



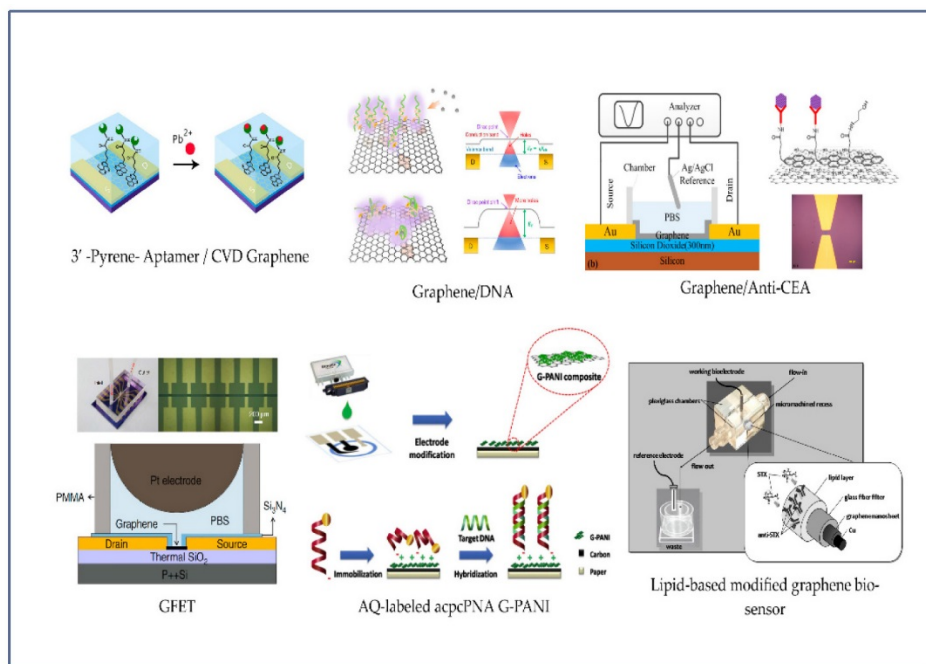
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΥΔΑΤΑ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μπρατάκου Σπυριδούλα

Ωκεανογράφος Παν.Αιγαίου

MSc Χημεία & Τεχν. Περ/ντος Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

**Τζαμτζής Νικόλαος
Καθηγητής ΕΜΠ**

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Ν. Τζαμτζής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ν. Τζαμτζής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Ν. Ψαρουδάκης, Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ν. Τζαμτζής, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Ν. Ψαρουδάκης, Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Α. Παππά, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Κ. Κορδάτος, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Κ. Μεθενίτης, Αν. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Χ. Προεστός, Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	XI
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	XV
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	3
1 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	3
1.1 Εισαγωγή.....	3
1.2 Τμήματα ενός αισθητήρα	5
1.3 Ταξινόμηση αισθητήρων	7
1.4 Χαρακτηριστικά Αισθητήρων.....	8
1.4.1 Στατικά χαρακτηριστικά	8
1.4.2 Δυναμικά χαρακτηριστικά.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	19
2 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	19
2.1 Εισαγωγή.....	19
2.2 Χημικοί αισθητήρες	22
2.3 Βιοαισθητήρες	24
2.3.1 Είδη βιοαισθητήρων.....	30
2.3.1.1 Βιοαισθητήρες που στηρίζονται στο χημικό στοιχείο αναγνώρισης	31
2.3.1.1.1 Ανοσοαισθητήρες	31
2.3.1.1.2 Ενζυμικοί.....	32
2.3.1.1.3 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ιστούς και κύτταρα.....	35
2.3.1.1.4 Βιοαισθητήρες που βασίζονται στη βιολογική συγγένεια.....	35
2.3.1.1.5 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες.....	36
2.3.1.2 Βιοαισθητήρες που στηρίζονται στο είδος της μετρούμενης ιδιότητας /είδος μεταλλάκτη	36
2.3.1.2.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες.....	37
2.3.1.2.2 Οπτικοί βιοαισθητήρες.....	40
2.3.1.2.3 Πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες	42
2.3.1.2.4 Θερμικοί βιοαισθητήρες.....	43
2.3.1.2.5 Χωρητικοί ή εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	45
3 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ.....	45
3.1 Εισαγωγή.....	45
3.2 Νανο-υλικά γραφενίου που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων	47
3.3 Εφαρμογές βιοαισθητήρων που βασίζονται σε γραφένιο	53
3.3.1 Βιοαισθητήρες γλυκόζης που βασίζονται σε γραφένιο	53

3.3.2	Βιοαισθητήρες γλυκόζης και υπεροξειδίου του υδρογόνου που βασίζονται σε γραφένιο.....	56
3.3.3	Βιοαισθητήρες DNA με βάση το γραφένιο.....	60
3.3.4	Βιοαισθητήρες ντοπαμίνης με βάση το γραφένιο.....	62
3.3.5	Βιοαισθητήρες NADH βασισμένοι σε γραφένιο.....	64
3.3.6	Βιοαισθητήρες χοληστερόλης που βασίζονται σε νανόφυλλα γραφενίου.....	66
3.3.7	Βιοαισθητήρες κυτοχρώματος C που βασίζονται σε γραφένιο.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο		69
4 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ		69
4.1	Εισαγωγή.....	69
4.2	Ανάπτυξη βιοαισθητήρων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών.....	72
4.3	Συνθετικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες	75
4.3.1	Τεχνικές σχηματισμού συνθετικών διστρωματικών μεμβρανών.....	78
4.3.2	Σχηματισμός λιποσωμάτων.....	82
4.4	Υποστηριζόμενες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες.....	84
4.4.1	Μεμβράνες υποστηριζόμενες σε μεταλλική επιφάνεια (metal supported membranes)	90
4.4.2	Λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρα (filter supported membranes)	91
4.4.3	Λιπιδικές πολυμερισμένες μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρο	92
4.5	Φυσικοχημικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών.....	95
4.6	Λιπιδικές μεμβράνες σε διάφορα υποστρώματα ZnO	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο		103
5 ΦΥΤΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ - ΑΥΞΙΝΕΣ		103
5.1	Εισαγωγή.....	103
5.2	Φύση των αυξινών.....	103
5.3	Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της αυξίνης.....	105
5.4	Λειτουργίες της αυξίνης.....	106
5.5	Τεχνικές ποσοτικού προσδιορισμού αυξινών.....	108
5.5.1	Βιοδοκιμές.....	108
5.5.2	Ανοσοδοκιμασίες	108
5.5.3	Χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας.....	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο		111
6 ΤΟΞΙΝΕΣ		111
6.1	Εισαγωγή.....	111
6.2	Ορολογία.....	111
6.3	Βιοτοξίνες.....	112
6.3.1	Τύποι βιοτοξινών.....	113
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο		119
7 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΟΥ ΝΑΦΘΑΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΗΛΕΚΤΟΔΙΟ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ		119
7.1	Εισαγωγή.....	119
7.2	Υλικά και διαλύματα.....	122
7.3	Όργανα και συσκευές	122

7.4	Κατασκευή αισθητήρα ηλεκτροδίου στηριζόμενου σε λιπίδιο με ενσωματωμένο τον υποδοχέα της ορμόνης αυξίνης πάνω σε ηλεκτρόδιο γραφενίου.....	123
7.4.1	Κατασκευή σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών με ενσωματωμένο τον υποδοχέα αυξίνης/πειραματικές συνθήκες.....	123
7.4.2	Κατασκευή του ηλεκτροδίου γραφενίου.....	126
7.5	Ηλεκτροχημικές μετρήσεις.....	127
7.6	Προετοιμασία των δειγμάτων.....	129
7.7	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	129
7.7.1	Αξιοπιστία μετρήσεων.....	129
7.7.2	Έλεγχος παρεμποδίσεων.....	132
7.7.3	Αναγέννηση του βιοαισθητήρα.....	133
7.8	Συμπεράσματα βιοαισθητήρα ναφθαλινικού οξέος.....	137
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο.....		139
8 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΑΞΙΤΟΞΙΝΗΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ.....		139
8.1	Εισαγωγή.....	139
8.2	Υλικά και διαλύματα.....	141
8.3	Όργανα και συσκευές.....	142
8.4	Κατασκευή αισθητήρα ηλεκτροδίου στηριζόμενου σε λιπίδιο με ενσωματωμένο υποδοχέα πάνω σε ηλεκτρόδιο γραφενίου.....	143
8.4.1	Κατασκευή λιπιδικών μεμβρανών με ενσωματωμένη Anti STX.....	143
8.4.2	Κατασκευή ηλεκτροδίου γραφενίου.....	144
8.5	Ηλεκτροχημικές μετρήσεις.....	145
8.6	Μοντέλα προσομοίωσης και δείγματα νερού λίμνης.....	145
8.7	Δείγματα οστρακοειδών.....	147
8.8	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	147
8.9	Εφαρμογή σε προσομοιωμένα και πραγματικά δείγματα νερού.....	152
8.10	Εφαρμογή σε δείγματα οστρακοειδών.....	154
8.11	Συμπεράσματα βιοαισθητήρα σαξιτοξίνης.....	155
Γ. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ.....		157
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο.....		159
9 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ.....		159
9.1	Συμπεράσματα.....	159
9.2	Προοπτικές.....	161
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		163
ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		165
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		185
Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....		187
I.	ΚΥΡΙΑ ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	189
II.	ΤΙΤΛΟΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ & ΠΙΝΑΚΩΝ.....	191
III.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	197
IV.	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	198

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρόσφατες εξελίξεις στους τομείς της βιοαναλυτικής χημείας και της μικροηλεκτρονικής οδήγησαν σε μια αυξανόμενη τάση μεταφοράς των κλασικών αναλυτικών μεθόδων από τον εργαστηριακό πάγκο, στο πεδίο, μέσω της ανάπτυξης φορητών συσκευών ή μικροσυστημάτων βασισμένων σε βιοαισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες είναι αυτοτελείς ενσωματωμένες συσκευές συνήθως σε μεγαλύτερα αναλυτικά όργανα, ικανές να παρέχουν αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας μόρια βιολογικής αναγνώρισης σε άμεση χωρική επαφή με μεταλλάκτη. Οι πληροφορίες που δίνουν μπορούν να κυμαίνονται από τη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου συστατικού δείγματος έως την ολική ανάλυση της σύνθεσης.

Οι φυτικές ορμόνες (αυξίνες) εμπλέκονται στην πλειονότητα των διαδικασιών που συνδέονται με την ανάπτυξη των φυτών, την κατάλληλη εξέλιξη και αναπαραγωγή. Μεταξύ των φυτικών ορμονών που προσελκύουν ιδιαίτερη προσοχή και αποτελούν το αντικείμενο εκτεταμένων μελετών, η ειδική θέση ανήκει στο Ινδολο-3-Οξικό Οξύ (IAA) που είναι η κύρια φυσική αυξίνη και το παράγωγο της Ναφθαλενικό Οξικό Οξύ (NAA).

Οι θαλάσσιες νευροτοξίνες είναι φυσικά προϊόντα που παράγονται κυρίως από φυτοπλαγκτόν μαζί με διάφορους τύπους ασπόνδυλων και επιλεγμένα είδη ψαριών. Η Σαξιτοξίνη (STX) είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη και η πιο γνωστή παραλυτική τοξίνη οστρακοειδών (PST). Η κατάποση Σαξιτοξίνης συνήθως με την κατανάλωση οστρακοειδών μολυσμένων από τοξικές ανθοφόρες φυλές, είναι υπεύθυνη για την ασθένεια, γνωστή ως παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε κατ' αρχήν ένας πρότυπος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της συνθετικής φυτικής ορμόνης του Ναφθαλενικού Οξικού Οξέος (NAA) σε φρούτα και λαχανικά. Αυτός ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με εναπόθεση νανόφυλλων γραφενίου πάνω σε σύρμα χαλκού ($d = 0,25$ mm) τοποθετημένου επί ενός φίλτρου από υαλώδεις ίνες και ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη με ενσωματωμένους τους υποδοχείς δέσμευσης της πρωτεΐνης- αυξίνης (ABP1) για τον προσδιορισμό του NAA. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έγχυσης ροής (flow injection) με ρυθμό προσθήκης $2 \text{ mL} / \text{min}$ από υδατικά διαλύματα NAA των 10 και 20 mL. Η απόκριση του αισθητήρα σε διάφορες συγκεντρώσεις NAA, βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία ($\sim 56 \text{ mV} / \text{δεκάδα συγκεντρώσεων}$) για μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων του NAA που κυμαινόταν από $50 \times 10^{-9} \text{ M}$ έως $10 \times 10^{-6} \text{ M}$. Το πλέον κατάλληλο περιβάλλον για να γίνουν οι μετρήσεις βρέθηκε να είναι σε $\text{pH}=7$. Στον προτεινόμενο βιοαισθητήρα έγινε έλεγχος αναγεννησιμότητας με ρυθμό ροής $2,0 \text{ mL} / 6$ λεπτά με 10 επιτυχείς αναγεννήσεις. Το όριο ανίχνευσης, με βάση τη χαμηλότερη συγκέντρωση που θα μπορούσε να μετρηθεί αξιόπιστα προσδιορίστηκε σε ($\text{LOD}= 10 \text{ nM}$) και ($\text{LOQ}=14 \text{ nM}$). Ο έλεγχος του βιοαισθητήρα σε πρότυπα διαλύματα NAA συγκέντρωσης $7 \times 10^{-7} \text{ M}$ έγινε με την παρουσία συνηθισμένων παρεμποδιστών που απαντώνται σε φρούτα και λαχανικά, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές στο σήμα του NAA. Στη συνέχεια έγινε αξιολόγηση / επικύρωση αυτού του βιοαισθητήρα με

τη χρήση 36 δειγμάτων φρούτων και λαχανικών. Οι ανακτήσεις στα δείγματα αυτά κυμάνθηκαν μεταξύ 91-106 % και για τα χαμηλά και υψηλά επίπεδα NAA. Η συσκευή μπορεί να κατασκευαστεί πολύ εύκολα, έχει εξαιρετικά αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές. Η παρούσα τεχνολογία μπορεί να προσαρμοστεί για την ανίχνευση άλλων ορμονών σε φρούτα και λαχανικά. Όταν η συγκέντρωση του NAA βρίσκεται πάνω από το θεσμοθετημένο όριο των 0.07 mg/Kg σωματικού βάρους/ημέρα είναι επιβλαβής και προκαλεί οξεία τοξικότητα, ερεθισμό του αναπνευστικού συστήματος και οφθαλμικές βλάβες (Environmental Protection Agency: case 0379, 2007; Οδηγία 91/414 ΕΟΚ; Κανονισμός 546/2011).

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ένας μικροσκοπικός ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση Σαξιτοξίνης (STX) χρησιμοποιώντας έγχυση ροής με ρυθμό προσθήκης 2 mL / min για υδατικά διαλύματα STX των 10-20 µL. Ο βιοαισθητήρας αυτός παρασκευάστηκε, όπως προηγουμένως για το NAA, με εναπόθεση σε σύρμα χαλκού στοιβάδων γραφενίου σε φίλτρο από υαλώδεις ίνες με ενσωματωμένες λιπιδικές μεμβράνες και η αντι-STX (ο φυσικός υποδοχέας σαξιτοξίνης) ακινητοποιημένη στις σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες. Η απόκριση του βιοαισθητήρα σε διάφορες συγκεντρώσεις της σαξιτοξίνης, βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (~60 mV/ δεκάδα συγκεντρώσεων) για μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων της τοξίνης που κυμαίνονται από 1×10^{-9} M έως 1×10^{-6} M σε pH=7. Στον προτεινόμενο βιοαισθητήρα έγινε έλεγχος αναγεννησιμότητας με βέλτιστη τιμή συνεχούς ροής 2,0 mL/λεπτό για 10 λεπτά με 10 επιτυχείς αναγεννήσεις (διατήρηση της αρχικής δραστηριότητάς του). Ο έλεγχος του βιοαισθητήρα σε προσομοιωμένα δείγματα νερών λίμνης ήταν επιτυχής και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές υπό την επίδραση επτά συνηθισμένων παρεμποδιστών σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό) που εισήχθησαν σε εμβολιασμένα με STX πρότυπα δείγματα. Ακολούθησε μελέτη του βιοαισθητήρα σε 10 δείγματα πραγματικού νερού λίμνης και υπολογίστηκε το ποσοστό ανάκτησης της τοξίνης 90-106% για τη χαμηλή συγκέντρωση (50 nM) και 95-102% για την υψηλή συγκέντρωση (1 µM). Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε με βάση τη χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να μετρηθεί αξιόπιστα (S/N=3) και βρέθηκε (LOD=1nM), ενώ το όριο ποσοτικοποίησης βρέθηκε (LOQ=3nM). Το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα είναι κάτω από το επιτρεπόμενο όριο τιμών (80 µg/100 σάρκας οστρακοειδών) που έχει ορίσει η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων [The EFSA Journal 1019, 1-7, (2009)] γεγονός που καθιστά το βιοαισθητήρα κατάλληλο για την ανίχνευση της Σαξιτοξίνης. Η καταλληλότητα του αισθητήρα που αναπτύξαμε επαληθεύθηκε περαιτέρω σε δείγματα νερού λίμνης εμβολιασμένα με STX και σε δείγματα νωπών οστρακοειδών.

ABSTRACT

Recent developments in the fields of bioanalytical chemistry and microelectronics have resulted in a growing trend of transferring the classical analytical methods from the laboratory bench to the field through the development of portable devices or microsystems based on biosensors. Biosensors are self-contained integrated devices to larger analytical instruments capable to provide analytical information using biological recognition molecules in direct spatial contact with a transducer. This information can range from the concentration of a specific sample component to total composition analysis.

