη μία μορφή στην άλλη
- 3. Τα ηλεκτρικά πεδία έχουν παρατηρηθεί ότι είναι μια πρόσθετη μεγάλη δύναμη που επιδρά σε μεγάλη κλίμακα και έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά των φορτισμένων σωματιδίων και τον έλεγχο του μικροπεριβάλλοντος των καταλυτικών κέντρων.

Οι θερμοδυναμικές συνθήκες, οι μη γραμμικές χημικές μετατροπές και τα φαινόμενα μεταφοράς έχουν σαν αποτέλεσμα την εξέλιξη ενός αριθμού δυναμικών καταστάσεων, μερικά από τα οποία είναι δομές περιοδικής συμπεριφοράς. Θεωρείται πλέον γνωστό ότι σε συνθήκες μακριά από την ισορροπία, η σχέση μεταξύ χημικής κινητικής και της δομής στο χώρο και στο χρόνο των δρώντων συστημάτων δεν μπορεί να περιγραφεί τοπικά λαμβάνοντας υπόψιν τα χαρακτηριστικά του συστήματος, παίζουν σημαντικό ρόλο και τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντός τους. Σε συνδυασμό με τις τιμές των κινητικών σταθερών και των συντελεστών μεταφοράς, η λύση των κινητικών εξισώσεων εξαρτάται από χαρακτηριστικά το μέγεθος, η μορφή και η γεωμετρία του μέσου όπου γίνεται η αντίδραση. [22]

Χαρακτηριστικά των βιοχημικών ταλαντωτών

Όλοι οι βιοχημικοί ταλαντωτές είναι έτσι δομημένοι ώστε να παρουσιάζεται ένα είδος loop, το οποίο επαναλαμβάνεται λόγω αρνητικής ανατροφοδότησης (X \rightarrow Y \rightarrow ...–| X), το οποίο διαβεβαιώνει ότι όταν η συγκέντρωση του X γίνεται πολύ μεγάλη, τελικά θα μειωθεί και αν είναι πολύ μικρή τελικά θα αυξηθεί. Στους οργανισμούς η αρνητική ανατροφοδότηση χρησιμοποιείται βιοχημικά γιατην επίτευξη της ομοιόστασης (μία σταθερή steady state περίοδος για το ενδιάμεσο X), αλλά μετά από κάποιες συγκεκριμένες συνθήκες η σταθερή κατάστση μπορεί να χάσειτη σταθερότητά της και να αντικατασταθεί από αυθόρμητες ταλαντώσεις του X, (υψηλό \rightarrow χαμηλό \rightarrow υψηλό \rightarrow χαμηλό \rightarrow ...). Οι συνθήκες για τη δημιουργία ταλαντώσεων είναι: η μη γραμμικότητα στην κινητική των αντιδράσεων, αποδοτική μνήμη στο loop αρνητικής ανατροφοδότησης και η κατάλληλη εξισορρόπηση των timescales των συστατικών του loop. Στην κινητική των βιοχημικές αντιδράσεων υπάρχουν πολλές πηγές μη γραμμικότητας που συμβάλλουν στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Η 'μνήμη' μπορεί να είναι αποτέλεσμα των μακριών επαναλήψεων αρνητικής ανατροφοδότησης.

Σε συστήματα με τρία συστατικά και τρεις ή τέσσερις συνδέσμους, εντοπίζονται τρεις τύποι ταλαντωτών: αρνητικής ανατροφοδότησης loops με καθυστέρηση, ενισχυμένης αρνητικής ανατροφοδότησης και απρόβλεπτης αρνητικής ανατροφοδότησης. Όλη αυτή η κατηγοριοποίηση βέβαια είναι απλοποιημένοι, καθώς ποικίλοι συνδυασμοί των παραπάνω κατηγοριών οδηγούν σε χαοτικές ταλαντώσεις. [23]

Ενδείξεις ταλαντώσεων

Ταλαντώσεις για ηλεκτρόδιο με ηλεκτροχημικά σταθεροποιημένο ένζυμο

Η διαδικασία διεξαγωγής του πειράματος ακολουθεί παρακάτω:

- Πραγματοποιείται πολυμερισμός της ανιλίνης για δυναμικά από 0-1200mV μέχρι τα 3mA περίπου. Σαν ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείτει Ag/AgCl, σαν αντίθετο, ράβδος άνθρακα και σαν εργασίας ηλεκτρόδιο πλατίνας Pt, d=1mm
- Το σχηματιζόμενο ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε phosphate buffer (PB) 200mM, για 20min και πολώνεται στα -500mV
- 3. Κατόπιν πολώνεται για 10min στα +600mV
- 4. Έπειτα σε 4mL phosphate buffer 200mM, προστίθενται 1.5mg HRP και πολώνεται για 20min στα -500mV
- Πλέον θεωρείται ότι το ένζυμο έχει εισέλθει στο πολυμερές της ανιλίνης και αλλάζει εκ νέου το διάλυμα
- 6. Το ηλεκτρόδιο πολώνεται στα 0mV για κάποια ώρα χωρίς προσθήκη υπεροξειδίου
- Έπειτα γίνεται προσθήκη υπεροξειδίου, ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα να είναι 50μΜ
- Κατόπιν πραγματοποιείται πόλωση ανά 300mV και ως τα 1200mV, έως ότου να σταθεροποιηθεί το ρεύμα
- 9. Γίνεται κάθε επόμενη προσθήκη, πάντα ανά 50μΜ
- Οι πολώσεις πραγματοποιούνται μέχρι τα -200 με -300mV στα αρνητικά δυναμικά



Σχήμα 63:Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία, για 20min σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs⁻¹

Πραγματοποιείται πολυμερισμός, έως ότου το ρεύμα φτάσει τα 3mA και έπειτα ακολουθεί η διαδικασία πολώσεων και προσθήκης υπεροξειδίου όπως περιγράφηκε παραπάνω.Η ποσότητα που προστίθεται είναι διπλάσια από αυτή που προστίθεται για την κατάλυση (100μM ανά προσθήκη). Μετά την τρίτη προσθήκη καθώς το δυναμικό πόλωσης φτάνει τα -14mV εμφανίζονται ηλεκτροχημικές ταλαντώσεις. Η επιλογή της τιμής αυτής του δυναμικού δεν είναι τυχαία. Είναι το δυναμικό ισορροπίας του ανοιχτού κυκλώματος.



Σχήμα 64: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό -14mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Οι ταλαντώσεις που παρατηρούνται στα -14mV έχουν σταθερή περίοδο ίση με 1s, ούτε πλάτος και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως χαοτικές.



Σχήμα 65:Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό 128mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Με την αύξηση του δυναμικού έως τα 128mV, η περίοδος των ταλαντώσεων παραμένει σταθερή.



Σχήμα 66: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό 128mV vs Ag/AgCl, 150μM H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5



Σχήμα 67: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό 200mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Κατόπιν το δυναμικό αυξάνεται ακόμη περισσότερο και η περίοδος των ταλαντώσεων μειώνεται και γίνεται ίση με 0.5s, ενώ συνεχίζουν να είναι χαοτικές. Μετά την αύξηση του δυναμικού μέχρι τα +200mV, ξεκινάει η αντίστροφη πορεία και το δυναμικό μειώνεται. Ο λόγος που δεν πολώνουμε σε τόσο θετικά δυναμικά όσο πριν, είναι ότι σύμφωνα με στοιχεία από τη βιβλιογραφία η πόλωση σε πολύ θετικά δυναμικά, μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξείδωση το φιλμ και σε υποβάθμιση του, λόγω της δημιουργίας μονομερών που αποκόπτονται από το φιλμ. Η περίοδος αυξάνεται εκ νέου όσο το δυναμικό μειώνεται και πάλι.



Σχήμα 68: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό 100mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5


Σχήμα 69: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό 0mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5



Σχήμα 70: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό -100mV vs Ag/AgCl, 150μM H_2O_2 , phosphate buffer 0.2M, pH=5

Με την πόλωση στα -100mV, η περίοδος των ταλαντώσεων είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλο δυναμικό πόλωσης και φαίνονται επαναλήψιμες.



Σχήμα 71: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό -130mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Η ταλαντώσεις είναι επαναλήψιμες οπώς παρατηρείται, ανά 12 με μικρότερο πλάτος, προκύπτει μία με μεγαλύτερο, δηλαδή η 13ⁿ ταλάντωση κάθε φορά έχει μεγαλύτερο πλάτος. Η επαναληψιμότητα όμως των ταλαντώσεων αρχίζει να μειώνεται με περαιτέρω μείωση του δυναμικού, όπως φαίνεται στις δύο παρακάτω εικόνες. Το αξιοσημείωτο στην Εικόνα 11, είναι η πολύ μεγαλύτερη συχνότητα των ταλαντώσεων σε σχέση με την Εικόνα 10, ιδιαίτερα καθώς οι δύο ταλαντώσεις έχουν ληφθεί με απόσταση μεταξύ των δυναμικών ίση με 20mV.



Σχήμα 72: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό -160mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5



Σχήμα 73: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό -180mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Μετά τις διαδοχικές πολώσεις πραγματοποιείται κυκλικό βολταμογράφημα με ταχύτητα σάρωσης 20mVs⁻¹, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιο εύρος δυναμικών δημιουργούνται ταλαντώσεις και τι σχέση εμφανίζουν μεταξύ τους. Όπως φαίνεται από το κυκλικό βολταμογράφημα, το εύρος των δυναμικών που εμφανίζονται οι ταλαντώσεις χωρίζονται σε δύο διαστήματα και εμφανίζονται από τα -150mV περίπου έως τα +250 περίπου. Σε αυτό το διάστημα δυναμικών η συχνότητα ταλάντωσης αυξάνεται από τα αρνητικότερα προς τα θετικότερα δυναμικά, ενώ αντιθέτως το πλάτος των ταλαντώσεων μειώνεται. Το δεύτερο διάστημα όπου πραγματοποιούνται ταλαντώσεις είναι από τα +400 ως τα +800mV. Η συχνότητα των ταλαντώσεων είναι πολύ μεγαλύτερη στο δεύτερο εύρος δυναμικών σε σχέση με το πρώτο και τα πλάτη πολύ μικρότερα. Μεγαλώνουν ως τα 600mV και μετά φαίνονται να σταθεροποιούνται.



Σχήμα 74: Κυκλική βολταμετρία, σε διάλυμα phosphate buffer 0.2M, ταχύτητα σάρωσης: 20mVs-1

Πραγματοποιείται εκ νέου το ίδιο πείραμα. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται και πάλι έως ότου το ρεύμα φτάσει στα 3mA.



Σχήμα 75: Πολυμερισμός Ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία, για 20min σε διάλυμα 1M HCl 0.2M ανιλίνη, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs-¹

Οι ταλαντώσεις εμφανίζονται μετά από προσθήκη 300μM H_2O_2 στα -100mV. Οι ταλαντώσεις που προκύπτουν σε αυτά τα δυναμικά στο συγκεκριμένο πείραμα είναι πολύ πιο τυχαίες σε σχέση με αυτές του προηγούμενου πειράματος στα ίδια δυναμικά.