Plant hormones (auxins) are involved in most processes associated with plant growth, proper development and reproduction. Among the plant hormones that attract special attention and are the subject of extensive studies, the specific place belongs to Indole-3-Acetic Acid (IAA) which is the major natural auxin and the NAF derivative.

Marine neurotoxins are natural products produced mainly from phytoplankton along with specific types of invertebrates and selected fish species. Saxitoxin (STX) is a potent neurotoxin and the most famous paralytic shellfish toxin (PST). Swallowing Saxitoxin usually with the consumption of shellfish contaminated by toxic flowering breeds, is responsible for the disease, known as paralytic shellfish poisoning.

In this dissertation we developed a basic biosensor for detection of synthetic plant hormone Naphthalene Acetic Acid (NAA) in fruits and vegetables. The biosensor made by depositing copper-coated graphene nanoparticles with embedded lipid membranes, modified with native ABP-1 receptors. In the proposed biosensor, regeneration was checked every 6 minutes with 10 successful the regenerations retaining its original potency.

The flow injection system was used at a rate of 2 mL/min of aqueous solution of NAA, 10 and 20 mL. The response of the sensor to various NAA concentrations was found to have a high sensitivity (~ 56 mV/tenth of concentrations) for a wide range of NAA concentrations ranging from 50×10^{-9} M to 10×10^{-6} M. The most suitable environment for making the measurements were found to be at pH = 7. In the proposed biosensor, a regenerative test was performed at a flow rate of 2.0 mL/6 minutes with 10 successful regenerations. The detection limit, based on the lowest concentration that could be measured reliably, was determined at (LOD = 10 nM) and (LOQ= 14 nM). Control of the biosensor in standard solutions of 7×10^{-7} M NAA was done in the presence of common inhibitors found in fruits and vegetables, without any significant changes in the NAA signal. This biosensor was evaluated/validated using 36 samples of fruits and vegetables. Recoveries in these samples ranged between 91-106% and lower and higher NAA levels. The device can be manufactured easily, has extremely reproducible results and can be reused many times. The present technology can be adapted to detect other hormones in fruits and vegetables. When the concentration of NAA is above the statutory limit of 0.07 mg/kg body weight/day is harmful and causes acute toxicity, respiratory irritation and eye damage

(Environmental Protection Agency: case 0379, 2007; Directive 91/414 EEC; Regulation 546/2011).

A microscopic potentiometric biosensor was developed to detect Saxitoxin (STX) using a flow injection at a rate of 2 mL/min for 10-20 μ L aqueous STX solutions. This biosensor was prepared, as before for NAA, by deposition on copper wire of graphene layers on a glass fiber filter with integrated lipid membranes and the anti-STX (the native saxitoxin receptor) immobilized on the stabilized lipid membranes. The response of the biosensor to various concentrations of Saxitoxin was found to have a high sensitivity (\sim 60 mV/tenth concentrations) for a wide range of toxin concentrations ranging from 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M at pH = 7. In the proposed biosensor, a regenerative control was performed with an optimum flow rate of 2.0 mL/min for 10 minutes with 10 successful regenerations (maintenance of its original potency). Control of the biosensor in simulated lake water samples was successful and no significant changes were observed under the influence of seven conventional inhibitors at three concentration levels (low, medium and high) introduced in STX-standard samples. Furthermore a study of the biosensor in 10 samples of real lake water, the recovery rate was calculated 90-106% for the low concentration (50 nM) and 95-102% for the high concentration (1 μ M). The detection limit was determined based on the lowest concentration that can be measured reliably ($S/N = 3$) and found ($LOD = 1\text{nM}$), while the limit of quantification was found ($LOQ=3\text{nM}$). The detection limit of the biosensor is below the permitted limit value (80 μ g /100 shellfish flesh) set by the European Food Safety Authority [The EFSTA Journal 1019, 1-76 (2009)] which makes the biosensor suitable for the detection of Saxitoxin. The suitability of the sensor that had been developed was further verified in samples of STX spiked water samples and samples of fresh shellfish.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο «*Ανάπτυξη Βιοαισθητήρα για την Ταχεία Ανίχνευση Ορμονών και Τοξινών με Εφαρμογή σε Τρόφιμα και Ύδατα*» ανατέθηκε το 2015 από τον Κο Νικόλαο Τζαμτζή-Πιλάλη Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και αποτελεί συνέχεια της ενασχόλησής μου με την μελέτη και ανάπτυξη ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα «για τον προσδιορισμό Καρμποφουρανίου σε φρούτα και λαχανικά» μετά την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «*Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος*» στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Με την εκρηκτική αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και την ταχεία ανάπτυξη της εκβιομηχάνισης, η ποσότητα των χημικών ουσιών που χρησιμοποιείται έχει δημιουργήσει συνθήκες τοξικότητας για τον άνθρωπο, που μπορεί από την κατανάλωση τροφίμων, να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας. Η ανάπτυξη και χρήση βιοαισθητήρων παρουσιάζει σήμερα τεράστιο ενδιαφέρον σε διάφορους τομείς της Χημικής Ανάλυσης μεταξύ των οποίων και στον τομέα της Ηλεκτροχημείας. Το μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων ώθησε στη διαμόρφωση του θέματος της παρούσας διατριβής για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φυτικών ορμονών (i) και τοξινών (ii) σε διάφορα τρόφιμα και ύδατα.

(i) Οι φυτικές συνθετικές ορμόνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι ελέγχουν την αύξηση, διεγείρουν την καμβιακή δραστηριότητα για σχηματισμό δευτερογενών αγγειακών ιστών και υποκινούν τη διαφοροποίηση των διαφόρων φυτικών οργάνων. Το Ναφθαλινικό Οξικό Οξύ (1-NAA) μια συνθετική φυτική ορμόνη-αυξίνη που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες διεγείρει το σχηματισμό ανθέων και καρπών, εμποδίζει την καρπόπτωση πριν τη συγκομιδή και προκαλεί αραίωμα των καρπών, με ψεκασμό, όταν αυτό απαιτείται κατά την ανθοφορία. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό, ως υπολειμματική ουσία, σε διάφορα γεωργικά προϊόντα (φρούτα λαχανικά) που καταλήγουν στο πιάτο του καταναλωτή και γι' αυτό απαιτείται προσεκτικός έλεγχος των επιπέδων του 1-NAA με τη βοήθεια πρότυπου βιοαισθητήρα.

(ii) Η Σαξιτοξίνη (STX) είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη και η πιο γνωστή παραλυτική τοξίνη οστρακοειδών. Η κατάποση της Σαξιτοξίνης, συνήθως με την κατανάλωση οστρακοειδών μολυσμένων από τοξικές ανθοφόρες φυλές, είναι υπεύθυνη για την ασθένεια του ανθρώπου γνωστή ως παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών (PSP). Η STX έχει μεγάλες περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις καθώς η παρουσία του στα δίθυρα οστρακοειδή όπως είναι τα μύδια, οι αχιβάδες, τα στρείδια και τα χτένια συχνά οδηγούν σε απαγορεύσεις συγκομιδής εμπορικών οστρακοειδών σε πολλά εύκρατα παράκτια ύδατα σε όλο τον κόσμο. Έτσι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της σαξιτοξίνης κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικός για την ανθρώπινη υγεία.

Λαμβάνοντας υπόψη τις δυσμενείς επιδράσεις στον άνθρωπο από την πιθανή υπολειμματική δράση του Ναφθαλινικού Οξικού οξέος και την παραλυτική δράση της Σαξιτοξίνης που φθάνει έως το θάνατο, σημαντικός παράγοντας αποτελεί η έγκαιρη, εύκολη, ταχεία κι αξιόπιστη ανίχνευση αυτών με νέες αναλυτικές συσκευές χαμηλού κόστους, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα και παρέχουν συγκρίσιμες πληροφορίες με αυτές που δίνουν τα συστήματα ενόργανης ανάλυσης όπως η HPLC, η HPLC/MS και η GC/MS. Η πλειοψηφία των συστημάτων βιοαισθητήρων, έχουν ως στόχο τον άμεσο εκλεκτικό, ευαίσθητο και συχνά *in situ* προσδιορισμό των ουσιών, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού. Η συγκεκριμένη διατριβή συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων που έχουν τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά και πιθανώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για άλλες ουσίες τοξικές ή μη.

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της διατριβής χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός και η τεχνογνωσία του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Ανάλυσης του ΕΚΠΑ και της Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του ΕΜΠ. Η κατασκευή των βιοαισθητήρων στηρίχθηκε σε προγενέστερο σημαντικό ερευνητικό έργο του Κου Δ. Νικολέλη Καθηγητή ΕΚΠΑ και της συνεργασίας που είχαμε στη διάρκεια των πειραμάτων της μεταπτυχιακής εργασίας στο εν λόγω εργαστήριο της Περιβαλλοντικής Ανάλυσης. Για τη θεωρητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένη βιβλιογραφία τόσο από βιβλία, όσο και από επιστημονικά περιοδικά. Στόχος υπήρξε η εφαρμογή του βιοαισθητήρα για την ανάλυση της φυτικής αυξίνης σε χαμηλό όριο ανίχνευσης, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή όχι η παρουσία της ορμόνης στα επιτρεπτά επίπεδα των απαιτήσεων ασφάλειας που ορίζονται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχεία α) και β) της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ. Η κατασκευή ενός νέου πρότυπου μικροβιοαισθητήρα απετέλεσε το δεύτερο στόχο με παρόμοια χαρακτηριστικά ποιότητας: εκλεκτικότητα, αξιοπιστία μετρήσεων (ακρίβεια, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα), χαμηλό όριο ανίχνευσης, ανθεκτικότητα, χαμηλό κόστος, μη εξειδικευμένο προσωπικό χρήσης, για την ανίχνευση και ακολούθως τον ποσοτικό προσδιορισμό της επικίνδυνης νευροτοξίνης Σαξιτοξίνη.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συντελεστές που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Πρώτα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής Κο. Νικόλαο Τζαμτζή-Πιλλάλη Καθηγητή ΕΜΠ για την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγηση του τόσο κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας, όσο και κατά τη συγγραφή αυτής της διατριβής μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή ΕΚΠΑ Κο Δ. Νικολέλη για τις πολύτιμες γνώσεις του, την εμπειρία του στην κατασκευή βιοαισθητήρων και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε, όποτε αυτή του ζητήθη.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή ΕΜΠ Κο. Στυλιανό Λιοδάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή ΕΚΠΑ Κο. Νικόλαο Ψαρουδάκη για τη συμμετοχή τους στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή και τις υποδείξεις τους κατά την εκπόνηση και τη συγγραφή της παρούσης διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια ΕΜΠ Κα. Αθηνά Παππά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΜΠ Κο. Κωνσταντίνο Κορδάτο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ κ. Κωνσταντίνο Μεθενίτη και τον Επίκουρο Καθηγητή ΕΚΠΑ Κο. Χαράλαμπο Προεστό για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της διατριβής αυτής.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, ιδιαιτέρως τον πατέρα μου για την πολύτιμη βοήθεια του στην κατανόηση του θέματος και τη συμπαράστασή του στις δύσκολες στιγμές κατά τη διάρκεια της συγγραφής και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της διατριβής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες παρατηρείται μια τεράστια δραστηριότητα στον τομέα των βιοαισθητήρων. Οι βιοαισθητήρες είναι μικρές συσκευές που μπορούν να συνδυαστούν με διάφορες ηλεκτροχημικές μεθόδους ανάλυσης και να αποτελέσουν αυτόνομες αναλυτικές συσκευές. Ως βάση για μια επιλεκτική ανάλυση οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν βιοχημικές ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης. Οι κύριες διεργασίες που εμπλέκονται σε οποιοδήποτε σύστημα βιοαισθητήρα είναι η αναγνώριση του αναλύτη, η μετατροπή του σήματος και η ανάγνωση (Ali et al., 2017). Λόγω της εκλεκτικότητάς τους, της ακρίβειας των αναλύσεων, της ταχύτητας ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, της φορητότητας και του χαμηλού κόστους, οι βιοαισθητήρες προσφέρουν ευκαιρίες για πολυάριθμες αποκεντρωμένες εφαρμογές στον κλινικό τομέα (Wang, 2006; Sin et al., 2014), στην προστασία του περιβάλλοντος (Wang, Lu and Chen, 2014) και στον έλεγχο των τροφίμων (Thakur and Ragavan, 2013; Mishra et al., 2018). Τεχνολογικός στόχος των συστημάτων βιοαισθητήρων σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, αποτελεί: η απλοποίηση της μεθοδολογίας του τελικού χρήστη σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να πραγματοποιούνται σύνθετες αναλύσεις από μη εξειδικευμένο προσωπικό, η κατασκευή μικροσκοπικών (miniaturization) συσκευών και η πιθανή ολοκλήρωση της με ανάλυση πολυπλεξίας (multiplexed) εύκολη στο χρήστη.

Η ανάγκη ταχείας ανάλυσης κλινικών δειγμάτων και ιατρικής διάγνωσης οδήγησαν τους ερευνητές στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων. Η αρχή έγινε το 1962 από το Leland Clark (Clark and Lyons, 1962) και την εξέλιξη της εφεύρεσής του σε βιοαισθητήρα ενσωματωμένο σε αναλυτική συσκευή για τη μέτρηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα. Ακολούθησε πλήθος δημοσιεύσεων που βρήκαν εφαρμογή στην ιατρική στο περιβάλλον και στα τρόφιμα προς όφελος ασθενών και καταναλωτών (Mehrota, 2016). Στο εμπόριο κυκλοφορούν συσκευές που στηρίζονται σε ενζυμική δράση (οξειδοαναγωγάσες, υδρολάσες και λυάσες) και έχουν δοκιμαστεί σε διακριτές εφαρμογές στην ιατρική (ουρία, κεατινίνη, κυτοκίνες κ.ά) στη βιομηχανία τροφίμων (ανίχνευση παθογόνων, διαλογή γλυκαντικών, ανίχνευση 3 οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στο γάλα κ.ά) την περιβαλλοντική χημεία και την άμυνα (Rodriguez-Mozaz, Lopez de Alda and Barceló, 2006; Mehrota, 2016).

Μεταξύ των διαφόρων τύπων βιοαισθητήρων, οι ηλεκτροχημικοί είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους και της δυνατότητας κατασκευής μικρογραφίας οργάνων που δίνουν συσκευές συμπαγούς και φορητής ανάλυσης (Grieshaber et al., 2008). Ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας εφαρμόζεται σε συσκευή μοριακής ανίχνευσης, η οποία συνδυάζει στενά ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης με ένα μεταλλάκτη ηλεκτροδίων, που να μπορεί να μετατρέψει το γεγονός της βιολογικής αναγνώρισης σε ένα χρήσιμο ηλεκτρικό σήμα που καταγράφεται σε μετρήσιμο σήμα από τον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (Thevenot et al., 2001 Fraden, 2010).

Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας είναι ένα τύπος ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα που μετρά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου

αναφοράς. Λειτουργεί υπό συνθήκες ισορροπίας και παρακολουθεί τη συσσώρευση φορτίου, με μηδενικό ρεύμα, που δημιουργείται με επιλεκτική σύνδεση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Buck and Lindner, 1994 ; Fraden, 2010). Η νανοτεχνολογία έχει προσφέρει μια μέθοδο για την παρασκευή νανοαισθητήρων με βάση λιπιδικές μεμβράνες (Knull, 1987) χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια γραφενίου (Suvarnaphaet and Pechprasarn, 2017). Μια λιπιδική μεμβράνη ορίζεται από τη σύνθεσή της, τη μοριακή δυναμική και τη συμπεριφορά φάσης. Η λειτουργία της μεμβράνης εξαρτάται από τον τρόπο παρασκευής και διατήρησής της σε θερμοδυναμικές συνθήκες (Siontorou et al., 2017). Το γραφένιο, είναι μια επίπεδη μονοστοιβάδα ατόμων άνθρακα συνδεδεμένων σφιχτά σε ένα δισδιάστατο κυψελοειδές πλέγμα (Bianco et al., 2013). Τα νανοϋλικά του γραφενίου έχουν προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (Geim and Novoselov, 2007; Lee, et al., 2008). Η διαθεσιμότητα λεπτών στοιβάδων γραφενίου σε μια επιφάνεια υποστρώματος αποτελεί βασική προϋπόθεση για την κατασκευή αισθητήρων.

Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των τυπικών αναλυτικών μεθόδων (δηλ. Χρωματογραφία ή Φασματοσκοπία Μάζας), συμπεριλαμβανομένου του χρόνου ταχείας απόκρισης, το μικρό μέγεθος, το χαμηλό κόστος, τη χρονική αποτελεσματικότητα, τη φορητότητα για χρήση στο πεδίο και το σπουδαιότερο, οι βιοαισθητήρες είναι βιοσυμβατοί και το προσωπικό δεν απαιτεί εκπαίδευση για τη χρήση του (Nikoleli et al., 2018b). Η κατασκευή των φορητών συσκευών βασίζεται σε σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένο ένα τεχνητό υποδοχέα και που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ποικίλων χημικών και βιολογικών ουσιών (Nikoleli et al., 2010). Η πρόοδος στην κατασκευή σταθερών στο αέρα λιπιδικών μεμβρανών (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002) έχουν επιτρέψει την εφαρμογή τους στην ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος ενώσεων που είναι τοξικές στα τρόφιμα ή είναι περιβαλλοντικού ή κλινικού ενδιαφέροντος (Bratakou et al., 2015; Karapetis et al., 2016; Nikoleli et al., 2013).

Η ανίχνευση φυτικών ορμονών έχει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον μελέτης για το ναφθαλινικό οξικό οξύ (NAA) μια συνθετική ορμόνη-αυξίνη που χρησιμοποιείται κατά κόρον στις καλλιέργειες, λόγω της ομοιότητάς του με τη φυσική ορμόνη 3-ινδολο-οξικό οξύ, για πιθανή υπολειμματική δράση τοξικότητας στον άνθρωπο από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών.