Σχήμα 76: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό 0mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5

Έπειτα πραγματοποιείται πόλωση στα 0mV και η μορφή των ταλαντώσεων φαίνεται καθώς μεταβάλλεται στο παρακάτω σχήμα. Η συχνότητα των ταλαντώσεων γίνεται πολύ μεγάλη και τα ρεύματά τους αντίστοιχα. Το αξιοσημείωτο είναι το εξής, ενώ στο προηγούμενο πείραμα με μείωση των δυναμικών αυξανόταν η συχνότητα των ταλαντώσεων, στο συγκεκριμένο πείραμα διαπιστώνεται το αντίθετο.



Σχήμα 77: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό -14mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5



Σχήμα 78: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό -14mV vs Ag/AgCl, 150μM H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5, Αριστερά: Αρχικές ταλαντώσεις μετά την πόλωση, Δεξιά:Εξέλιξη των ταλαντώσεων μετά την πόλωση

Στην αριστερή εικόνα παραπάνω φαίνεται ευκρινέστερα η μεταβατική περίοδος των ταλαντώσεων της Εικόνας 15 όπου οι ταλαντώσεις μεταβάλλονται καθώς πολώνεται το σύστημα από τα 0mV στα -100mV. Στη δεξιά εικόνα είναι η μεγέθυνση των ταλαντώσεων της Εικόνας 15, αφού οι ταλαντώσεις σταθεροποιηθούν σε συχνότητα και πλάτος στα -100mV.



Σχήμα 79: Κυκλική βολταμετρία, σε διάλυμα phosphate buffer 0.2M, ταχύτητα σάρωσης: 50mVs-1

Πραγματοποιείται κυκλικό βολταμογράφημα από τα -200mV έως τα 1200mV, για να διαπιστωθεί σε ποιο εύρος δυναμικών πραγματοποιούνται ταλαντώσεις και τη μορφή έχουν. Η ταχύτητα σάρωσης είναι διαφορετική σε σχέση με πριν και είναι ίση με 50mVs⁻¹. Με το κυκλικό βολταμογράφημα εντοπίζονται ταλαντώσεις σε πολύ διαφορετικά δυναμικά και συγκεκριμένα στα +400 με +1200mV και τα ρεύματα αυξάνονται με αύξηση του δυναμικού. Κάποιες μικρές ταλαντώσεις μικρού ρεύματος παρατηρούνται και στα +200 έως τα +400 mV. Στην πραγματικότητα υπάρχει το ενδεχόμενο οι ταλαντώσεις αυτές να προϋποθέτουν να μην πραγματοποιούνται ταλαντώσεις πολώνοντας καθοδικά. Ίσως δηλαδη οι ταλαντώσεις αυτές να είναι ανταγωνιστικές μεταξύ τους.



Σχήμα 80: Χρονοαμπερομετρία τροπποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, ερμοζόμενο δυναμικό 1300mV vs Ag/AgCl, 150 μ M H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5



Σχήμα 81: Σχήμα 82: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με Pani, εφαρμοζόμενο δυναμικό 1300 vs Ag/AgCl, 150μM H₂O₂, phosphate buffer 0.2M, pH=5, Αριστερά: Αρχικές ταλαντώσεις μετά την πόλωση, Δεξιά:Εξέλιξη των ταλαντώσεων μετά από κάποιο χρονικό διάστημα

Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται να ταλαντώνεται με πολύ μεγάλη συχνότητα για το λόγο αυτό περιορίζουμε τον άξονα των χρόνων για να φανεί ευκρινέστερα το σχήμα και για να διαπιστωθεί αν πρόκειται πράγματι για ταλαντώσεις ή θόρυβο. Οι ταλαντώσεις είναι τυχαίες και με πολύ μεγάλο πλάτος.

Ταλαντώσεις για ηλεκτρόδιο με ένζυμο σταθεροποιημένο με Nafion

- Διάλυμα 10mL συνολικά, 0.2M σε ανιλίνη και 0.8M σε HCl, χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης πάνω στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με κυκλική βολταμετρία μεταξύ -100-1.1V και ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹.
- Διάλυμα 10mL συνολικά, 0.2M σε ανιλίνη και 0.8M σε HCl, χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης πάνω στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με κυκλική βολταμετρία μεταξύ -100-1.1V και ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹ για του πρώτους κύκλους και μετά έως τα 900mV.
- Το ηλεκτρόδιο αφήνεται να στεγνώνει
- Επικαλύπτεται με πυκνό διάλυμα ενζύμου και αφήνεται να στεγνώσει
- Επικαλύπτεται με διάλυμα nafion και αφήνεται να στεγνώσει
- Το τροποποιημένο με Pani ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε ηλεκτροχημικό κελί σε phosphate buffer 0.2M, pH=5.3
- Το τροποποιημένο με Pani και HRP ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας σε ηλεκτροχημικό κελί, σε phosphate buffer 0.2M. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ως αντίθετο ένα ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα.
- Πραγματοποιείται πόλωση στα 1300mV, για 5min περίπου. Πραγματοποιείται μία προσθήκη H_2O_2
- Πόλωση στα -500mV
- Πόλωση στα -700mV
- Πόλωση στα -800mV
- Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε προσθήκη



Σχήμα 83: Πάνω αριστερά:Παρατηρούνται ταλαντώσεις που έχουν προκύψει με πόλωση στα -800mV, Πάνω δεξιά: Οι ταλαντώσεις έχουν προκύψει με πόλωση στα -700mV, Κάτω: Ταλαντώσεις που αντιστοιχούν σε πόλωση στα -500mV

Στην πρώτη εικόνα που απεικονίζονται ταλαντώσεις στα -800mV, η περίοδος T=1.1sec Στη δεύτερη εικόνα που απεικονίζονται ταλαντώσεις στα -700mV, η περίοδος T=1-1.5sec Στη τρίτη εικόνα που απεικονίζονται ταλαντώσεις στα -500mV, η περίοδος T=1.5sec Οι ταλαντώσεις στην περίπτωση του ηλεκτροδίου με Nafion, έχουν μετατοπιστεί σε πιο αρνητικά δυναμικά. Ενώ στην περίπωση του ηλεκτροδίου με το ηλεκτροχημικά ακινητοποιημένο ηλεκτρόδιο οι ταλαντώσεις εφανίζονται στα 0 με -100mV, στο ηλεκτρόδιο με το Nafion εμφανίζονται στα -500mV. Στην περίπτωση του Nafion οι ταλαντώσεις δεν προέκυψαν μετά από διαδοχικές πολώσεις. Υπήρξε πόλωση σε πολύ θετικά δυναμικά (1300mV) και κατόπιν απότομα επιβλήθηκε το δυναμικό των -500mV. Αυτό προϊδεάζει ότι πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο από περιοχή αστάθειας, καταλήγει να σταθεροποιηθεί ταλαντώσεις με Nafion, σταματούν μετά από λίγο.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στις ταλαντώσεις συμμετέχει το ένζυμο πραγματοποιήθηκε πείραμα με τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (πλατίνας) και προστέθηκε υπεροξείδιο έως τα 150μΜ. Στα αρνητικά δυναμικά εντοπίσθηκε μία περιοχή αστάθειας στα -500mV περίπου. Όπου το ρεύμα μεταβαλλόταν έντονα με πόλωση του δυναμικού, αλλά δεν καταγράφηκαν ταλαντώσεις. Η αστάθεια αυτή δεν υπήρχε πριν την προσθήκη υπεροξειδίου. Το γεγονός ότι δεν καταγράφηκαν ταλαντώσεις αποδίδεται στο για την πραγματοποίηση ταλαντώσεων είναι απαραίτητο να υπάρχουν στο διάλυμα, τόσο το υπεροξείδιο, όσο και το ένζυμο.

Γενικότερα χημικές ταλαντώσεις, οι οποίες είναι ένδειξη μη γραμμικής κινητικής έχουν καταγραφεί για τις περισσότερες υπεροξειδάσες οι οποίες έχουν απομονωθεί από φυτικές πηγές.



Σχήμα 84: Μηχανισμός χημικών μοντέλων, όπου οι σκούρες γραμμές αντιστοιχούν σε απλές ταλαντώσεις,ενώ οι διακεκομμένες σε πιο σύνθετες δυναμικές

Σε περίπτωση που παραχθεί Per²⁺ μπορεί να προκύψουν πιο σύνθετες δυναμικές. Εφόσον οι ταλαντώσεις που έχουν παραχθεί παρουσιάζονται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα και ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κατάλυση, συμπεραίνεται ότι οφείλονται σε κάποια μορφή του ενζύμου, η οποία παράγεται μετά από μεγάλης διάρκειας έκθεση σε H₂O₂. Η μορφή αυτή συμπίπτει πιθανά με το colll η οποία είναι παράγωγη μορφή του Per²⁺, που όπως αναφέρεται στην παραπάνω βιβλιογραφία ευθύνεται για τις πιο σύνθετες δυναμικές του συστήματος.

Κεφάλαιο 5

Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Όταν το ένζυμο είναι ελεύθερο στο διάλυμα η απόκριση του ρεύματος του ηλεκτροδίου αυξάνει με τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου έως την τέταρτη προσθήκη, δηλαδή 200μΜ συγκέντρωση. Από την πέμπτη προσθήκη και μετά, η απόκριση είναι μη γραμμική.

Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι ηλεκτροχημικά προσροφημένο στο ηλεκτρόδιο με εμβαδό 0.078cm², δοκιμάζονται διαφορετικά δυναμικά πόλωσης.

- Για πόλωση στα -100mV, η εξάρτηση ρεύματος-συγκέντρωσης υπεροξειδίου είναι γραμμική, έως τα 450μM.
- Για πόλωση στα -300mV, η γραμμική εξάρτηση απόκρισης συγκέντρωσης παρατηρείται μέχρι μέγιστη συγκέντρωση τα 300μM.
- Για πόλωση στα -200mV, η γραμμική εξάρτηση απόκρισης-συγκέντρωσης παρατηρείται μέχρι μέγιστη συγκέντρωση τα 200μM.

Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο με Nafion στο ηλεκτρόδιο:

Με εμβαδό 0.078cm²: Για πόλωση στα -300mV, η μέγιστη συγκέντρωση για γραμμική απόκριση είναι περίπου στα 550μΜ. Για πόλωση στα -200mV, η μέγιστη συγκέντρωση για γραμμική απόκριση ήταν 1mM

Με εμβαδό 1cm²: Για πόλωση στα -300 mV, η μέγιστη συγκέντρωση για γραμμική απόκριση είναι 700μΜ

Με εμβαδό 1.8cm²: Για πόλωση στα -300mV, η μέγιστη συγκέντρωση για γραμμική απόκριση είναι περίπου 700μΜ

Συνοπτικά φαίνεται ότι το δυναμικό πόλωσης δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση, αρκεί χρονοαμπερομετρικά να είναι ορατή η κατάλυση. Για δυναμικό μικρότερο των -100mV, συνήθως δεν παρατηρούνται καταλυτικά ρεύματα.