Επίσης η ταχεία ανίχνευση της σαξιτοξίνης σε δείγματα οστρακοειδών και υφάλμυρα ύδατα, κρίνεται ενδιαφέρον θέμα μελέτης διότι αφορά την ασφάλεια του καταναλωτή καθώς με κατάλληλο βιοαισθητήρα, μπορεί να εφαρμοστεί η ανίχνευση της νευροτοξίνης επί τόπου, πριν ακόμα τα αλιεύματα προωθηθούν στην αγορά για κατανάλωση.

Για τον προσδιορισμό του **Ναφθαλινικού Οξικού Οξέος** (NAA) έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της αεριοχρωματογραφίας (GC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), φασματοφθορισμομετρία, φωσφορομετρία, φωσφορομετρία σε θερμοκρασία δωματίου (RTP) ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία μικκυλίου (CMEK) και ηλεκτροχημικές μεθόδους (Duan, Zhang and Gao, 2012). Μελέτες για την ανίχνευση του NAA με τη χρήση βιοαισθητήρα δεν υπάρχουν

μέχρι σήμερα εκτός δύο δημοσιεύσεων της ομάδας Νικολέλης κ.ά. (Nikolelis et al., 2008a; Nikolelis et al., 2008b) που στηρίζονται σε σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες. Για το λόγο αυτό θα αναφερθώ περιορισμένα για τις εκτός βιοαισθητήρων αναλυτικές μεθόδους του NAA.

Μια ερευνητική ομάδα (Ma et al., 2008) συνέκρινε την HPLC με την Υγρή Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας σε σειρά (LC-MS/MS) για επτά φυτορμόνες μεταξύ των οποίων και NAA σε δείγματα νερού καρύδας και διαπιστώθηκε ότι η HPLC γενικά έδωσε καλύτερα αποτελέσματα με όριο ανίχνευσης για το NAA 6,28 μM και γραμμική περιοχή 10-125 μM έναντι της LC-MS/MS που παρουσίασε κατώτερες τιμές που οφείλονταν στη χρήση προκατεργασίας με εκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase extraction) η οποία σε δοκιμές ανάκτησης έδειξε R 67%.

Σε άλλη εργασία (Liu, Zhong and Lu, 2002) χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία συνδεδεμένη με μεγάλου όγκου δείγματα, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης, για επτά ορμόνες σε φύλλα καπνού όπου διαπιστώθηκε γραμμική περιοχή για το NAA 6-0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και όριο ανίχνευσης 0,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής πολλαπλών κυμάτων και κυψελίδα μικροκυψέλης για να βελτιωθεί η ευαισθησία διαχωρισμού, αλλά αποδείχθηκε ότι δεν ήταν σε θέση να ανιχνεύσει χαμηλές ποσότητες ορμονών σε φυτικούς ιστούς.

Ο Fernandez-Arguelles κ.ά. προτείνει για τον προσδιορισμό του 1-ναφθαλινοξικού οξέος σε φυσικά νερά ποταμών και μήλα την τεχνική του φωσφορισμού που προκαλείται από βαρέα άτομα σε θερμοκρασία δωματίου (Fernandez-Arguelles et al., 2005). Η προτεινόμενη μέθοδος RTP on-line προσφέρει ενδιαφέροντα πλεονεκτήματα για τον εκλεκτικό προσδιορισμό του 1-NAA σε πραγματικά δείγματα: ανάκτηση 97-108 % για τα νερά, 100-102% για τα μήλα, γραμμική περιοχή έως 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ και όριο ανίχνευσης 1,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ συμπεριλαμβανομένης της απλότητας της μεθοδολογίας και του χαμηλού κόστους.

Το ηηλικιοποιημένο με Pb φίλτρο χαρτιού διαπιστώθηκε ότι προκαλεί εκλεκτική εκπομπή φωσφορισμού (RTP) του α -NAA στα 521 nm με μήκος κύματος διέγερσης στα 300 nm. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση δειγμάτων νερού και λαχανικών από τους (Zhu, Wang and Wang, 2005) με κανονιστικά χαρακτηριστικά απόδοσης: η συγκέντρωση του α -NAA ήταν γραμμική στην περιοχή 2×10^{-6} - 6×10^{-4} mol /L, ο συντελεστής συσχέτισης 0.9999, το όριο ανίχνευσης της συγκέντρωσης ήταν $1,35 \times 10^{-7}$ mol /L και η RSD (για n = 10) ήταν 1,7%.

Η εφαρμογή ιονικών υγρών σε θερμοκρασία δωματίου (RTILs) στα πεδία της ηλεκτροχημείας και της ηλεκτροαναλυτικής χημείας είχε προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών χρησιμοποιώντας κυκλική βολταμετρία. Η προτεινόμενη μέθοδος RTILs για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε NAA χρησιμοποιεί τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με εξαφθοροφωσφορικό N-βουτυλπυριδίνιο (BPPF6/CPE) (Duan, Zhang and Gao, 2012) με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα ρεύματα οξειδωσης αυξήθηκαν γραμμικά με συγκέντρωση NAA στην περιοχή από $2,0 \times 10^{-5}$ έως $4,0 \times 10^{-4}$ mol/ dm^3 με όριο ανίχνευσης (S/N=3) έως $1,690 \times 10^{-7}$ mol/ dm^3 κάτω από βελτιστοποιημένες συνθήκες πειράματος.

Μια απλή και ευαίσθητη μέθοδος HPLC με ανιχνευτή φθορισμού εφαρμόστηκε με βάση την επισήμανση φθορισμού προ-στήλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλαπλών κατηγοριών αυξινών μεταξύ των οποίων και NAA σε δείγματα τροφίμων (Li et al., 2015). Η προτεινόμενη μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0,34-0,73 ng/mL για επτά φυτορμόνες (0,41 ng/mL για το NAA) τα οποία ήταν σημαντικά χαμηλότερα από τις μέχρι τώρα αναφερόμενες μεθόδους. Η μέθοδος αποδείχθηκε ότι είναι φθηνή, απλή, επιλεκτική, ευαίσθητη, ακριβής και αξιόπιστη για την ανίχνευση αυξινών.

Οι εργασίες (Nikolelis et al., 2008a; Nikolelis et al., 2008b) που αφορούν στην κατασκευή βιοαισθητήρα για την ανίχνευση NAA επικεντρώνονται στις ηλεκτροχημικές αλληλεπιδράσεις του NAA με σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες. Το NAA προσυμπυκνώνεται στην επιφάνεια της λιπιδικής μεμβράνης η οποία προκαλεί δυναμικές αλλοιώσεις των ηλεκτροστατικών πεδίων και στη δομή φάσης των μεμβρανών. Το παροδικό ρεύμα ιόντων που δημιουργείται μετά την έγχυση του NAA δίνει ένα σήμα το μέγεθος του οποίου συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της αυξίνης. Η συγκέντρωση προσδιορίστηκε σε επίπεδα μΜ, ενώ δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις στα επίπεδα συγκέντρωσης, που απαντώνται συνήθως σε πραγματικά δείγματα.

Η Σαξιτοξίνη (STX) είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη η οποία παράγεται φυσικά από ορισμένους τύπους πλαγκτονικών φυκών. Η κατανάλωση οστρακοειδών (π.χ. μύδια, στρείδια, χτένια κ.λπ.) που έχουν συσσωρεύσει την τοξίνη, μπορεί να προκαλέσει παραλυτική δηλητηρίαση στους ανθρώπους. Η Σαξιτοξίνη κατατάσσεται μαζί με άλλες τοξίνες, όπως η ρικίνη και η νευροτοξίνη αλλαντίασης ως μία από τις πιο δηλητηριώδεις χημικές ουσίες που είναι γνωστές στην ανθρωπότητα (Munday et al., 2013).

Διάφορες τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της Σαξιτοξίνης (STX), έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία. Εκτός από τη βιολογική δοκιμασία ποντικού που είναι μια τυπική μέθοδος AOAC για την ανίχνευση της STX αξιόπιστη και εύκολη στη λειτουργία της (επίσης χρονοβόρος και δαπανηρή), υπάρχουν οι χημικές (Humpage et al., 2010), οι ανοσολογικές (Zhu et al., 2014) και οι κυτταρικές μέθοδοι (Wang et al., 2015). Από τις χημικές αναλυτικές μεθόδους η υγρή χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (LC/MS) έχει γίνει περισσότερο αποδεκτή τα τελευταία χρόνια λόγω της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσής της (Humpage et al., 2010). Ωστόσο, η LC/MS χρειάζεται ακριβό όργανο και εξειδικευμένο προσωπικό με λεπτομερείς τεχνικές γνώσεις.

Οι ανοσοπροσδιορισμοί περιλαμβανομένης της ραδιοανοσοδοκιμασίας και της ELISA, έχουν εύλογα υψηλή εξειδίκευση και υψηλή ευαισθησία, παρά το γεγονός ότι μονοκλωνικά αντισώματα της STX είναι σχετικά ακριβά και εξαιρετικά δύσκολο να ληφθούν. Η σαξιτοξίνη μπορεί να ανιχνευθεί κάτω από συγκεντρώσεις 3,3 nM με βιοτινυλιωμένα αντισώματα και επισημασμένη με Cy5 στρεπταβιδίνη ως φθορίζον ιχνηλάτης (Zhu et al., 2014).

Η κατασκευή ενός βιοαισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) με απλό αναλυτή επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό της σαξιτοξίνης (STX), καθώς και άλλων τεσσάρων σε συγκεντρώσεις από 2 έως 50 ng /mL (Fonfria et al., 2007). Ο βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε με βάση την ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας ένα

αντίσωμα αντι-OTX2/3 (GT13-A) και μια ψηφίδα (chip) σαξιτοξίνης CM5. Βασικό πρόβλημα αποτέλεσαν τα διάφορα σχήματα διαλυτών εκχύλισης, λόγω των προβλημάτων αναγέννησης της επιφάνειας. Η απόδοση του βιοαισθητήρα σε φυσικά δείγματα, σε σύγκριση με τις δύο μεθόδους AOAC (βιολογική δοκιμασία ποντικού και HPLC) έδειξε ότι η τεχνολογία αυτή έχει ικανοποιητική ευαισθησία με διαλύτη αιθανόλη και είναι ικανή για την ανίχνευση της τοξίνης στο εύρος του ευρωπαϊκού ορίου των 80 μg/100 g σάρκας οστρακοειδών.

Ένας νέος βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) με πολυδιαυλικό αναλυτή κατασκευάστηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση δομοϊκού οξέος, οκαδαϊκού οξέος, σαξιτοξίνης και νεοσαξιτοξίνης (Campbell et al., 2011). Η τεχνολογία του βιοαισθητήρα στηρίζεται σε μια πρωτότυπη μονάδα ακινητοποίησης, όπου οι τέσσερις τοξίνες ακινητοποιούνται σε ένα σημείο κάθε κυψελίδας ροής μιας σειράς ψηφίδων (τσιπ) SCM5. Σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο ELISA, οι ανοσοενισχυτές SPR παρέχουν παρακολούθηση των τοξινών χωρίς επισήμανση και σε πραγματικό χρόνο, ο δε χρόνος ανάλυσης είναι συντομότερος, το όριο ανίχνευσης χαμηλό (1 έως 1,7 ng/mL για όλες τις τοξίνες) και υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης μικροσκοπικών και φορητών συσκευών.

Ο βιοαισθητήρας που βασίζεται σε κύτταρα είναι μια νέα μέθοδος στην κυτταροβιοσύνθεση, η οποία μπορεί να ανιχνεύει βιολογικούς ή χημικούς παράγοντες παρακολουθώντας τον μεταβολισμό, τη σύνθετη αντίσταση και τη διέγερση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο. Μια νέα πλατφόρμα (Zou et al., 2015) που λειτουργεί με δυναμικό και στηρίζεται σε βιοαισθητήρα σύνθετης αντίστασης, βασισμένο σε κυψέλες, κατασκευάστηκε από ένα μεγάλο κυτταρικό πληθυσμό (περίπου 30.000 κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού). Ο βιοαισθητήρας παρουσίασε υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση της STX με όριο ανίχνευσης περίπου 0,03 ng/ml, που είναι πολύ κάτω από το ρυθμιστικό όριο των 800 ng/mL στα οστρακόδερμα και κάτω από το όριο ανίχνευσης των 200 ng/mL (40 μg STX/100 οστρακοειδούς) της επίσημης μεθόδου MBA, όπως και της επίσημης μεθόδου AOAC (HPLC) που είναι περίπου 1,2 ng/mL. Ωστόσο άλλα ποιοτικά στοιχεία του βιοαισθητήρα δεν κρίνονται ικανοποιητικά και απαιτείται περισσότερη έρευνα σχετικά με τον κυτταρικό πληθυσμό.

Σε άλλη εργασία κατασκευάστηκε ένας κυτταρικός δυναμικός (potential) βιοαισθητήρας από μια συστοιχία καρδιομυοκυττάρων και μικροηλεκτροδίων με ασύρματο σύστημα καταγραφής 8 καναλιών, ο οποίος μπορεί να παρακολουθεί δυναμικά την ηλεκτρική δραστηριότητα του δικτύου των καρδιομυοκυττάρων (Wang et al., 2015). Τρεις παράμετροι του σήματος εγγραφής που εξάγονται από σήματα του εξωκυττάρου δυναμικού πεδίου του βιοαισθητήρα, αναλύονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό δύο τοξινών: της σαξιτοξίνης και της μπρεβετοξίνης (PbTX-2). Ο ρυθμός πυροδότησης των σημάτων του βιοαισθητήρα παρουσίασε υψηλή ευαισθησία με όριο ανίχνευσης για την STX 0,35 ng/ml και για την PbTX-2 1,55 ng/ml σε χρόνο 5 λεπτών.

Τέλος, οι ηλεκτροχημικές ή πιεζοηλεκτρικές πλατφόρμες φαίνεται να είναι οι πιο επιτυχημένες στην επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης (Chen et al., 2007). Ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας χωρίς επισήμανση που αναπτύχθηκε από το Hou κ.ά. για την

εκλεκτική ανίχνευση της STX βασίζεται σε ένα ειδικό απταμερές (aptasensor) για τη δέσμευση της τοξίνης (Hou et al., 2016). Για την κατασκευή του χρησιμοποιήθηκε μονοστοιβάδα οκταδεκανοθειόλης που εναποτέθηκε επί ενός χρυσού ηλεκτροδίου το οποίο συνέχεια επικαλύφθηκε με μια μεμβράνη από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων με τις οποίες το απταμερές συζεύγνυται ομοιοπολικά. Κυανού του μεθυλενίου αγκυρώνεται ηλεκτροστατικά στα καρβοξυλιωμένα τοιχώματα του άνθρακα και χρησιμοποιείται ηλεκτροχημικός δείκτης που παράγει ισχυρό διαφορικό παλμικό βολταμετρικό σήμα απουσία STX. Το μέγιστο ρεύμα οξειδωσης του κυανού του μεθυλενίου (-0,27 V), έναντι Ag/AgCl μειώνεται γραμμικά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις STX εντός της περιοχής συγκεντρώσεων 0,9 και 30 ηΜ και με όριο ανίχνευσης 0,38 ηΜ.

Συνοψίζοντας τις υπάρχουσες μελέτες που αφορούν την ανίχνευση της ορμόνης NAA, διαπιστώνεται η έλλειψη βιοαισθητήρων ανίχνευσης ή ποσοτικού προσδιορισμού. Χρησιμοποιούνται όμως συμβατικά συστήματα GC, HPLC, LC-MS/MS, Φθορισμός και Φωσφορισμός τα οποία δίνουν μεν αξιόπιστα αποτελέσματα με σχετικώς καλά όρια ανίχνευσης, αλλά είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες αναλύσεις, ενώ κάποια είναι υψηλού κόστους και απαιτούν εξειδικευμένους χειριστές.

Από τις μελέτες που αφορούν την ανίχνευση της STX με βιοαισθητήρες, διαπιστώνεται ότι ανοσοπροσδιορισμοί περιλαμβανομένης και της ELISA, ενώ έχουν υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία και σχετικώς χαμηλά όρια ανίχνευσης παρουσιάζουν έλλειψη σταθερότητας των συστημάτων τους, η οποία πιθανώς οφείλεται στον μηχανισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ της τοξίνης και του αντισώματος στον υποδοχέα ή από ενώσεις-παρεμποδιστές που μπορεί να προσδεθούν στο αντίσωμα. Αυτό προκαλεί περιορισμένη γραμμικότητα της απόκρισης και η ποσοτικοποίηση δεν είναι ικανοποιητική, ενώ απαιτούν πολύ εξειδικευμένα αντιδραστήρια. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από την πολυπλοκότητα κατασκευής τους, μεγάλους χρόνους κατασκευής και πολύ εξειδικευμένα βιολογικά στοιχεία (κύτταρα). Διακρίνονται για το μικρό χρόνο απόκρισης (5 λεπτά) και τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης 0,35 έως 1,55 ng/ml.

Στην παρούσα διατριβή σε πρώτη φάση έγινε η ανάπτυξη ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του Ναφθαλινικού Οξικού Οξέος και σε δεύτερη φάση η ανάπτυξη ενός πρότυπου βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Σαξιτοξίνης με βάση τα χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζουν τα σύγχρονα αναλυτικά όργανα, τα οποία προορίζονται για μαζική χρήση. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ταχεία ανίχνευση της ορμόνης και αντίστοιχα της οξίνης, στην αξιόπιστη αναγέννηση των βιοαισθητήρων, στην απλή και εύκολη κατασκευή τους με σκοπό την εξέλιξή τους σε φορητούς βιοαισθητήρες για αναλύσεις στο πεδίο, και στην εφαρμογή τους τόσο σε προσομοιωμένα όσο και σε πραγματικά δείγματα.