Επίσης το εμβαδό του ηλεκτροδίου μπορεί να επηρεάζει την τάξη μεγέθους την κατάλυσης και βοηθά στην ακινητοποίηση του ενζύμου, αλλά δε σχετίζεται με το άνω όριο της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου, για την οποία προκύπτει κατάλυση. Αντιθέτως, σημαντικότατος παράγοντας για την αντοχή του ηλεκτροδίου στο υπεροξείδιο, είναι η μορφή του ενζύμου με την οποία βρίσκεται στο διάλυμα. Για ένζυμο ελεύθερο στο διάλυμα μπορούν να πραγματοποιηθούν 4 προσθήκες των 50μΜ. Για ένζυμο ακινητοποιημένο ηλεκτροχημικά μπορούν να πραγματοποιηθούν από έξι, έως εννέα προσθήκες. Όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά η ακινητοποίηση εφόσον είναι επιτυχημένη προστατεύει την αναδίπλωση. Για ένζυμο ακινητοποιημένο με Nafion η μέγιστη συγκέντρωση για μέγιστη απόκριση είναι το 1mM. Το Nafion μπορεί να λειτουργήσει σα μεμβράνη η οποία κατά πρώτον προστατεύει το φιλμ από τυχόν επιμολύνσεις. Το σημαντικότερο ίσως είναι ότι η μεμβράνη ελέγχει τη διάχηση του υποστρώματος, έτσι ώστε ο ρυθμός διάχυσης να είναι ελεγχόμενος. Ένα άλλο πλεονέκτημα του Nafion είναι ότι ενδείκνυται για ποσοτικές μετρήσεις. Κατά την ηλεκτροχημική ακινητοποίηση δεν μπορεί να ελεγχθεί η ποσότητα του ενζύμου που έχει προσροφηθεί στο ηλεκτρόδιο. Στον αντίποδα με το Nafion προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου και περιμένουμε μέχρι να προσροφηθεί και να στεγνώσει. Ένα μειονέκτημα είναι ότι το ηλεκτρόδιο με Nafion δεν αντιδρά για τόσο μικρές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου όσο το ηλεκτρόδιο με το ηλεκτροχημικά προσροφημένο ένζυμο.

Δοκιμάζεται ο πολυμερισμός ενός δεύτερου υποστρώματος. Ο πολυμερισμός του MB είναι αρκετά αργός. Η αιτία αυτού του προβλήματος είναι πιθανότατα ότι το φιλμ υπεροξειδώνεται. Σε άλλη βιβλιογραφία από αυτή που χρησιμοποιήθηκε κατά το σχεδιασμό του πειράματος αναφέρεται ότι το μέγιστο δυναμικό το οποίο ενδείκνυται για τον πολυμερισμό της ανιλίνης είναι τα 920mV ns SCE ή τα 959mV vs Ag/AgCl αντίστοιχα. Δείγμα του φαινομένου της υπεροξείδωσης είναι το γεγονός ότι κατά τον πολυμερισμό η πολύ απότομη κορυφή στο άνω θετικό όριο των δυναμικών ολοένα μειώνεται, που αυτό σημαίνει ότι μειώνονται τα ανηγμένα είδη και δεν υπάρχει κάτι οξειδωθεί. Από ένα σημείο και μετά η μείωση της κορυφής αυτής επιβραδύνεται έωςότου φαίνεται να σταθεροποιείται. Ωστόσο οι συνθήκες αυτές, έχουν σαν αποτέλεσμα τον αργό πολυμερισμό.

Ο πολυμερισμός του MB είναι πολύ πιο αργός από της ανιλίνης. Παρόλο που και εκεί τα όρια πολυμερισμού που έχουν επιλεγεί είναι ιδιαιτέρως θετικά. Στην περίπτωση της ανιλίνης δημιουργείται ένα αρκετά παχύ στρώμα στο ηλεκτρόδιο ήδη από το δεύτερο κύκλο, στην περίπτωση του MeB, απαιτείται τουλάχιστον μισής ώρας πολυμερισμός για να είναι βέβαιο ότι έχει καλυφθεί πλήρως το glassy carbon. Μετά από πολυμερισμό 2 ωρών (Σχήμα 47) πάνω και κάτω αριστερά, οι κορυφές διαγράφονται κανονικά ωστόσο με γυμνό μάτι στο ηλεκτρόδιο διακρίνεται ένα πολύ λεπτό στρώμα σαν μπογιά. Το γεγονός ότι το στρώμα είναι τόσο λεπτό σημαίνει ότι το πολυμερές που δημιουργείται έχει πολύ μικρό πορώδες και μάλλον δεν είναι κατάλληλο έτσι ώστε το ένζυμο να εισχωρίσει ηλεκτροχημικά όπως στην περίπτωση της ανιλίνης.

Μετά τον πολυμερισμό το ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε acetate buffer όπου λαμβάνεται το αποτύπωμα του. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι, ενώ οι χρόνοι πολυμερισμού διαφέρουν μεταξύ τους έως και μιάμιση ώρα, τα ρεύματα του αποτυπώματος σε acetate buffer είναι ίδιας τάξης μεγέθους, δείγμα του πολύ αργού ρυθμού. Στα παρακάτω σχήματα: Σχήμα 47, Σχήμα 49, Σχήμα 52 του αποτυπώματος του PMB σε acetate buffer φαίνονται δύο κορυφές, όπως ήταν και αναμενόμενο για pH = 5, ενώ για μεγαλύτερα αναμένεται να φαίνεται μία μόνο κορυφή. Στο Σχήμα 55, παρόλο που το αποτύπωμα είναι σε acetate buffer στο ίδιο διάλυμα και pH με τα πρηγούμενα, παρατηρείται μία μόνο κορυφή. Βιβλιογραφικά ένας επιπλέον λόγος που οδηγεί σε μία κορυφή αντί για δύο είναι, σε περιπτώσεις που ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε μικρότερα του 1V δυναμικά. Πράγματι, όπως φαίνεται στην αντίστοιχη εικόνα πολυμερισμού Σχήμα 54, πολλοί κύκλοι έχουν πραγματοποιηθεί σε μικρότερα δυναμικά του 1V. Συγκεκριμένα μέχρι 900mV.