Η δομή της διδακτορικής διατριβής αποτελείται από τρία μέρη: Α. Θεωρητικό μέρος Β. Πειραματικό μέρος και Γ. Γενικά συμπεράσματα και προοπτικές. Το θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει πέντε Κεφάλαια στα οποία δίνεται μια σύντομη περιγραφή του θεωρητικού υπόβαθρου και των αρχών λειτουργίας: των αισθητήρων γενικά (Κεφ. 1^ο) με ιδιαίτερη έμφαση στα χαρακτηριστικά τους (στατικά-δυναμικά), των βιοαισθητήρων

(Κεφ. 2^ο) και στον τρόπο διάκρισής τους ανάλογα με το χημικό στοιχείο αναγνώρισης και το είδος της μετρούμενης ιδιότητας/μεταλλάκτη, των βιοαισθητήρων (Κεφ. 3^ο) που βασίζονται σε νανοδομήσιμα υλικά με επίκεντρο το γραφένιο, των βιοαισθητήρων (Κεφ. 4^ο) που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες με ενδεδλεγή μελέτη στις τεχνικές σχηματισμού και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, αυξίνες (Κεφ. 5^ο) και τοξίνες (Κεφ. 6^ο) αντίστοιχα με ιδιαίτερη έμφαση στο Ναφθαλινικό Οξικό Οξύ και στην Σαξιτοξίνη ως προς τη φύση τους και τους τρόπους ανίχνευσης.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει δύο κεφάλαια. Στο πρώτο (Κεφ. 7^ο) περιγράφεται η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα που στηρίζεται σε νανόφυλλα γραφενίου με ακινητοποιημένες σταθεροποιημένες STX) λιπιδικές μεμβράνες πάνω σε φίλτρα υαλονημάτων για την ταχεία ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του Ναφθαλινικού Οξικού Οξέος (NAA) σε φρούτα και λαχανικά. Το NAA δεσμεύεται από τον ενσωματωμένο στη λιπιδική μεμβράνη πρωτεϊνικό υποδοχέα Αυξίνης - 1. Στο δεύτερο (Κεφ. 8^ο) περιγράφεται η κατασκευή ενός ποτενσιομετρικού μικροβιοαισθητήρα Σαξιτοξίνης (STX), χρησιμοποιώντας ενσωματωμένες λιπιδικές μεμβράνες σε νανόφυλλα γραφενίου και το φυσικό υποδοχέα της ένωσης αυτής (Anti-STX) ακινητοποιημένο σε σταθεροποιημένες στον αέρα λιπιδικές μεμβράνες.

Στη συνέχεια ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές και το Παράρτημα με τα ακρωνύμια, τους τίτλους σχημάτων και πινάκων, τις 2 δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά που είναι απόρροια των πειραματικών κύκλων της διατριβής και το βιογραφικό σημείωμα του συγγραφέα.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι αισθητήρες είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία των σύγχρονων συστημάτων, δεδομένου ότι καθορίζουν την ποιότητα των πληροφοριών που προκύπτουν από την πραγματική ζωή και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και τη λήψη καθοριστικών αποφάσεων. Αποτελούν ζωτικής σημασίας τμήμα των περισσότερων βιομηχανικών οργάνων, οργάνων μεταφοράς κ.ά. και ο ρόλος τους στα περιβαλλοντικά συστήματα, στα συστήματα υγείας και σε άλλους τομείς, γίνεται όλο και πιο σημαντικός. Η παγκόσμια αγορά αισθητήρων αναπτύσσεται γρήγορα και ο βαθμός καινοτομίας είναι εξαιρετικά υψηλός.

Η λέξη “sensor” (αισθητήρας) προέρχεται από τη λατινική λέξη sentire, η οποία σημαίνει “αισθάνομαι” ή/ και “αντιλαμβάνομαι” οτιδήποτε. Η σημασία της έχει διατηρηθεί σχεδόν πλήρως στις αντίστοιχες αγγλικές λέξεις sense (αίσθηση) και sensibility (ικανότητα ευαισθησίας). Χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν σε μεγάλο βαθμό περισσότερο συναισθηματικά παρά λογικά φαινόμενα που είναι αμφιλεγόμενα και ατομικά ως προς το νόημά τους. Στο άκουσμα της λέξης αισθητήρας, το πιο σημαντικό που φθάνει στο μυαλό του ανθρώπου είναι η έννοια των πέντε βασικών ανθρώπινων αισθήσεων: όραση, ακοή, γεύση, όσφρηση και αφή. Ο μηχανισμός λειτουργίας των αισθήσεων γενικεύεται α) από τη λήψη σήματος εισόδου μέσω των αισθητήριων κυττάρων εξ αιτίας εξωτερικών ερεθισμάτων β) από τη διεξαγωγή δεδομένων προς τον εγκέφαλο για ερμηνεία των νευρολογικών παρορμήσεων και γ) από υποδοχείς που ανταποκρίνονται στο ερέθισμα σύμφωνα με τις οδηγίες του διαλειτουργικού κέντρου (*Ali et al., 2017*). Από αυτή τη σύντομη εξήγηση της “αίσθησης” θα μπορούσε να καθοριστεί για τον αισθητήρα ένας ορισμός ως **“μια συσκευή που λαμβάνει και αποκρίνεται σε ερεθίσματα και σήματα που προέρχονται από το περιβάλλον”** (*Buenger, Topuz and Groll, 2012*). Ο ορισμός αυτός είναι γενικός και μάλιστα τόσο που στην πραγματικότητα καλύπτει σχεδόν τα πάντα, από ένα ανθρώπινο μάτι μέχρι και το πάτημα μιας σκανδάλης σε ένα πιστόλι (*Fraden 2010*).

Οι αισθητήρες έχουν αναπτυχθεί σε τέτοια έκταση που δεν γνωρίζουμε επακριβώς. Αναφέροντας μόνο λίγους, όπως για παράδειγμα τους αισθητήρες θερμοκρασίας που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν τα ψυγεία, τους αισθητήρες πίεσης που εμφανίζουν την πίεση του λαδιού στα αυτοκίνητα και σε άλλες συσκευές, τους φωτοαισθητήρες που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν το φωτισμό της πόλης κ.λπ., διαπιστώνεται ότι αποτελούν μέρος της καθημερινής μας ζωής. Οι αισθητήρες που λειτουργούν με βάση τις νέες αρχές και βασίζονται στην χρήση νέων υλικών και καινοτόμων τεχνολογικών μεθόδων, είναι ακριβέστεροι, γρηγορότεροι, μικρότερου μεγέθους, χαμηλότερης ισχύος

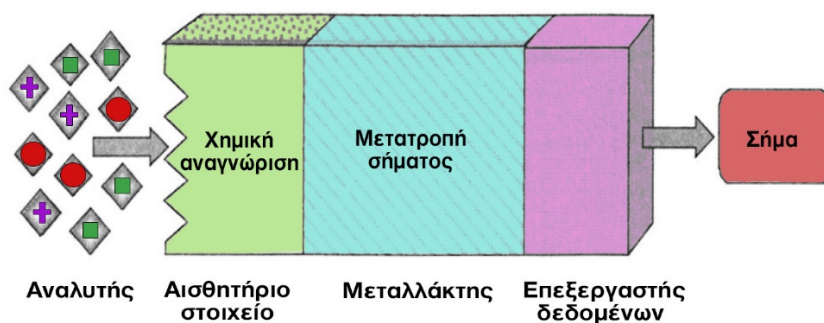
και οικονομικότεροι. Η έρευνα στη νανοτεχνολογία και στην βιοτεχνολογία έχει συμβάλλει σημαντικά, στην βελτίωση των ήδη υπάρχοντων εξελιγμένων αισθητήρων και στην εμφάνιση των μελλοντικών (Fraden, 2010).

Οι αισθητήρες διακρίνονται σε δύο θεμελιώδεις και ευρέως επιλεγμένες κατηγορίες που είναι οι **φυσικοί** και **χημικοί αισθητήρες**. Η κύρια ιδέα πίσω από αυτή την πρώτη ταξινόμηση προκύπτει επίσης από τη διερεύνηση των ανθρώπινων αισθήσεων. Δεδομένου, ότι ο κοινός μηχανισμός λειτουργίας πίσω από τις αισθήσεις της ακοής, της αφής και της όρασης πρέπει να ανταποκρίνεται στα εξωτερικά φυσικά ερεθίσματα (δηλαδή ακουστικά κύματα, πίεση και ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες αντίστοιχα), προκύπτει ότι και κάθε διάταξη ανίχνευσης που παρέχει απάντηση στη φυσική ιδιότητα του μέσου αναγνωρίζεται ως φυσικός αισθητήρας (McQuade, Pullen and Swager, 2000). Ομοίως, οι αισθήσεις γεύσης και οσμής ανταποκρίνονται σε χημικά ερεθίσματα της οσμής και ιδιαιτέρως της γεύσης των μορίων, οπότε κάθε διάταξη ανίχνευσης που μπορεί να μετατρέψει αναλυτικά τις χημικές πληροφορίες του συστήματος σε αναλύσιμα σήματα συμπεριλαμβάνεται στους χημικούς αισθητήρες.

Μια σημαντική υποκατηγορία χημικών αισθητήρων είναι οι λεγόμενοι *βιοαισθητήρες* (biosensors). Στους βιοαισθητήρες σε αντίθεση με τους υπόλοιπους χημικούς αισθητήρες η αναγνώριση του αναλύτη γίνεται με τη χρήση βιολογικών μορίων. Όταν π.χ. η ενεργός ουσία είναι ένα βιολογικό μόριο, ένζυμο ή αντίσωμα, τότε ο αισθητήρας χαρακτηρίζεται ως **βιοαισθητήρας**, ενώ αν η ουσία είναι ένα χημικό μόριο ο αισθητήρας χαρακτηρίζεται ως **χημικός** αισθητήρας. Ο συνδυασμός τη βιολογικής αναγνώρισης με τη φυσικοχημική μετάλλαξη του σήματος δίνει τη δυνατότητα στους βιοαισθητήρες να παρέχουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και ταυτόχρονα την πολύ καλή επιλεκτικότητα των βιολογικών αναγνωριστικών μηχανισμών.

Ακόμα δεν υπάρχει έγκυρος και καθολικά αποδεκτός ορισμός για τους όρους χημικός αισθητήρας ή βιοαισθητήρας, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε μεγάλη σύγχυση και εσφαλμένες αντιλήψεις σχετικά με την ορολογία χημειο- και βιο-αισθητήρα (Nagl and Wolfbeis, 2015). Γενικά ο αισθητήρας ορίζεται ως **«η συσκευή που λαμβάνει ένα ερέθισμα και αποκρίνεται σε ένα ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα»**, ενώ σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) ως χημικός αισθητήρας **«ορίζεται το αναλυτικό όργανο που μετατρέπει μια χημική πληροφορία σε αναλυτικό σήμα»** (Hulanicki, Glab and Ingman, 1991).

Η χημική πληροφορία, που συνήθως είναι η ενεργότητα ή η συγκέντρωση του αναλύτη, προκύπτει μέσω της χημικής αναγνώρισης (chemical recognition) του αναλύτη από το αισθητήριο στοιχείο (sensing element) του αισθητήρα (Σοφικίτη, 2009). Το αισθητήριο στοιχείο περιέχει την ενεργό ουσία που είναι υπεύθυνη για τη επιλεκτική αναγνώριση του αναλύτη και καθορίζει τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα (σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση χημικού αισθητήρα.

Ο αισθητήρας όπως φαίνεται στην εικόνα περιέχει συγκεκριμένες θέσεις αντίδρασης, που μπορούν να ανταποκριθούν σε συγκεκριμένο είδος αναλύτη εντός του μέσου. Ο αναλύτης / ερέθισμα προκαλεί μια επιλεκτική χημική αλληλεπίδραση στο χώρο, που οδηγεί στη μετατροπή των πληροφοριών σε οπτικό, θερμικό, μηχανικό ή ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρικό σήμα μεταδίδεται σε άλλη μονάδα, τη μονάδα επεξεργασίας που μεταφέρει στην έξοδο την απόκριση ανίχνευσης (Yogeswaran and Chen, 2008).

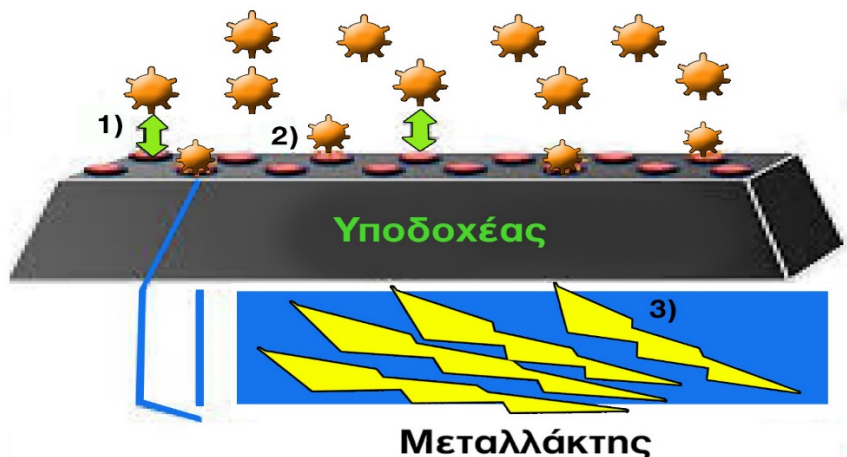
Γενικά οι χημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες ως συσκευές ανάλυσης έχουν να παρουσιάσουν σημαντικά πλεονεκτήματα: (α) διαθέτουν άμεση και συνεχή παρακολούθηση της συγκέντρωσης του αναλύτη ή και της χημικής σύστασης του δείγματος (β) με βάση τα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά τους (μικρό μέγεθος κατασκευής) πλεονεκτούν έναντι των σύγχρονων οργάνων ανάλυσης. Τα δύο αυτά πλεονεκτήματα τους καθιστούν ικανούς για χρήση σε αναλύσεις πεδίου (field analysis) ή στη παρακολούθηση ουσιών in vivo. Επίσης λόγω του μικρού μεγέθους τους επιδέχονται εύκολα αυτοματοποίηση στη χρήση τους.

1.2 Τμήματα ενός αισθητήρα

Σε ένα τυπικό σύστημα μέτρησης, το σήμα εισόδου ονομάζεται *μετρήσιμη ποσότητα* (measurand) και είναι η προς μέτρηση φυσική ή χημική ποσότητα, η οποία μέσω της διάταξης του *αισθητήρα* μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος. Από τεχνικής απόψεως, ο αισθητήρας αποτελείται από δύο μέρη τον **αποδέκτη** ή **υποδοχέα** (receptor) και το **μεταλλάκτη** ή **μετατροπέα** (transducer). Ο υποδοχέας είναι το στοιχείο μοριακής αναγνώρισης δηλαδή μια χημική ένωση με την οποία αντιδρά εκλεκτικά ο αναλύτης, δίνοντας ένα συγκεκριμένο προϊόν. Ο μεταλλάκτης είναι το τμήμα του αισθητήρα που μετατρέπει τη μετρήσιμη ποσότητα σε ηλεκτρικά μετρήσιμο σήμα. Ωστόσο το ηλεκτρικό σήμα συχνά χρειάζεται ενίσχυση και τροποποίηση, η οποία γίνεται με ένα ενισχυτή (amplifier) και ένα **επεξεργαστή**, χωρίς να αλλάξει η μορφή ενέργειας του σήματος.

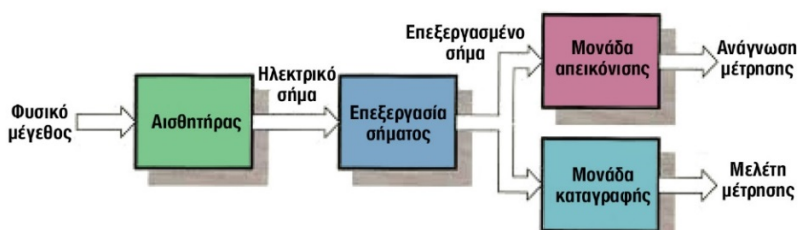
Ο όρος του αισθητήρα πρέπει να διακρίνεται από τον όρο του μεταλλάκτη. Ο μεταλλάκτης μετατρέπει την οποιαδήποτε μορφή ενέργειας σε άλλη, ενώ ο αισθητήρας μετατρέπει κάθε μορφή ενέργειας σε ηλεκτρική π.χ. το megάφωνο είναι ένας μεταλλάκτης που μετατρέπει ένα ηλεκτρικό σήμα σε ένα μεταβλητό μαγνητικό πεδίο και στη συνέχεια

σε ακουστικά κύματα. Ο υποδοχέας λαμβάνει το ερέθισμα (φυσικό ή χημικό) και μετασχηματίζει την πληροφορία αυτή με τη μορφή ηλεκτρικής ενέργειας, ενώ ο μεταλλάκτης εκτελεί τη λειτουργία της μετατροπής της ενέργειας αυτής σε πολύτιμο αναλυτικό σήμα το οποίο μπορεί να αναλυθεί και να παρουσιαστεί σε ηλεκτρονική μορφή (σχ.1. 2) (Gordeliy, 2002).



Σχήμα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών που συμβαίνουν στους αισθητήρες, 1) ο αναλύτης προσελκύεται στις θέσεις του υποδοχέα από το αισθητήριο στοιχείο, 2) ακολουθεί χημική αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και υποδοχέα με παραγωγή ηλεκτρικού σήματος 3) ο μεταλλάκτης μετατρέπει στον επεξεργαστή το ηλεκτρικό σήμα σε αναλυτικό σήμα.