Παρακάτω μπορεί να κανείς να συγκρίνει το βιβλιογραφικό αποτύπωματα με το πραγματικό πειραματικό. Σημειώνεται ότι το περιβάλλον είναι όμοιο, δηλαδή πρόκειται για κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίου καλυμένου με ημιαγώγιμο φιλμ MB σε acetate buffer 0.05M pH=5, με βοηθητικό ηλεκτρολύτη 0.1M KCl. Η διαφορά είναι ότι το πρώτο έχει αποτυπωθεί με ταχύτητα σάρωσης 1mVs⁻¹ ενώ το δεύτερο με ταχύτητα σάρωσης 20mVs⁻¹.



Σχήμα 85: Σύγκριση αποτυπώματος βιβλιογραφίας αριστερά με βιβλιογραφίας δεξιά. [3]

Μετά το αποτύπωμα πραγματοποιούνται διαδοχικές προσθήκες υπεροξειδίου και ελέγχεται αν υπάρχει απόκριση με αντίστοιχη αύξηση κατά απόλυτη τιμή του ρεύματος. Το φαινόμενο αυτό όντως παρατηρείται αλλά θα πρέπει να επιβεβαιώσει κανείς ότι πράγματι οφείλεται στην κατάλυση.Πρέπει να εξεταστούν τα εξής:

- Αν υπάρχει αντίδραση μεταξύ του γυμνού υαλώδους άνθρακα και του υπεροξειδίου σε περίπτωση που το στρώμα MB, έχει φύγει
- Αν υπάρχει αντίδραση μεταξύ του γυμνού υαλώδους άνθρακα και της HRP, για τους παραπάνω λόγους
- Αν υπάρχει αντίδραση μεταξύ του PBM και του υπεροξειδίου
- Αν υπάρχει αντίδραση μεταξύ του PBM και της HRP

Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

- Σύμφωνα με το διάγραμμα στο Σχήμα 60 το GC αντιδρά με το H_2O_2
- Σύμφωνα με το διάγραμμα στο Σχήμα 59 το GC δεν αντιδρά με το ένζυμο
- Σύμφωνα με το διάγραμμα στο Σχήμα 58 το PMB, δεν αντιδρά με το H₂O₂
- Σύμφωνα με το διάγραμμα στο Σχήμα 61 το PMB, αντιδρά με το ένζυμο

Η αντίδραση του H₂O₂ με το methylene blue δεν είναι σημαντικό πρόβλημα από τη στιγμή που είναι βέβαιο ότι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει καλυφθεί πλώρως και δεν έχει φθαρεί. Όσον αφορά την αντίδραση του ενζύμου με το MB, έχει πάρα πολύ μεγάλο ενδιαφέρον ως φαινόμενο από την άλλη όπως φαίνεται μεταξύ άλλων και στις Εικόνες 25 και 26 μετά την προσθήκη του ενζύμου υπάρχει καταλυτική αντίδραση με τις προσθήκες του H₂O₂, εφόσον το υπεροξείδιο δεν αντιδρά από μόνο του με το φιλμ και όπως φαίνεται το ρεύμα αυξάνεται με της προσθήκες.

Η αντίδραση του ενζύμου με το φιλμ προκαλεί αντίδραση καθώς το πολυμερισμένο MeB χρησιμοποιείται ως σένσορας ο οποίος μετρά την αιμογλοβίνη στο αίμα και ουσιαστικά μετρά την οξείδωση της ανηγμένης αιμογλοβίνης (μορφή σίδηρος (II)), στη μεθεμογλοβίνη (μορφή σίδηρος (III)). Ο λόγος που χρησιμοποιείται το πολυμερές για αυτή τη διαδικασία είναι ότι οι μεγάλες πρωτείνες προσροφώνται μη αντιστρεπτά σε γυμνό ηλεκτρόδιο και οδηγούν σε παθητικοποίησή του. Η τροποποίηση του φιλμ με ένα στρώμα δρα σα μέσο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και πιθανώς την καταλύει. [24]

Πρόταση για τη βελτίωση της πειραματικής διαδικασίας

Εφόσον το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο του MB αντιδρά με το ένζυμο, ενώ το μη τροποποιημένο δεν αντιδρά, ενδείκνυται μετά την τροποποίηση του ενζύμου και πριν τη δοκιμή της απόκρισης το ηλεκτρόδιο να τοποθετείται στο διάλυμα και πρώτα να τοποθετείται το ένζυμο. Εφόσον υπάρχει στρώμα κυανού του μεθυλενίου στο ηλεκτρόδιο σε επαρκή ποσότητα αναμένεται να δούμε αύξηση των αναγωγικών ρευμάτων με την προσθήκη του ενζύμου. Μετά πραγματοποιούνται προσθήκες H₂O₂ και εφόσον παρατηρηθεί μεταβολή του ρεύματος με κάθε προσθήκη, αυτό αποδίδεται στην κατάλυση, εφόσον η απόκριση του τροποποιημένου ηλεκτροδίου δε μεταβάλλεται με τις προσθήκες H₂O₂.

Όσον αφορά τις ταλαντώσεις, προϋπόθεση για τη δημιουργία τους είναι το ένζυμο να είναι ακινητοποιημένο στο ηλεκτρόδιο, είτε ηλεκτροχημικά, είτε με Nafion. Για την ηλεκτροχημική ακινητοποίηση για πόλωση για δυναμικό πιο αρνητικά από τα -100mV η περίοδος είναι T=2s, ειδικά στα -180mV, η περίοδος αυξάνεται πάρα πολύ και η περίοδος είναι ίση με T=20sec από -14 έως 128mV, η περίοδος των ταλαντώσεων είναι T=1s. Για πόλωση στα 200mV και για θετικότερα, η περίοδος είναι T=0.5sec.