Ο μεταλλάκτης είναι το δυσκολότερο κατασκευαστικά και πιο κρίσιμο μέρος ενός αισθητήρα (Thevenot et al., 2001). Από την ποιότητα καθώς και από την αρχή κατασκευής του θα καθοριστούν και τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα. Οι μεταλλάκτες μπορεί να αποτελούν τμήματα σύνθετων αισθητήρων δηλαδή δύο ή και τρεις αισθητήρες σε σειρά. Για παράδειγμα, ένα χημικός αισθητήρας μπορεί να έχει ένα τμήμα που μετατρέπει την ενέργεια μιας χημικής αντίδρασης σε θερμότητα και ένα άλλο τμήμα, μια θερμοηλεκτρική στήλη, που μετατρέπει τη θερμότητα σε ηλεκτρικό σήμα. Ο συνδυασμός και των δύο κάνει ένα χημικό αισθητήρα, μια συσκευή η οποία σε απόκριση παράγει ηλεκτρικό σήμα για ένα χημικό αντιδραστήριο. Στο παράδειγμα αυτό ο χημικός αισθητήρας που προέκυψε είναι ένας σύνθετος αισθητήρας, ο οποίος αποτελείται από ένα μη ηλεκτρικό μεταλλάκτη και ένα άμεσο αισθητήρα μετατροπής της θερμότητας σε ηλεκτρική ενέργεια. Επομένως ένας αισθητήρας δεν λειτουργεί από μόνος του, αλλά είναι πάντα μέρος ενός μεγαλύτερου συστήματος που μπορεί να ενσωματώνει πολλούς άλλους ανιχνευτές, επεξεργαστές σήματος, καταγραφείς δεδομένων, μονάδα απεικόνισης κ.λπ. (σχ.1.3).



Σχήμα 1.3. Λειτουργία επεξεργασίας του εξερχόμενου από τον αισθητήρα ηλεκτρικού σήματος.

Οι μεταλλάκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως **ενεργοποιητές** (actuators) σε διάφορα συστήματα. Ένας ενεργοποιητής μπορεί να περιγραφεί ως αντίθετος προς έναν αισθητήρα, καθ' όσον μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα σε γενικώς μη ηλεκτρική ενέργεια. Για παράδειγμα, ένας ηλεκτροκινητήρας είναι ένας ενεργοποιητής που μετατρέπει την ηλεκτρική ενέργεια σε μηχανική δράση ή ένας πνευματικός ενεργοποιητής που ενεργοποιείται από ένα ηλεκτρικό σήμα.

1.3 Ταξινόμηση αισθητήρων

Οι αισθητήρες μπορεί να είναι **άμεσοι** (direct) ή **έμμεσοι** (indirect). Οι άμεσοι μπορούν να ανιχνεύσουν μια σειρά φαινομένων που επηρεάζουν άμεσα το ηλεκτρικό μετρήσιμο σήμα, ενώ οι αισθητήρες έμμεσου τύπου χρειάζονται ένα μετατροπέα, δηλαδή μία συσκευή που θα μετατρέψει την μορφή ενέργειας που προκαλεί το εξωτερικό ερέθισμα σε ένα ηλεκτρικό σήμα (Fraden, 2010). Έτσι όλοι οι αισθητήρες μπορεί να διακριθούν:

(1) *αναλόγως των ιδιοτήτων τους* (χαρακτηριστικών τους), που μπορεί να είναι συγκεκριμένου ενδιαφέροντος ως προς το υλικό κατασκευής του αισθητήρα, τις προδιαγραφές, τα μέσα ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στους αισθητήρες, τα φαινόμενα μετατροπής και το πεδίο εφαρμογών

(2) *σε ενεργούς και παθητικούς*. Οι ενεργοί αισθητήρες απαιτούν εξωτερική ισχύ για τη λειτουργία τους, η οποία ονομάζεται σήμα διέγερσης. Αντίθετα ο παθητικός αισθητήρας δεν χρειάζεται καμία πρόσθετη πηγή ενέργειας για να παράξει άμεσα το ηλεκτρικό σήμα ως απάντηση σε ένα εξωτερικό ερέθισμα. Δηλαδή, η ενέργεια διέγερσης εισόδου μετατρέπεται από τον αισθητήρα σε σήμα εξόδου π.χ. ένα θερμοστοιχείο, μια φωτοδίοδος και ένας πιεζοηλεκτρικός αισθητήρας. Οι περισσότεροι παθητικοί αισθητήρες είναι άμεσοι αισθητήρες όπως ορίστηκαν παραπάνω.

(3) *σε απόλυτους και σχετικούς*. Ο απόλυτος αισθητήρας ανιχνεύει ένα ερέθισμα σε σχέση με μια απόλυτη φυσική κλίμακα που είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες μέτρησης, ενώ ο σχετικός αισθητήρας παράγει ένα σήμα που σχετίζεται με κάποια ειδική περίπτωση. Για παράδειγμα ένας θερμίστορ (θερμοαντιστάτης) είναι ένα απόλυτος αισθητήρας, ενώ ένα θερμοζεύγος είναι ένας σχετικός αισθητήρας.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολυάριθμες κατηγορίες αισθητήρων όπως μαγνητικοί αισθητήρες (Lenz and Edelstein, 2006), θερμομετρικοί αισθητήρες (Buryakov, Buryakov, Matsayev, 2016), οπτικοί αισθητήρες (Ahuja, and Parande, 2012), αισθητήρες ανίχνευσης ακτινοβολίας (Seitz et al., 2017), ηλεκτρικοί αισθητήρες (Yang and Dou, 2016), ηλεκτροχημικοί αισθητήρες (Xiao, Wang and Duan, 2016). Η βάση για αυτή την κατηγοριοποίηση είναι αποδεκτή, αλλά δεν είναι καθολική. Ο τρόπος λήψης, το πεδίο εφαρμογής, ο συγκεκριμένος αναλύτης που ανιχνεύεται, η μέθοδος μέτρησης κ.ο.κ. είναι οι λίγες άμεσες προσεγγίσεις που συνδέονται με την ουσία της ταξινόμησης σε αυτό το θέμα. Επειδή εκ μέρους της IUPAC δεν υπάρχει κάποια αυστηρή γραμμή, όσον αφορά την ταξινόμηση των αισθητήρων (Ali et al., 2015), θα μπορούσε γενικότερα να καθοριστεί ότι **“οι αισθητήρες είναι οι συσκευές που μπορούν να αξιολογούν αντιστρεπτά και**

εκλεκτικά την ποσότητα των μορίων των ειδών του αναλύτη, ενισχύοντας το σήμα που αποκτήθηκε από τη χημική αλληλεπίδραση μεταξύ των θέσεων υποδοχέα και του αναλύτη, χωρίς να απαιτούνται άλλα αναλυτικά όργανα ή χημικά μείγματα για την ανίχνευση“.

1.4 Χαρακτηριστικά Αισθητήρων

Τα χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: στατικά και δυναμικά. Η κατανόηση της συμπεριφοράς των δυναμικών και στατικών χαρακτηριστικών αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τον ορθό σχεδιασμό της εξόδου του συστήματος μέτρησης σε σχέση με την είσοδο του συστήματος.

1.4.1 Στατικά χαρακτηριστικά

Στατικά είναι τα χαρακτηριστικά εκείνα που μπορούν να μετρηθούν μετά από όλες τις μεταβατικές (transient) επιδράσεις που έχουν σταθεροποιηθεί στις τελικές ή σταθερές τιμές τους. Τα στατικά χαρακτηριστικά σχετίζονται με ζητήματα, όπως ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται η έξοδος ενός αισθητήρα ως απόκριση σε μια μεταβολή εισόδου, πόσο επιλεκτικός είναι ο αισθητήρας, πώς οι εξωτερικές ή εσωτερικές επιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν την απόκρισή του, και πόσο σταθερή είναι η λειτουργία ενός συστήματος ανίχνευσης. Μερικά από τα σημαντικότερα στατικά χαρακτηριστικά είναι τα ακόλουθα (Carr, 1993; Harsányi 2000; Fraden, 2010; Kalantar-zadeh, 2013):

1. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια ορίζει την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ του αποτελέσματος μιας μέτρησης του αισθητήρα και της πραγματικής (αληθούς) τιμής του μετρήσιμου μεγέθους. Η πραγματική τιμή είναι αυτή που αποδίδεται στο αντικείμενο μέτρησης και είναι αποδεκτή καθώς έχει καθορισμένη αβεβαιότητα, γιατί δεν μπορεί ποτέ κανείς να είναι απολύτως σίγουρος ποια είναι η πραγματική τιμή.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ακρίβεια ενός αισθητήρα, η μέτρηση θα πρέπει να συγκρίνεται με ένα πρότυπο μετρούμενο μέγεθος ή το σήμα εξόδου θα πρέπει να συγκρίνεται με ένα σύστημα μέτρησης γνωστής ακρίβειας. Ως ανακρίβεια ορίζεται η μεγαλύτερη απόκλιση μιας τιμής που μετρά ο αισθητήρας από την ιδανική ή πραγματική τιμή του εξωτερικού ερεθίσματος.

2. Πιστότητα (Precision)

Καθορίζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ενός αισθητήρα που μετρά το ίδιο σταθερό μέγεθος. Με άλλα λόγια καθορίζει την ικανότητα ενός αισθητήρα να δώσει την ίδια έξοδο σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές της ίδιας τιμής εισόδου. Η πιστότητα είναι μια στατιστική παράμετρος και μπορεί να εκτιμηθεί με την τυπική απόκλιση (ή διακύμανση) ενός συνόλου αναγνώσεων του συστήματος για παρόμοιες εισόδους. Συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό της απόδοσης ολόκληρου του φάσματος τιμών.

3. Διακριτική ικανότητα (Resolution)

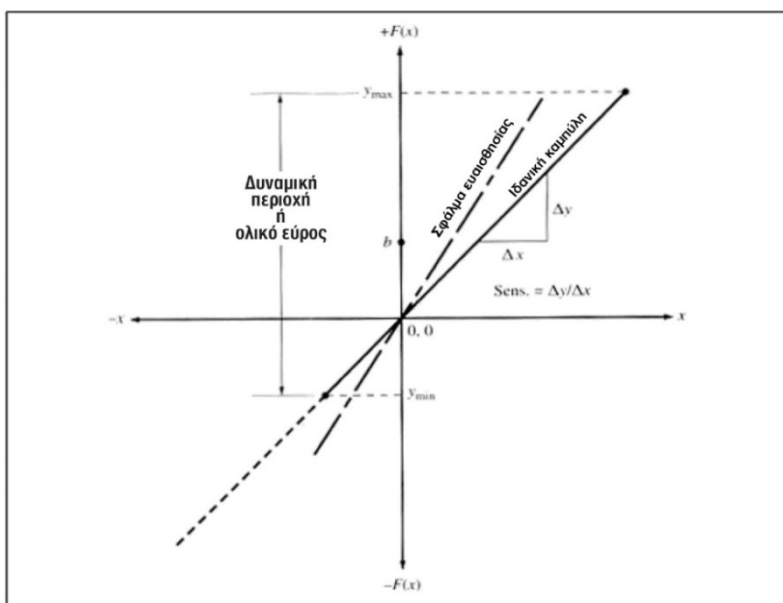
Η διακριτική ικανότητα είναι η μικρότερη ανιχνεύσιμη αυξητική μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους στην είσοδο που μπορεί να γίνει ανιχνεύσιμη στο σήμα εξόδου. Η διακριτική ικανότητα μπορεί να εκφραστεί είτε ως ποσοστό της ανάγνωσης πλήρους κλίμακας ή σε απόλυτες τιμές. Για παράδειγμα, εάν ένας αισθητήρας μετρά συγκέντρωση μέχρι 20 μmol και παρέχει έξοδο μεταξύ 1 και 100 τότε η διαχωριστικότητα της συσκευής αισθητήρα είναι 0,2 μmol .

4. Σφάλμα (Error).

Σφάλμα είναι η διαφορά μεταξύ της αληθούς (πραγματικής) τιμής του μετρούμενου και της τιμής που παράγεται από τον αισθητήρα. Σφάλμα μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία εσωτερικών και εξωτερικών πηγών και συνδέεται στενά με την ακρίβεια η οποία μπορεί να σχετίζεται με απόλυτο ή σχετικό σφάλμα. Τα σφάλματα παράγονται από διακυμάνσεις στο σήμα εξόδου και μπορεί να είναι συστηματικά (π.χ. ρεύματα ή παρεμποδίσεις από άλλα συστήματα) ή τυχαία (π.χ. τυχαίος θόρυβος). Για παράδειγμα ένας αισθητήρας δίνει μια ένδειξη μετατόπισης 29,8 mm, όταν η πραγματική τιμή είναι 30 mm, οπότε το σφάλμα είναι -0,2 mm.

5. Ευαισθησία (Sensitivity)

Η ευαισθησία του αισθητήρα ορίζεται ως η κλίση της χαρακτηριστικής καμπύλης εξόδου ($\Delta y/\Delta x$) (σχ. 1.4), ή γενικότερα η ελάχιστη είσοδος της φυσικής παραμέτρου, που θα δημιουργήσει μια ανιχνεύσιμη αλλαγή εξόδου. Σε ορισμένους αισθητήρες, η ευαισθησία ορίζεται ως η αλλαγή της παραμέτρου εισόδου που απαιτείται για την παραγωγή μιας τυποποιημένης αλλαγής εξόδου. Για παράδειγμα, αν σε ένα αισθητήρα αερίου η τάση εξόδου αυξάνεται κατά 1 V, όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου αυξάνεται κατά 1.000 ppm, τότε η ευαισθησία του αισθητήρα θα είναι 1/1.000 V/ ppm ή απλούστερα 1 mV/ ppm.



Σχήμα 1.4. Ιδανική καμπύλη και σφάλμα ευαισθησίας. Το σφάλμα ευαισθησίας (που παρουσιάζεται ως διακεκομμένη καμπύλη στο σχήμα) είναι μια απόκλιση από την ιδανική κλίση της χαρακτηριστικής καμπύλης (Carr, 1993).

6. Δυναμική περιοχή (Dynamic Range)

Οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές του μετρούμενου μεγέθους που μπορούν να μετρηθούν ως σήματα εξόδου σε ένα αισθητήρα, καλύπτουν μια περιοχή μέτρησης η οποία ονομάζεται δυναμική περιοχή ή δυναμικό εύρος. Αυτό το εύρος έχει ως αποτέλεσμα μια αξιόπιστη και ακριβή παραγωγή για τον αισθητήρα. Όλοι οι αισθητήρες έχουν σχεδιαστεί για να λειτουργούν σε ένα καθορισμένο εύρος. Σήματα έξω από αυτό το εύρος μπορεί να είναι ακατανόητα, να προκαλέσουν απaráδεκτες μεγάλες ανακρίβειες, ακόμη και να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη βλάβη στον αισθητήρα.

7. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η εκλεκτικότητα είναι η ικανότητα ενός αισθητήρα να μπορεί να διαφοροποιηθεί και να μετρήσει ένα μόνο συστατικό χωρίς παρεμπόδιση από άλλα συνυπάρχοντα συστατικά της μήτρας. Η εκλεκτικότητα αποτελεί το μέτρο εξειδίκευση της απόκρισης του αισθητήρα ως προς τη μετρούμενη ποσότητα. Για παράδειγμα, ένας αισθητήρας οξυγόνου που δεν δείχνει απόκριση σε άλλα αέρια, όπως CO, CO₂ και NO₂, μπορεί να θεωρηθεί εκλεκτικός.

8. Επαναληψιμότητα (Reproducibility)

Καθορίζει την ικανότητα ενός αισθητήρα να δίνει την ίδια τιμή εξόδου σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της ίδιας τιμής εισόδου, όταν οι λειτουργικές και περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένουν σταθερές. Η επαναληψιμότητα σχετίζεται στενά με την πιστότητα. Συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό της απόδοσης ολόκληρου του φάσματος τιμών: $\text{Επαναληψιμότητα} = (\text{μέγιστες} - \text{ελάχιστες τιμές}) \times 100 / \text{πλήρες φάσμα}$. Ο αριθμός 8-10 μετρήσεων είναι ικανοποιητικός για την εξαγωγή της επαναληψιμότητας.

9. Θόρυβος (Noise)

Οι ανεπιθύμητες διακυμάνσεις στο σήμα εξόδου του συστήματος ανίχνευσης, όταν το μέτρο δεν μεταβάλλεται, αναφέρεται ως θόρυβος. Είναι γνωστό ότι κάθε ηλεκτρικό σήμα αποτελείται από δύο επί μέρους σήματα: αυτό που ενδιαφέρει τον αναλυτή και περιέχει στη χημική ή φυσική πληροφορία και αυτό που δεν τον ενδιαφέρει (ανεπιθύμητο σήμα) που είναι ο θόρυβος. Ο θόρυβος προκαλείται από ανεπιθύμητους παράγοντες εσωτερικούς ή και εξωτερικούς παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ακρίβεια και πιστότητα του αισθητήρα π.χ. διαρροές ρευμάτων τροφοδότησης, μηχανικές δονήσεις, ηλεκτρομαγνητικά σήματα, μεταβολές στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και κυρίως μετακινήσεις φορέων του ηλεκτρισμού αποτελούν αποτελούν αιτίες πρόκλησης θορύβου.