Σε επόμενο πείραμα ταλαντώσεις προέκυψαν από τα -100 έως τα 0mV και η περίοδός τους είναι ίση με 1sec.

Mε Nafion οι ταλαντώσεις εμφανίζονται σε πιο αρνητικά δυναμικά από τα -500 έως τα -800mV και η περίοδος είναι ίση με T=1s.

Στα -800mV, η περίοδος είναι T=1.1sec, στα -700mV, η περίοδος είναι T=1-1.5sec, στα -500mV, η περίοδος T=1.5sec

Οι ταλαντώσεις στην περίπτωση του ηλεκτροδίου με Nafion, έχουν μετατοπιστεί σε πιο αρνητικά δυναμικά. Ενώ στην περίπωση του ηλεκτροδίου με το ηλεκτροχημικά ακινητοποιημένο ηλεκτρόδιο οι ταλαντώσεις εφανίζονται στα 0 με -100mV, στο ηλεκτρόδιο με το Nafion εμφανίζονται στα -500mV. Στην περίπτωση του Nafion οι συνθήκες υπό τις οποίες προέκυψαν οι ταλαντώσεις ήταν διαφορετικές. Υπήρξε πόλωση σε πολύ θετικά δυναμικά (1300mV) και κατόπιν απότομα επεβλήθει το δυναμικό των -500mV. Αυτό προϊδεάζει ότι πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο από περιοχή αστάθειας, καταλήγει να σταθεροποιηθεί ταλαντούμενο και πράγματι οι ταλαντώσεις με Nafion, σταματούν μετά από λίγο.

Επίσης διαπιστώθηκε ότι στις ταλαντώσεις συμμετέχει και το ένζυμο, γιατί σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, με προσθήκες υπεροξειδίου δεν προέκυψαν ταλαντώσεις. Παρατηρήθηκε μία αστάθεια στα -500mV, καθώς ο θόρυβος είναι έντονος αλλά δεν εμφανίζονται ταλαντώσεις. Επομένως και το ένζυμο συμμετέχει στις ταλαντώσεις. Είναι αξιοσημείωτο ότι για τις περισσότερες υπεροξειδάσες, οι οποίες έχουν απομονωθεί από φυτικές πηγές, παρατηρούνται χημικές ταλαντώσεις.

Συμπεράσματα

- Το ιδανίκο εύρος δυναμικών για τον πολυμερισμό της ανιλίνης με κυκλική βολταμετρία είναι από -100 έως 1100mV, με ταχύτητα σάρωσης 50mVs⁻¹ και για περίπου 10 κύκλους.
- Καλύτερη καταλυτική συμπεριφορά παρουσιάζει το φιλμ πολυανιλίνης, όπου το ένζυμο βρίσκεται ακινητοποιημένο, είτε ηλεκτροχημικά, είτε με Nafion.
- Το ηλεκτρόδιο που μορφοποιήθηκε με πολυμερισμό σε H₂SO₄, είχε αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτό που πολυμερίστηκε σε διάλυμα HCl, συνεπώς η φύση του ανιόντος του οξείος δε φαίνεται να επηρεάζει τη συμμετοχή του πολυμερούς στον καταλυτικό κύκλο.
- Μεταξύ των δύο μεθόδων ακινητοποίησης του ενζύμου, η ακινητοποίηση με Nafion, έχει ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα του ηλεκτροδίου σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (έως 1mM). Το χαρακτηριστικό αυτό είναι το σημαντικότερο στοιχείο του ηλεκτροδίου αυτού. Αυτό οφείλεται στο ότι το Nafion λειτουργεί ως μεμβράνη που προστατεύει τόσο το ένζυμο, εφόσον ελέγχει τη διάχυση του υποστρώματος, από πιθανή δηλητηρίαση, όσο και το συνυπόστρωμα, το οποίο δεν κινδυνεύει να μολυνθεί. Από την άλλη όμως δεν αποκρίνεται σε μικρές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου, όσο το ηλεκτρόδιο με το ηλεκτροχημικά προσροφημένο ένζυμο.
- Η συγκέντρωση υπεροξειδίου που μπορεί να ανιχνευθεί και η απόκριση στην περίπτωση του ηλεκτροδίου που το ένζυμο είναι ηλεκτροχημικά προσροφημένο είναι γραμμική είναι από 0 έως 400μM.
- Εφόσον πραγματοποιείται η αναγωγή του φιλμ πολυανιλίνης, το βέλτιστο δυναμικό λειτουργίας του αμπερομετρικού ηλεκτροδίου είναι από -200mV, έως -300mV vs Ag/AgCl (3.5M KCl).
- Η αύξηση του εμβαδού του ηλεκτροδίου, συμβάλλει στην ενίσχυση των ρευμάτων, αλλά δεν έχει άλλη συνεισφορά στο σύστημα.
- Ο πολυμερισμός του φιλμ MB, καλό είναι να πραγματοποιείται για όρια δυναμικού από -400 έως 900mV για να αποφεύγεται η υπεροξείδωση του φιλμ.
- Το στρώμα του πολυμερούς MB είναι πολύ λεπτό και το πάχος του δε φαίνεται να αυξάνεται με το χρόνο, με αποτέλεσμα η ακινητοποίησή του ενζύμου ηλεκτροχημικά να μη φαντάζει ελπιδοφόρα.
- Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου GC αντιδρά με υπεροξείδιο, ενώ το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με MB, αντιδρά με το ένζυμο. Τα ρεύματα που λαμβάνονται είναι αντίστοιχου μεγέθους με τα καταλυτικά και γι' αυτό απαιτείται προσοχή κατά την πειραματική διαδικασία, ώστε να μην υπάρξει σύγχυση.
- Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου πολυανιλίνης προκύπτουν ενδείξεις ταλαντώσεων, όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο.
- Εικάζεται ότι οι ταλαντώσεις αυτές οφείλονται μεταξύ άλλων, στην έκθεση του ενζύμου σε υπεροξείδιο για μεγάλο χρονικό διάστημα, δημιουργώντας τη μορφή Compound III. Στην πορεία ακολουθείται ένα μονοπάτι μη γραμμικής κινητικής, άσχετο με τον καταλυτικό κύκλο.

Βιβλιογραφία

- [1] V. P. Pandey, M. Awasthi, S. Singh, T. Sameeksha και U. N. Dwivedi, «A Comprenhensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases,» *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, τόμ. 6, 2017.
- [2] E.Torres και M. Ayala, Biocatalysis Based On Heme Peroxidases, Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts, Berlin Heidelberg: Springer, 2010.
- [3] Dorothee Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voros και Ε. Reimhult, «Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures,» τόμ. 8, αρ. Sensors, pp. 1400-1458, 2008.
- [4] Niina J.Ronkainen, H. Brian, H. B. Halsall και W. R. Heineman, «Electrochemical Biosensors,» *Chemical Society Reviews*, 2010.
- [5] B.D.Malhotra και A. P. Turner, «Advances in Biosensors,» *Amsterdam: Elsevier Science B.V,* τόμ. 5, αρ. Perspectives in Biosensors, 2003.
- [6] J. Wang, «Electrochemical Glucose Biosensors,» Chemical Review, τόμ. 108, pp. 814-825, 2008.
- [7] DOROTA G.PIJANOWSKA, A. KOSSAKOWSKA και W. TORBICZ, «Electroconductive Polymers in (Bio)chemical Sensors,» *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, τόμ. 31, pp. 43-57, 2011.
- [8] A. S. Ahammad, «Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin,» *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 2013.
- [9] I.Yu.Sapurina και M. Shishov, «Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures,» 2012.
- [10] B.Silwana, C. van der Horst, E. Iwuoha και V. Somerset, «Inhibitive Determination of Metal Ions Using a Horseradish Peroxidase Amperometric Biosensor,» 2014.
- [11] C. Dhand, M. Das, M. Datta και B. Malhotra, «Recent Advances in Polyamine Biosensors,» *Elsevier*, τόμ. 26, αρ. Biosensors and Bioelectronics, pp. 2811-2821, 2011.
- [12] Mr.Ravindrakumar και G. Bavane, «Synthesis of Polyaniline (PANI),» σε Synthesis and Characterization of Thin Films of Conducting Polymers for Gas Sensing Applications, School of Physical Sciences, NMU, Jalgaon, 2014.
- [13] G.Zotti, S.Cattarin και N.Comisso, «CYCLIC POTENTIAL SWEEP ELECTROPOLYMERIZATION OF ANILINE THE ROLE OF ANIONS IN THE POLYMERIZATION MECHANISM,» Elsevier, τόμ. 239, αρ. J.Electroanal.Chem., pp. 387-396, 1987.
- [14] P.Nunziante και G. Pistoia, «Factors Affecting The Growth of Thick Polyaniline Films By The Cyclic Voltametry Technique,» *Electrochemica Acta, Pergamon Press*, τόμ. 34, pp. 223-228, 1988.
- [15] D. Bejan και A. Duca, «Voltametry of Aniline with Different Electrodes and Electrolytes,» CROATICA CHEMICA ACTA, τόμ. 3, pp. 745-756, 1998.

- [16] V. Brenda, A. Marcela και R. Vazquez Duhalt, «Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes,» *Elsevier Science*, τόμ. 9, αρ. Chemistry & Biology, pp. 555-565, 2002.
- [17] J. Liu και S. Mu, «The electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue,» *ELSEVIER*, τόμ. 107, αρ. SYNTHETIC METALS, pp. 159-165, 1999.
- [18] I. H. Kaplan, K. Dagci και M. Alanyahoglu, «Nucleation and Growth Mechanism of Electropolymerization of Methylene Blue: The Effect of Preparation Potential on Poly(methylene blue) Structure,» WILEY, αρ. ELECTROANALYSIS, 2010.
- [19] X.-Q. Lin, J. Chen και Z.-H. Chen, «Amperometric Biosensor for Hydrogen Peroxide Based on Immobilization of Horseradish Peroxidase on Methylene Blue Modified Graphite Electrode,» WILEY, τόμ. 4, αρ. Electroanalysis, pp. 306-310, 2000.
- [20] A.A.Karayakin, A. Strakhova, E. Karayakina, S. Varfolomeyev και A. Yatsimirsky, «The electrochmical polymerization of Methylene Blue and bioelectrochemical response of the resulting film,» *Elsevier*, τόμ. 60, αρ. Synthetic Metals, pp. 289-292, 1993.
- [21] H. DEGN, «Theory of Electrochemical Oscillations,» *Johnson Reasearch Foundation, University of Pensylvania*, 1967.
- [22] B. HESS, «Oscillations: A property of Organized Systems,» σε *Frontier in Physicochemical Biology*, Paris, 1977.
- [23] B. Novac και J. J. Tyson, «Design Principles of Biochemical Oscillators,» *Macmillan Publishers,* 2008.
- [24] Christofer M.A. Brett, G. Inzelt και V. Kertesz, «Poly(methylene blue) modified electrode sensor for haemoglobin,» *Elsevier*, τόμ. 385, αρ. Analytica Chimica Acta, pp. 119-123, 1998.