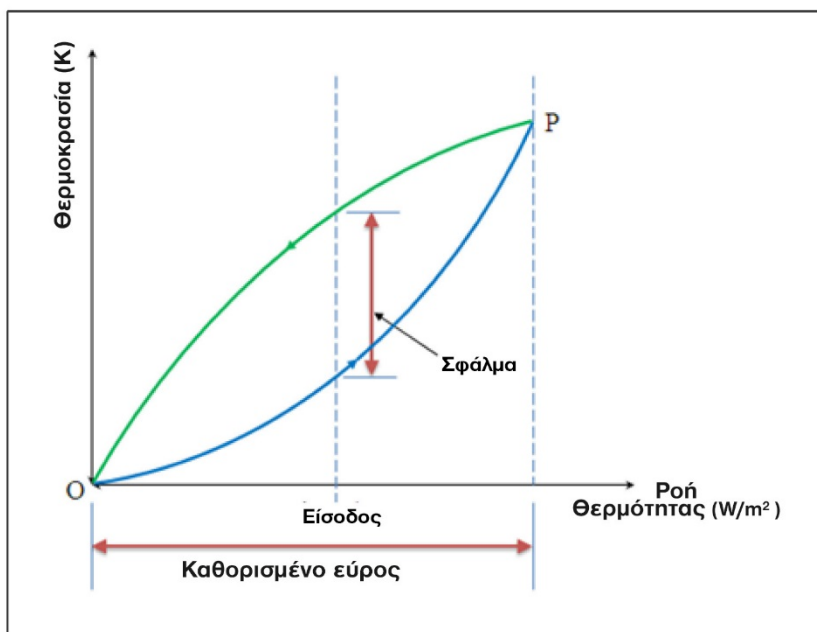
10. Ολίσθηση (Drift)

Το πρόβλημα της σταθερότητας του χημικού αισθητήρα με την πάροδο του χρόνου είναι γνωστό ως "ολίσθηση αισθητήρα". Είναι μια μονοκατευθυνόμενη μεταβολή του σήματος εξόδου του αισθητήρα, που δεν αντιπροσωπεύει αντίστοιχη μεταβολή του σήματος εισόδου, το οποίο είναι σταθερό. Η ολίσθηση παρατηρείται, όταν υπάρχει σταδιακή αλλαγή στην έξοδο του ανιχνευτή, ενώ το μετρούμενο μέγεθος (π.χ. συγκέντρωση) παραμένει σταθερό. Η ολίσθηση είναι ένα εξαιρετικό ανεπιθύμητο φαινόμενο που

εισάγει ανεπιθύμητες συνιστώσες στο μετρούμενο σήμα και οδηγεί τη μέτρηση εκτός ελέγχου. Θεωρείται συστηματικό σφάλμα και αποδίδεται γενικά στη γήρανση των αισθητήρων ή στη θερμο-μηχανική υποβάθμιση, αλλά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από μια ποικιλία πηγών, συμπεριλαμβανομένων περιβαλλοντικών παραγόντων κ.ά. Είναι σύνηθες η εκτίμηση της ολίσθησης να σχετίζεται με τη γραμμή βάσης του αισθητήρα. Εκφράζεται ως ποσοστό της απόδοσης πλήρους φάσματος. Για παράδειγμα, σε έναν αισθητήρα αερίου, η σταδιακή μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να αλλάξει την αρχική σταθερότητα.

11. Υστέρηση (Hysterisis)

Η υστέρηση είναι ένα σφάλμα του αισθητήρα η οποία ορίζεται ως η μέγιστη διαφορά στην έξοδο σε οποιαδήποτε τιμή μέτρησης εντός μιας καθορισμένης περιοχής του αισθητήρα, όταν η μετρήσιμη φυσική ποσότητα προσεγγίζεται με αύξηση στο πρώτο σημείο και στη συνέχεια μειώνεται στη είσοδο (προσεγγίζεται από αντίθετες κατευθύνσεις). Στο σχήμα 1.5 φαίνεται το σφάλμα υστέρησης που έχει συμβεί κατά τη διάρκεια μέτρησης της θερμοκρασίας με θερμοστοιχείο. Η τιμή σφάλματος υστέρησης συνήθως ορίζεται ως ένα θετικό ή αρνητικό ποσοστό του καθορισμένου εύρους εισόδου.



Σχήμα 1.5. Σφάλμα καμπύλης υστέρησης.

12. Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection)

Είναι η μικρότερη τιμή του μετρούμενου μεγέθους που μπορεί να μετρηθεί με έναν αισθητήρα με ακρίβεια, όπου ο λόγος σήματος προς θόρυβο S/N να είναι τουλάχιστον ίσος ή μεγαλύτερος από 3 ($S/N = 3$) ή η απόκριση του αισθητήρα R να είναι τουλάχιστον διπλάσια της τιμής του θορύβου $R > 2$.

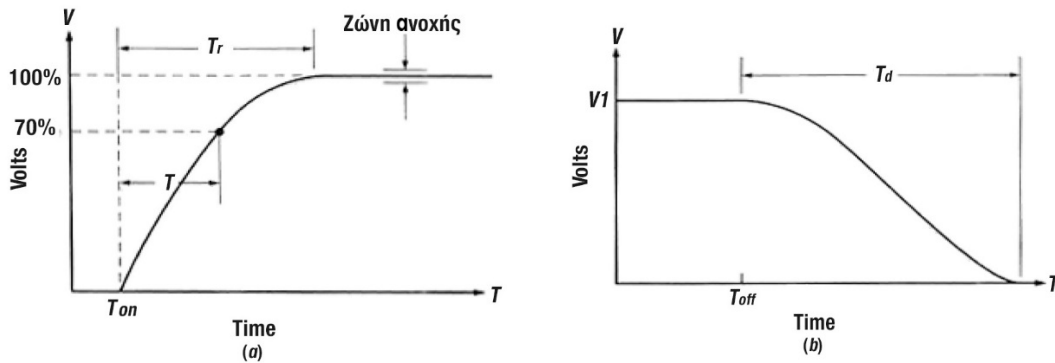
13. Σταθερότητα (Stability)

Σταθερότητα είναι η ικανότητα του αισθητήρα να παράγει την ίδια τιμή εξόδου, όταν χρησιμοποιείται για τη μέτρηση μιας σταθερής τιμής εισόδου (ίδιο μέγεθος) σε μια

χρονική περίοδο. Είναι το αντίθετο του όρου ολίσθηση που χρησιμοποιείται για να υποδείξει την αλλαγή στην τιμή εξόδου που συμβαίνει σε μια χρονική περίοδο.

14. Χρόνος απόκρισης (Response Time)

Ο χρόνος απόκρισης μπορεί να οριστεί ως ο απαιτούμενος χρόνος για την έξοδο ενός αισθητήρα, να αλλάξει από την προηγούμενη κατάσταση του, σε μια ρυθμισμένη τελική τιμή εντός της ζώνης ανοχής της σωστής νέας τιμής. Ουσιαστικά περιγράφει την ταχύτητα αλλαγής στην έξοδο για μια σταδιακή αλλαγή του μετρούμενου μεγέθους. Είναι πάντοτε καθορισμένος με μια ένδειξη του βήματος εισόδου και της εξόδου για την οποία ορίζεται ο χρόνος απόκρισης. Οι καμπύλες στο σχήμα 1.6 δείχνουν δύο τύπους χρόνου απόκρισης: (a) η καμπύλη αντιπροσωπεύει το χρόνο απόκρισης (T_r) μετά από μια απότομη θετική αλλαγή της συνάρτησης βημάτων της παραμέτρου εισόδου (b) η μορφή της καμπύλης είναι ένας χρόνος αποσύνθεσης (T_d) σε απόκριση μιας αρνητικής βηματικής αλλαγής της συνάρτησης της παραμέτρου εισόδου.

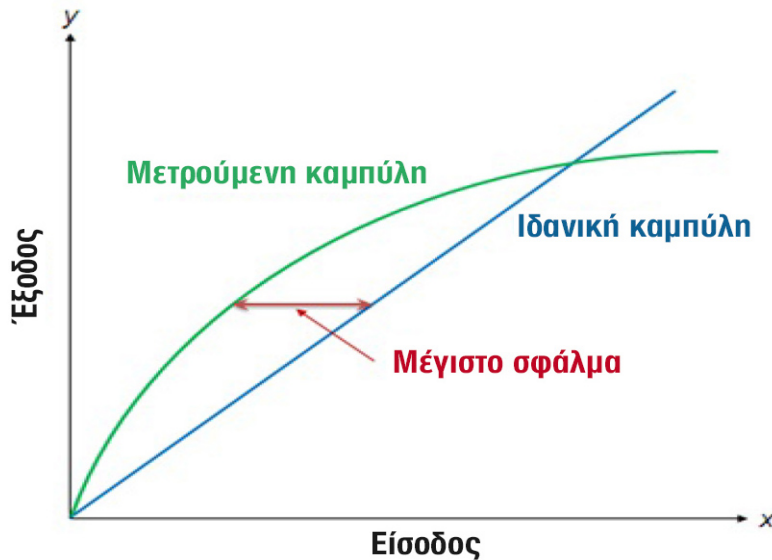


Σχήμα 1.6. (a) ορισμός χρόνου ανύψωσης, (b) ορισμός χρόνου πτώσης (Carr, 1993).

15. Γραμμικότητα (Linearity)

Είναι γενικά επιθυμητό η απόκριση του αισθητήρα να μεταβάλλεται γραμμικά με το μετρούμενο μέγεθος. Η γραμμικότητα είναι μια έκφραση του βαθμού στον οποίο η πραγματική μετρούμενη καμπύλη ενός αισθητήρα απομακρύνεται από την ιδανική καμπύλη. Το σχήμα 1.7 δείχνει μια σχέση υπερβολής μεταξύ της ιδανικής γραμμής ή γραμμής προσαρμογής των ελαχίστων τετραγώνων και της πραγματικής γραμμής μέτρησης ή γραμμής βαθμονόμησης. Η εγγύτητα της καμπύλης βαθμονόμησης σε μια συγκεκριμένη ευθεία γραμμή δείχνει τη γραμμικότητα ενός αισθητήρα. Το σφάλμα μη γραμμικότητας (nonlinearity) καθορίζεται για αισθητήρες των οποίων η καμπύλη μεταφοράς μπορεί να είναι κατά προσέγγιση ευθεία γραμμή. Η μη γραμμικότητα υποδεικνύει τη μέγιστη απόκλιση της πραγματικής μετρούμενης καμπύλης του αισθητήρα από την ιδανική καμπύλη. Η στατική μη γραμμικότητα εξαρτάται από παράγοντες περιβάλλοντος όπως θερμοκρασία, δονήσεις, επίπεδο ακουστικού θορύβου και υγρασία. Γραμμικότητα καθορίζεται συχνά ως ποσοστό (%) μη γραμμικότητας, το οποίο δίνεται από την εξίσωση: Μη γραμμικότητα (%) = μέγιστη απόκλιση εισόδου ($D_{in(max)}$) / μέγιστη πλήρη κλίμακα εισόδου ($IN_{f.s}$).

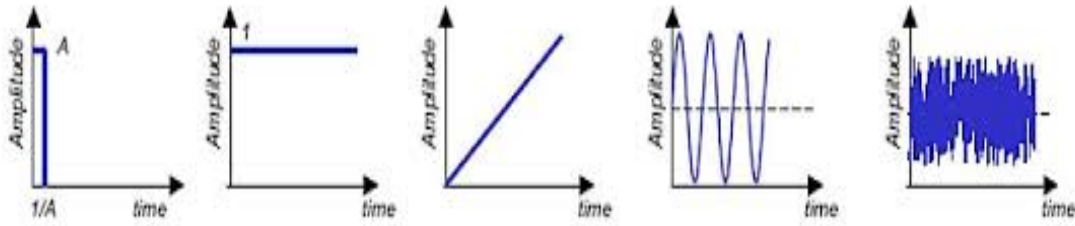
$$Nonlinearity(\%) = \frac{D_{in(max)}}{IN_{f.s}} \times 100 \quad (1.1)$$



Σχήμα 1.7. Σφάλμα μη γραμμικότητας της καμπύλης.

1.4.2 Δυναμικά χαρακτηριστικά

Υπό στατικές συνθήκες, δηλαδή σε ένα πολύ αργό μεταβαλλόμενο ερέθισμα εισόδου, ένας αισθητήρας περιγράφεται πλήρως από τα στατικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο η απόκριση ενός συστήματος ανίχνευσης σε ένα δυναμικά μεταβαλλόμενο μετρούμενο μέγεθος, διαφέρει αρκετά, όταν το μετρούμενο μέγεθος παραμένει αμετάβλητο στο χρόνο. Ο λόγος είναι ότι τόσο ο αισθητήρας όσο και η σύζευξη με την πηγή διέγερσης δεν μπορούν να ανταποκριθούν πάντα άμεσα. Εάν ο αισθητήρας δεν αποκρίνεται άμεσα, και το ερέθισμα παρουσιάζεται διαφορετικό από την πραγματικότητα, αυτό σημαίνει ότι ο αισθητήρας αποκρίνεται με ένα δυναμικό σφάλμα. Η διαφορά μεταξύ στατικού και δυναμικού σφάλματος είναι ότι το δυναμικό σφάλμα είναι πάντα εξαρτώμενο από το χρόνο (Fraden, 2010). Συνεπώς για την περιγραφή των μεταβατικών ιδιοτήτων του συστήματος ανίχνευσης, παρουσία του μεταβαλλόμενου μεγέθους, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται δυναμικά χαρακτηριστικά (Sydenham, 2014). Τα χαρακτηριστικά αυτά ασχολούνται κυρίως με το ρυθμό με τον οποίο αλλάζει η έξοδος ως απόκριση σε μια μεταβολή της μετρούμενης ποσότητας (δηλ. απόκριση του αισθητήρα σε διάφορες κυματομορφές του σήματος εισόδου), και με τον τρόπο που συμβαίνουν οι αλλαγές αυτές (Kalantar-zadeh, 2013; Sydenham, 2014). Οι κυματομορφές του σήματος εισόδου μπορεί να είναι ώθησης, βήματος, γραμμικές, ημιτονοειδείς ή θορύβου (σχ. 1.8).



Σχήμα 1.8. Κυματομορφές του σήματος εισόδου.

Τα απλούστερα και πιο μελετημένα συστήματα ανίχνευσης είναι τα γραμμικά αμετάβλητα συστήματα (linear time invariant, LTI) οι ιδιότητες των οποίων δεν αλλάζουν με το χρόνο και θα πρέπει να ικανοποιούν τις ιδιότητες της υπέρθεσης, (δηλαδή της προσθήκης δύο διαφορετικών εισόδων προς παραγωγή μιας νέας εξόδου), και της κλιμάκωσης (όταν ενισχύεται η είσοδος και αντίστοιχα ενισχύεται η έξοδος από την ίδια ποσότητα), με συνέπεια η δυναμική απόκριση του αισθητήρα να θεωρείται (τυπικά) ότι είναι γραμμική. Η συμπεριφορά ενός γραμμικού συστήματος αντιπροσωπεύεται μαθηματικά με την ακόλουθη γενική μορφή έκφρασης ως

$$a_2 d^2 y / dt^2 + a_1 dy / dt + a_0 y = x(t) \quad (1.2)$$

όπου οι συντελεστές a_2 , a_1 και a_0 είναι σταθερές που εξαρτώνται από το συγκεκριμένο σύστημα ενδιαφέροντος. Η αριστερή πλευρά της εξίσωσης είναι γνωστή ως η χαρακτηριστική εξίσωση, είναι συγκεκριμένη για τις εσωτερικές ιδιότητες του συστήματος και δεν μεταβάλλεται από τον τρόπο που χρησιμοποιείται το σύστημα. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός της δυναμικής εισόδου συνάρτησης και της χαρακτηριστικής εξίσωσης εκφράζει συλλογικά τη συνδυασμένη απόκριση εξόδου (Sydenham, 2014).

Στους υπολογισμούς είναι βολικό τα δυναμικά χαρακτηριστικά εισόδου-εξόδου να εκφράζονται με τη μορφή μιας γραμμικής διαφορικής εξίσωσης ως συνέχεια της εξίσωσης 1.2. Έτσι, συχνά ένα μη γραμμικό μαθηματικό μοντέλο γραμμικοποιείται και εκφράζεται με τη μορφή της παρακάτω εξίσωσης 1.3:

$$a_n \frac{d^n y(t)}{dt^n} + a_{n-1} \frac{d^{n-1} y(t)}{dt^{n-1}} + \dots + a_1 \frac{dy(t)}{dt} + a_0 y(t) = b_m \frac{d^{m-1} x(t)}{dt^{m-1}} + b_{m-1} \frac{d^{m-1} x(t)}{dt^{m-1}} + \dots + b_1 \frac{dx(t)}{dt} + b_0 x(t) \quad (1.3)$$

όπου $x(t)$ είναι το σήμα εισόδου (μετρούμενη ποσότητα) και $y(t)$ είναι το σήμα εξόδου και $a_0 \dots a_n$, $b_0 \dots b_m$ είναι σταθερές φυσικών παραμέτρων του συστήματος. Το $x(t)$ μπορεί να έχει διάφορες μορφές και τιμές. Όταν το σήμα εισόδου είναι μια βηματική μεταβολή, όλες οι παράγωγοι του $x(t)$ σε σχέση με το t είναι μηδέν και η προηγούμενη εξίσωση (1.3) ανάγεται σε:

$$a_n \frac{d^n y(t)}{dt^n} + a_{n-1} \frac{d^{n-1} y(t)}{dt^{n-1}} + \dots + a_1 \frac{dy(t)}{dt} + a_{n-1} + a_0 y(t) = b_1 \quad (1.4)$$

για $t \geq 0$ (ο όρος b_0 σε αυτή την περίπτωση θεωρείται μηδέν).

Στην πράξη τα συστήματα αυτά περιορίζονται σε απόκριση μηδενικής, πρώτης και δεύτερης τάξης, τα οποία αναλύονται με μετασχηματισμό Laplace, ο οποίος μετατρέπει τη

διαφορική εξίσωση σε μια πολυωνυμική έκφραση. Η εξίσωση 1.4 μπορεί να απλουστευτεί περισσότερο για τις ακόλουθες 3 περιπτώσεις:

Σύστημα μηδενικής τάξης:

Όταν η έξοδος του αισθητήρα δείχνει χωρίς καθυστέρηση απόκριση στο σήμα εισόδου, θεωρείται ότι έχουμε ένα τέλειο σύστημα μηδενικής τάξης. Στην περίπτωση αυτή, όλοι οι συντελεστές a_i εκτός από το a_0 είναι μηδενικοί με αποτέλεσμα εξίσωση (1.4) να παίρνει τη μορφή:

$$a_0 y(t) = b_1 \text{ ή απλούστερα } y(t) = K \quad (1.5)$$

όπου $K = b_1 / a_0$ και ορίζεται ως στατική ευαισθησία για ένα γραμμικό σύστημα η οποία παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από τη συχνότητα εισόδου (ιδανικό δυναμικό χαρακτηριστικό).

Σύστημα πρώτης τάξης:

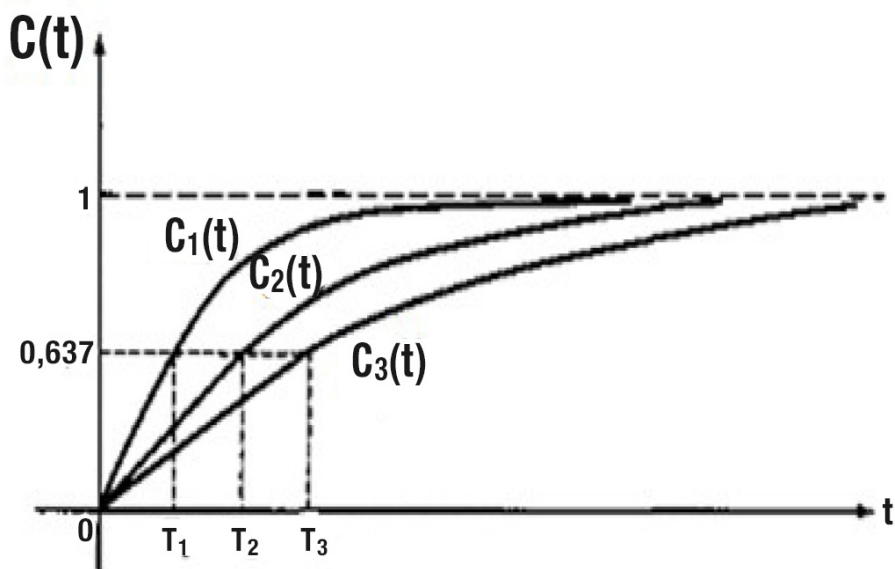
Όταν το σύστημα δεν είναι τέλειο και η έξοδος πλησιάζει σταδιακά την τελική τιμή, μπορεί να εισαχθεί μια πολυπλοκότερη τάξη και τότε το σύστημα ονομάζεται πρώτης τάξης. Μαθηματικά περιγράφεται ως εξής:

$$a_1 \frac{dy(t)}{dt} + a_0 y(t) = b_0 x(t) \Rightarrow \frac{a_1}{a_0} \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = \frac{b_0}{a_0} x(t) \quad (1.6)$$

Ο λόγος $a_1 / a_0 = \tau$ ονομάζεται σταθερά του χρόνου τ και όταν εισαχθεί στην εξίσωση 1.7 παίρνει τη μορφή μιας κοινής διαφορικής εξίσωσης πρώτης τάξης:

$$\tau \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = Kx(t) \quad (1.7)$$

Από τη λύση της εξίσωσης προκύπτει ότι η έξοδος $y(t)$ σε σχέση με το $x(t)$ πλησιάζει την τιμή της σταθεράς K μέσω ενός εκθετικού ρυθμού. Ο χρόνος τ είναι ο χρόνος που χρειάζεται να φτάσει το σήμα εξόδου περίπου στο 63% της τελικής τιμής του K $[(1 - 1/e^{-1}) = 0,637]$ όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (σχ.1.9)



Σχήμα 1.9. Καμπύλη απόκρισης $c(t)$ για σταθερές χρόνου $T_1 > T_2 > T_3$.

Σύστημα δεύτερης τάξης:

Η συνέχεια διερεύνησης της εξίσωσης 1.3 για την κατανόηση της συμπεριφοράς του συστήματος γίνεται πολυπλοκότερη, όσον αφορά την απόκριση δεύτερης τάξης, καθώς ο αριθμός των παράγωγων όρων στη μαθηματική έκφραση αυξάνεται. Η απόκριση του συστήματος σε μια βηματική λειτουργία μπορεί να ταλαντεύεται πριν φτάσει στην τελική της τιμή με αποτέλεσμα, να έχει υποστεί απόσβεση (underdamped) ή να μην έχει υποστεί απόσβεση (overdamped). Τέτοιες αποκρίσεις μπορούν να περιγραφούν καλύτερα από ένα σύστημα δεύτερης τάξης, όπου η απόκριση σε μια βηματική αλλαγή εμφανίζεται ως εξής:

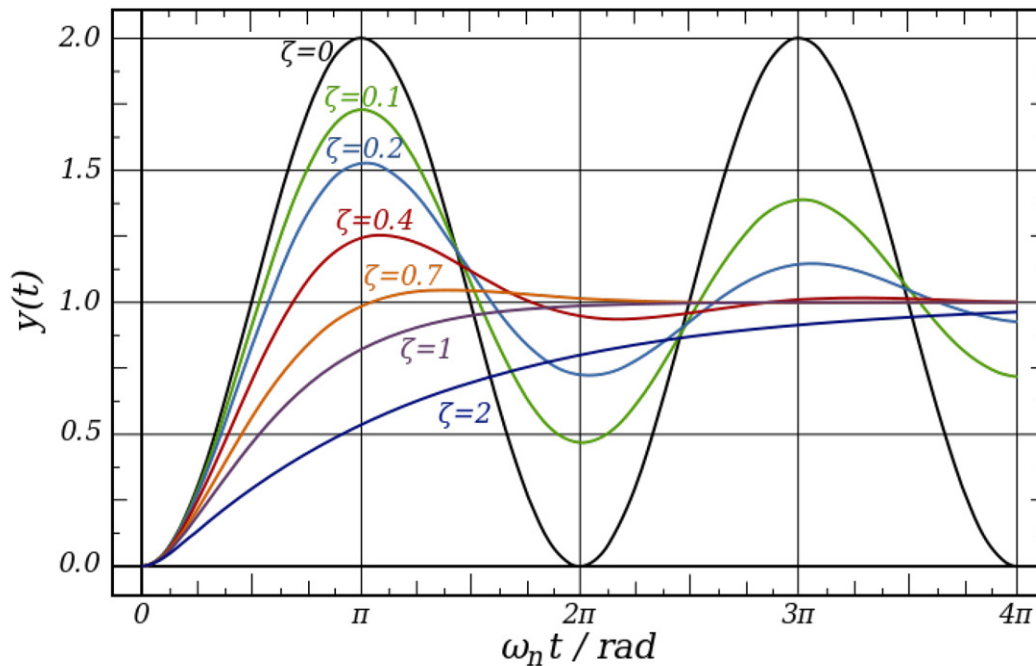
$$a_2 \frac{d^2 y(t)}{dt^2} + a_1 \frac{dy}{dt} + a_0 y(t) = b_1 \quad (1.8)$$

Με τον καθορισμό της μη αποσβησμένης φυσικής συχνότητας $\omega = a_0 / a_2$ (με διαστάσεις χρόνου) και του συντελεστή απόσβεσης του συστήματος $\zeta = a_1 / 2(a_0 a_2)^{1/2}$ (αδιάστατο μέγεθος) η εξίσωση 1.9 με τη βοήθεια του μετασχηματισμού Laplace λαμβάνει τη μορφή:

$$\frac{1}{\omega} \frac{d^2 y(t)}{dt^2} + \frac{2\zeta}{\omega} \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = K \quad (1.9)$$

Αυτό είναι ένα πρότυπο σύστημα δεύτερης τάξης σε απόκριση μιας βηματικής λειτουργίας στην οποία $K = b_1 / a_0$.

Ο συντελεστής απόσβεσης (damping) και η φυσική συχνότητα, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.10, παίζουν κεντρικούς ρόλους με τη μορφή της απόκρισης του συστήματος.



Σχήμα 1.10. Χρονική απόκριση 2ης τάξης σε διέγερση μοναδιαίας βηματικής συνάρτησης για διάφορες τιμές ζ του συντελεστή απόσβεσης.

Αν $\zeta = 0$ δεν υπάρχει απόσβεση και η έξοδος δείχνει μια σταθερή ημιτονοειδή ταλάντωση με συχνότητα ίση με τη φυσική συχνότητα. Εάν το ζ είναι σχετικά μικρό, τότε η απόσβεση είναι ελαφριά και η ταλάντωση διαρκεί πολύ χρόνο μέχρι να εξαφανιστεί (αποσβενόμενη). Όταν το $\zeta = 0,707$ το σύστημα είναι εξαιρετικά αποσβεσμένο. Ένα κρίσιμο σύστημα απόσβεσης συγκλίνει στο μηδέν ταχύτερα από οποιαδήποτε άλλη κατάσταση χωρίς καμία ταλάντωση. Όταν το ζ είναι μεγάλο η απόσβεση εξαφανίζεται (δεν υπάρχει) και η απόκριση είναι υπεραποσβενόμενη (overdamped). Άλλες παράμετροι απόκρισης περιλαμβάνουν: χρόνο ανόδου (t_r), μέγιστη υπερύψωση M_p (maximum percent overshoot), χρόνο έως την πρώτη κορυφή t_p (peak time) και χρόνο αποκατάστασης t_s (settling time) που είναι ο χρόνος που έχει παρέλθει, από όταν η βηματική είσοδος εφαρμόζεται στον χρόνο με τον οποίο η έξοδος του ενισχυτή παραμένει εντός συγκεκριμένης ζώνης σφάλματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Οι πρωτότυποι μηχανισμοί χημικής αναγνώρισης (chemical recognition) των οργανισμών αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία τη δεκαετία του 1980 (*Thompson and Krull, 1984; Janata and Bezegh, 1988*) και από τότε υπήρξε ραγδαία ανάπτυξη της φυσικής αναλυτικής χημείας με εφαρμογές που επεκτείνονται τόσο στην Περιβαλλοντική Χημεία όσο και στην Ιατρική. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μικροαισθητήρες παρακολούθησης αποβλήτων, νερού και αέρα και αντίστοιχα της μηχανικής των ιστών με ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών εφαρμογών, όπως το τεχνητό πάγκρεας και ο πνεύμονας. Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη χημική αναγνώριση στους οργανισμούς, ενώ έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί. Η έννοια της χημικής αναγνώρισης στους οργανισμούς περιγράφεται μεταξύ μορίων-διεγερτών και μορίων-υποδοχέων, όπου τα μόρια-υποδοχείς είναι συνήθως μόρια πρωτεϊνικής φύσεως ενσωματωμένα στις κυτταρικές μεμβράνες.

Διάφορες υποθέσεις και πρότυπα για τη δομή των βιολογικών μεμβρανών έχουν περιγραφεί. Το 1972 οι Singer και Nicolson πρότειναν το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (fluid mosaic model) ως γενικό πρότυπο οργάνωσης της δομής των βιολογικών μεμβρανών (σχ. 2.1). Ουσιαστικά το μοντέλο αυτό προτείνει μια ρευστή διπλοστοιβάδα από φωσφολιπίδια στην οποία οι διάφορες πρωτεΐνες σχηματίζουν μωσαϊκό με διαφορετικές τοποθετήσεις μέσα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων. Άλλες πρωτεΐνες είναι τελείως μέσα στα λιπίδια, άλλες διεισδύουν στη διπλοστοιβάδα μόνο μέχρι ενός σημείου, και άλλες βυθίζονται από τη μια ή την άλλη πλευρά της επιφάνειάς της. Τέλος, μερικές διαπερνούν τη διπλοστοιβάδα και προέχουν κι από τις δύο επιφάνειες (*Singer and Nicolson, 1972*).

Παρόλο που το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού υπήρξε αξιοσημείωτα συνεπής ως προς τα δεδομένα που είχαν συλλεχθεί από τις αρχές της δεκαετίας του 1960, ήταν αναπόφευκτο το αρχικό μοντέλο να μη μπορεί να εξηγήσει όλα τα δεδομένα σε κάθε επόμενη μελέτη και ειδικά στις μεμβράνες που βρίσκονται σε εξειδικευμένους ιστούς και κύτταρα. Από τις αναθεωρήσεις που έγιναν το αρχικό μοντέλο του 1972 βελτιώθηκε και μετονομάστηκε σε μοντέλο ρευστού μωσαϊκού μεμβράνης (Fluid Mosaic Membrane Model, F-MMM) για να φαίνεται ο σημαντικός ρόλος του μωσαϊκού, της συνάθροισης και των δομών του πεδίου σε μεμβράνες και συστήματα συγκράτησης στις ελεύθερες πλευρικές κινήσεις ορισμένων συστατικών (*Nicolson, 2013*).



Σχήμα 2.1. Το μοντέλο κυτταρικής μεμβράνης *Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Membrane* τρισδιάστατης απεικόνισης όπως προτάθηκε το 1972. Στην εικόνα αυτή της κυτταρικής μεμβράνης τα στερεά σώματα με διαγραμμισμένες επιφάνειες κοπής αντιπροσωπεύουν σφαιρικές ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης, τυχαία κατανεμημένες στο επίπεδο της μεμβράνης. Ορισμένες ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης, όπως φαίνεται στο σχήμα, σχηματίζουν συγκεκριμένα ολοκληρωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στην υγρή διπλοστοιβάδα λιπιδίων.

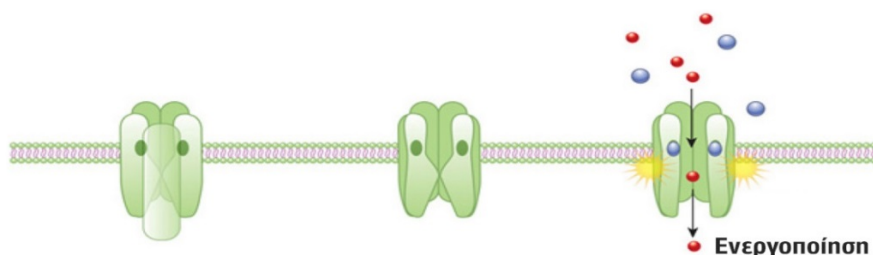
Το μωσαϊκό των πρωτεϊνών δεν είναι στατικό και καθορισμένο, διότι οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχέονται πλάγια, δηλαδή προς δύο διευθύνσεις. Η μη ισότιμη διάχυση πρωτεϊνών προσδίδει στη μεμβράνη ένα ασύμμετρο χαρακτήρα που εξυπηρετεί διαφορετικούς μηχανισμούς λειτουργίας, ένας εκ των οποίων είναι και η διάχυση των ιόντων Na^+ και K^+ . Μελέτες με τεχνικές περίθλασης ακτίνων Χ και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, έδειξαν ότι όλες οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν πανομοιότυπη βασική δομή αποτελούμενη κυρίως από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες μπορεί να βρίσκονται στην περιφέρεια της μεμβράνης (εξωτερικές, *extrinsic*) ή να είναι ενσωματωμένες μέσα στη μεμβράνη (εσωτερικές, *intrinsic*) (Yeagle, 2012). Τα φωσφολιπίδια λόγω του αμφίτροπου χαρακτήρα τους σχηματίζουν αυθόρμητα αντικριστές μονοστοιβάδες. Αυτές περιέχουν αμφίφιλα μόρια καθένα από τα οποία αποτελείται από μία πολική περιοχή και μια μη πολική υδρογονανθρακική αλυσίδα με περισσότερα από 14 έως και 20 ανθρακάτομα. (Fisher and Branton 1974). Το υδρόφιλο τμήμα των μορίων (πολικές κεφαλές) διατάσσεται προς το υδατικό περιβάλλον σχηματίζοντας δύο υδρόφιλες επιφάνειες, ενώ το υδρόφοβο τμήμα λαμβάνει τέτοια θέση προς το εσωτερικό της μεμβράνης, ώστε να αποφεύγεται η υδατική επαφή (Thompson and Krull, 1984). Έτσι δημιουργείται μια διπλοστοιβάδα μορίων που ονομάζεται διστρωματική λιπιδική μεμβράνη. Όλες σχεδόν οι μεμβράνες διατηρούν μια σταθερή διαφορά δυναμικού ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον εξωκυτταρικό χώρο. Η διαφορά δημιουργείται από την άνιση κατανομή ιόντων Na^+ , K^+ , Cl^- και οργανικών ανιόντων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. Η επίδραση ενός ερεθίσματος δημιουργεί, μέσω ενός ξεχωριστού μηχανισμού για κάθε τύπο κυττάρου, μια αλλαγή στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Το δυναμικό αυξάνεται όταν υπάρχει είσοδος θετικών ιόντων (Na^+ , Ca^{2+}) και μειώνεται με την εισαγωγή αρνητικών ιόντων (Cl^-).

Είναι απολύτως εξακριβωμένο ότι η δομή των κυτταρικών μεμβρανών περιέχει ενσωματωμένα πρωτεϊνικά μόρια-υποδοχής, ικανά να αναγνωρίσουν άλλα μόρια-διεγέρτες. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο οι μοριακές αλληλεπιδράσεις στην κυτταρική μεμβράνη μετατρέπονται σε νευρικά ερεθίσματα, μέχρι σήμερα δεν έχει εξακριβωθεί επακριβώς. Το φαινόμενο της δέσμευσης ενός μορίου-διεγέρτη από μία πρωτεΐνη, συνοδεύεται από αλλαγές στη δομή και διαμόρφωση της πρωτεΐνης και προκαλεί το άνοιγμα ενός αγωγικού καναλιού από ιόντα (ion channel) κατά μήκος της διστρωματικής λιπιδικής διαμεμβράνης (transmembrane). Τα κανάλια ιόντων είναι οι πρωτεΐνες που βρίσκονται τοποθετημένες στη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη και οι οποίες σχηματίζουν δόδους ή πόρους, που επιτρέπουν επιλεκτικά υπό την επίδραση ηλεκτρικού ή ηλεκτροχημικού δυναμικού, να περάσει μέσω αυτών ένα δεδομένο είδος ιόντος από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Σε αντίθεση με τους μεταφορείς ιόντων, τα κανάλια ιόντων είναι παθητικά, πράγμα που σημαίνει ότι δεν απαιτούν πηγή ενέργειας για να λειτουργήσουν. Αυτό σημαίνει, ότι για να εμφανιστεί μια καθαρή ροή ιόντων το κύτταρο πρέπει στο εσωτερικό του και στο εξωτερικό του, να βρίσκεται εκτός ισορροπίας. Η δύναμη που οδηγεί τα ιόντα μέσω ενός καναλιού ιόντων είναι ένας συνδυασμός του ηλεκτρικού δυναμικού της λιπιδικής μεμβράνης που ονομάζεται δυναμικό δράσης και της συγκέντρωσης ιόντων στη μεμβράνη. Ο συνδυασμός αυτών των δύο αποτελεσμάτων ονομάζεται ηλεκτροχημική βαθμίδωση. Η κατάσταση στην οποία οι δύο αυτές δυνάμεις ισορροπούν και η ισορροπία εμφανίζεται, ονομάζεται εξίσωση Nernst και εφαρμόζεται χωριστά σε κάθε είδος ιόντος γύρω από τη μεμβράνη

$$\Delta V = V_{in} - V_{out} = -\frac{k_B T}{ze} \ln \left[\frac{c_{in}}{c_{out}} \right] \quad (2.1)$$

όπου ΔV είναι το διαμεμβρανικό δυναμικό, k_B η σταθερά Boltzmann, T είναι η θερμοκρασία, e είναι το στοιχειώδες φορτίο, z είναι το σθένος ιόντων (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- κ.λπ.) και c_{in} και c_{out} είναι οι συγκεντρώσεις των ιόντων στην είσοδο και έξοδο του κυττάρου.

Συνεπώς η μεταγωγή ιόντων αποτελεί φορέας χημικού σήματος και με τον τρόπο αυτό τα εξωκυτταρικά γεγονότα μετατρέπονται σε ενδοκυτταρικά σήματα και πληροφορίες, τα οποία μετά διοχετεύονται στο νευρικό σύστημα. Η εκλεκτική αναγνώριση διαφόρων υποστρωμάτων οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρικού παλμού, ο οποίος προκαλεί μεταβολές στην αγωγιμότητα των καναλιών από ιόντα και κατ' επέκταση στην αγωγιμότητα της ίδιας της λιπιδικής μεμβράνης. Στο σχήμα 2.2 που ακολουθεί φαίνεται η ενεργοποίηση υποδοχέα διαύλου ιόντων.



Σχήμα 2.2. Ένας υποδοχέας ακετυλοχολίνης (πράσινο) σχηματίζει ένα διάυλο με ιόντα στο πλάσμα μεμβράνης. Ο υποδοχέας αυτός είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης με ένα υδατικό πόρο

που σημαίνει ότι, όταν είναι ανοικτός επιτρέπει τη διέλευση διαλυτών υλικών εγκάρσια στο πλάσμα της μεμβράνης. Όταν δεν υπάρχει εξωτερικό σήμα, ο πόρος είναι κλειστός (στο κέντρο). Όταν τα μόρια της ακετυλοχολίνης (μπλε) δεσμεύονται στον υποδοχέα, αυτό ενεργοποιεί μια προσαρμοστική αλλαγή, που ανοίγει τον υδατικό πόρο και επιτρέπει τη ροή των ιόντων (κόκκινο) μέσα στο κύτταρο.

Παρόλο που ο μηχανισμός διάχυσης των ιόντων έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, δεν είναι επακριβώς γνωστός. Η ανακάλυψη της δομής του KcsA συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού αγωγιμότητας ιοντικών καναλιών και κέρδισε το βραβείο Νόμπελ χημείας το 2003 (Mackinnon, 2004). Ανεξαρτήτως όμως αυτού, τα φαινόμενα διάχυσης των ιόντων μέσω καναλιών έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για την ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης, ιδίως τοξικών ουσιών στην Περιβαλλοντική Χημεία και στη Χημεία Τροφίμων. Η κατασκευή στο εργαστήριο ενός βιομιμητικού συστήματος που θα απεικονίζει, σε απλή μορφή, το κύτταρο και στο οποίο μπορεί να γίνεται εφαρμογή των διαδικασιών και των μηχανισμών αναγνώρισης που απαντώνται στη φύση, θα οδηγήσει στην κατασκευή χημικών αισθητήρων, με αυξημένη εκλεκτικότητα, ευαισθησία, αντιστρεπτότητα και ταχύτητα ανάλυσης, ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις φυσικές κυτταρικές διεργασίες.

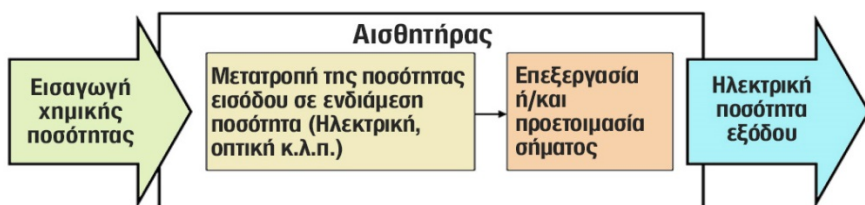
Ιστορικό. Η φυσιολογική λειτουργία των διαύλων ιόντων είχε παρατηρηθεί πολύ πριν γίνει γνωστό, ότι υπάρχουν. Πολλά κύτταρα, όπως τα κύτταρα των νεύρων και των μυών, ήταν γνωστό ότι είχαν ευερέθιστες κυτταρικές μεμβράνες που ανταποκρίνονταν στις μεταβολές δυναμικού της ηλεκτρικής μεμβράνης. Από τη μελέτη διάδοσης του ηλεκτρικού σήματος επί ενός επιμηκυμένου νευρικού κυττάρου (από γιγαντιαίο καλαμάρι) που έφθανε πάνω έως 6 mm σε μήκος (Hodgkin and Huxley, 1952) παρατηρήθηκε ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα Na⁺ και K⁺ άλλαζε απότομα, όταν άλλαζε το ηλεκτρικό δυναμικό της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης πέρα ενός ορίου. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα ρεύματα για Na⁺ και K⁺ είναι ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, υπονοώντας ότι οι νευρικές μεμβράνες περιέχουν ειδικά κανάλια για μεταβίβαση Na⁺ και K⁺, ενώ κάτι στη μεμβράνη ρυθμίζει ποια είδη ιόντων θα μπορούσαν να τα διασχίσουν τα κανάλια και πότε. Τέλος αποδείχτηκε, ότι οι ρυθμιστές της διέλευσης ιόντων σε βιολογικές μεμβράνες ήταν εξειδικευμένες πρωτεΐνες που ονομάζονται κανάλια ιόντων.

2.2 Χημικοί αισθητήρες

Οι Χημικοί αισθητήρες είναι συσκευές που μετατρέπουν τη συγκέντρωση στοχευμένων ενώσεων σε "αναλυτικό" σήμα. Ο όρος αναλυτικό σήμα σημαίνει την έννοια της μετρησιμότητας, δηλαδή ο χημικός αισθητήρας είναι μια συσκευή που μετατρέπει τη χημική πληροφορία σχετικά με τη συγκέντρωση της ενώσεως-στόχου σε αναλυτικό σήμα. Αποτελεί ενιαία αναλυτική διάταξη η οποία φέρει ένα μη βιολογικό παράγοντα ανίχνευσης ενσωματωμένο σε ένα φυσικό ανιχνευτή όπως π.χ ηλεκτρόδιο, οπτική ίνα κ.λπ. Πεποίθηση των συγγραφέων είναι ότι ο ορισμός πρέπει να επεκταθεί ότι οι χημικοί αισθητήρες είναι συσκευές μικρού μεγέθους που περιέχουν ένα στοιχείο αναγνώρισης,

ένα στοιχείο μετατροπής και έναν επεξεργαστή σήματος ικανό συνεχώς και αντιστρεπτώς να αναφέρει τη χημική συγκέντρωση” (Wolfbeis, 1990). Επειδή δεν υπάρχει καθολικά αποδεκτός ορισμός για το χημικό αισθητήρα, προτείνεται από τους χημικούς ως καταλληλότερος ο ορισμός κατά Cambridge (Cammann, 1996) που είναι ο ακόλουθος: **“χημικοί αισθητήρες είναι μικροσκοπικές συσκευές οι οποίες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο και on-line σχετικά με την παρουσία συγκεκριμένων ενώσεων ή ιόντων ακόμη σε πολύπλοκα δείγματα”**.

Όταν ένας χημικός αισθητήρας χρησιμοποιείται ως αναλυτικό εργαλείο το πρώτο βήμα είναι η επιλεκτική αναγνώριση των ειδών που ενδιαφέρουν τη συγκεκριμένη εφαρμογή (δηλαδή τον αναλύτη). Η ηλεκτρονική συνδέεται άμεσα με τους αισθητήρες γιατί επιτρέπει όχι μόνο τη μέτρηση, αλλά και την αποτελεσματική χρήση των αποκτώμενων πληροφοριών. Παραδείγματα αυτών είναι η αποθήκευση, η επεξεργασία, η επικοινωνία, και η ενεργή αξιοποίηση των πληροφοριών για τις μηχανές ελέγχου.



Σχήμα 2.3. Σχηματικό διάγραμμα αρχής αισθητήρα που παράγει μια ηλεκτρική έξοδο σε απόκριση της παρουσίας μιας ποσότητας εισόδου.

Οι χημικοί αισθητήρες ταξινομούνται στις δύο προαναφερόμενες γενικές μεγάλες κατηγορίες, τους άμεσους και έμμεσους (Fraden, 2010). Ένας εναλλακτικός και πιο εξειδικευμένος τρόπος ταξινόμησης, που έχει ως βάση τις αρχές ανίχνευσης που χρησιμοποιεί ο καθένας, τους διακρίνει σε τέσσερις κατηγορίες: οπτικούς, θερμικούς, βαρυμετρικούς και ηλεκτροχημικούς (Hulanicki, Geab and Ingman, 1991; Janata et al., 1998).

Οι οπτικοί αισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής μιας οπτικής ιδιότητας του αναλύτη (απορρόφηση, ανάκλαση, χημειοφωταύγεια, φθορισμός) που προκαλείται κατά τη διαδικασία της χημικής αναγνώρισης και η οποία έχει σχέση με τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Οι θερμικοί αισθητήρες. Η θερμοκρασία είναι το μέτρο της μέσης κινητικής ενέργειας των μορίων ενός αερίου υγρού ή στερεού. Οι θερμικοί αισθητήρες βασίζονται στη μεταβολή της θερμοκρασίας η οποία είναι απόρροια της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται κατά τη χημική αναγνώριση του αναλύτη.

Οι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες στηρίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο (piezoelectric effect) σύμφωνα με το οποίο, όταν συμπιέζεται ή εφελκύεται ένας κρύσταλλος, μετατοπίζονται οι θέσεις των θετικών και αρνητικών φορτίων του και έτσι εμφανίζεται στα άκρα του μία ποσότητα φορτίου (θετικού στο ένα άκρο και αρνητικού στο άλλο άκρο), δηλαδή διαφορά δυναμικού. Στην περίπτωση των Επιφανειακών Ακουστικών

Κυμάτων, που είναι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες, δημιουργείται ένα ακουστικό κύμα και μετρώνται οι μεταβολές στις αρχικές ιδιότητες των κυμάτων.

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες συσχετίζουν τη μετρούμενη μεταβολή του ηλεκτρικού μεγέθους (δυναμικό, αγωγιμότητα ηλεκτρικό ρεύμα) που αναπτύσσεται κατά τη διαδικασία της χημικής αναγνώρισης, με τη σύνθεση ενός συστήματος σε πραγματικό χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται συνδέοντας μια χημική εκλεκτική στοιβάδα (το στοιχείο χημικής αναγνώρισης) με έναν ηλεκτροχημικό μετατροπέα. Με αυτό τον τρόπο, η χημική ενέργεια της επιλεκτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του χημικού είδους και του αισθητήρα μετατρέπεται σε ένα χρήσιμο αναλυτικά σήμα, που σχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Υπάρχουν διαφορετικές οικογένειες ηλεκτροχημικών αισθητήρων (*Stradiotto, Yamanaka and Zanoni, 2003; Bakker and Qin, 2006*) οι οποίες αναγνωρίζονται από το ηλεκτρικό τους μέγεθος: *ποντεσιομετρικοί* (μεταβολή δυναμικού μεμβράνης), *αγωγιμομετρικοί* (μεταβολή αγωγιμότητας), *βολταμετρικοί* (μεταβολή ρεύματος για ηλεκτροχημική αντίδραση με την εφαρμοζόμενη τάση) ή *αμπερομετρικοί* αντίστοιχα που μετρούν τη μεταβολή του ρεύματος με το χρόνο σε σταθερό εφαρμοζόμενο δυναμικό.

2.3 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι χημικοί αισθητήρες στους οποίους το σύστημα αναγνώρισης χρησιμοποιεί ένα βιοχημικό μηχανισμό (*Cammann et al., 1996*). Η πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα παρουσιάστηκε από τους Clark και Lyons το 1962 και βασίστηκε σε ένα ενζυμικό ηλεκτρόδιο αποτελούμενο από ένα ακινητοποιημένο ένζυμο πάνω σε ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Από τότε ακολούθησαν εκτεταμένες μελέτες σχεδιασμού και εξέλιξης των βιοαισθητήρων με διαφορετικές προσεγγίσεις τόσο στο θέμα κατασκευής όσο και εφαρμογών. Ουσιαστικά η ανάπτυξή τους υπαγορεύτηκε από τις ανάγκες ιατρικής διάγνωσης και ταχείας ανάλυσης κλινικών δειγμάτων (*Γηρούση, 2015*). Οι πολλές και διαφορετικές παράμετροι που χαρακτηρίζουν τους βιοαισθητήρες έδωσαν τη δυνατότητα για πολλαπλούς ορισμούς. Οι ορισμοί των βιοαισθητήρων είναι κάπως διαφορετικοί από τους αντίστοιχους χημικούς, αλλά οι περισσότεροι από αυτούς συμφωνούν ότι η διάκριση τους από τους χημικούς αισθητήρες, προκύπτει από το γεγονός, ότι χρησιμοποιούν ένα βιολογικό ή βιοενεργειακό συστατικό όπως ένα ένζυμο, ένα αντίσωμα, ένα πολυνουκλεϊκό οξύ ή ακόμη και ολόκληρα κύτταρα ή λεπτά τμήματα ιστού ως στοιχείο υποδοχέα για μοριακή αναγνώριση. Ως εκ τούτου, **ένας βιοαισθητήρας μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ειδικός τύπος χημικού αισθητήρα**. Πρόσφατα, ο ορισμός των βιοαισθητήρων επεκτάθηκε σε συστήματα που μπορούν να ανιχνεύσουν και να προσδιορίσουν βιολογικά είδη, για παράδειγμα κάνοντας χρήση μοριακών αποτυπωμένων πολυμερών (molecularly imprinted polymer, MIPs). Έτσι π.χ. το ηλεκτρόδιο pH που είναι ικανό να ανιχνεύει το pH του αίματος δεν είναι βιοαισθητήρας, επειδή δεν χρησιμοποιεί βιολογικό αποδέκτη και ούτε ανιχνεύει ένα βιολογικό είδος, αλλά ένα χημικό είδος, το πρωτόνιο. Από την άλλη πλευρά, ένας αισθητήρας γονιδίου για ιόντα μόλυβδου στο πόσιμο νερό είναι ένας βιοαισθητήρας (*Nagl and Wolfbeis, 2015*).

Ορισμοί: Ο βιοαισθητήρας είναι μια ενιαία αναλυτική διάταξη η οποία περιλαμβάνει ενσωματωμένο έναν παράγοντα βιοαναγνώρισης, ο οποίος μπορεί να είναι ένα βιολογικό υλικό προσαρμοσμένο σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη ή ένα μικροσύστημα παροχής αναλυτικής πληροφορίας. Το μικροσύστημα αυτό μπορεί να είναι οπτικό, ηλεκτροχημικό, θερμομετρικό ή μαγνητικό (*Thevenot et al., 1999*).

Σύμφωνα με τους Daunert κ.ά ένας βιοαισθητήρας είναι μια συσκευή μέτρησης ή ένα σύστημα που αποτελείται από ένα βιολογικό στοιχείο ανίχνευσης, το οποίο αναγνωρίζει μια χημική ή φυσική αλλαγή, σε συνδυασμό με ένα στοιχείο μεταγωγής που παράγει ένα μετρήσιμο σήμα σε απόκριση στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Τα αισθητήρια στοιχεία περιλαμβάνουν αντισώματα, νουκλεϊνικά οξέα, ένζυμα, διαύλους ιόντων και διπλοστοιβάδες λιπιδίων (*Daunert et al., 2000*).

Σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC, ο **βιοαισθητήρας** είναι μια **αυτόνομη και ολοκληρωμένη συσκευή** η οποία είναι ικανή να παρέχει εξειδικευμένες ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα **βιολογικό αναγνωριστικό στοιχείο (βιοχημικό υποδοχέα)** που διατηρείται σε άμεση χωρική επαφή με το μεταλλάκτη (*Thevenot et al., 2001*).

Στην ελληνική βιβλιογραφία (*Γηρούση, 2005*) ο βιοαισθητήρας ορίζεται «ως μια αναλυτική διάταξη η οποία αξιοποιεί ένα βιολογικό υλικό (βιοσυστατικό) ή ένα «βιομιμητικό υλικό» (biomimetic) ως μόριο αναγνώρισης, το οποίο είτε συνδέεται είτε ενσωματώνεται σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος με στόχο την παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος ανάλογου προς τη συγκέντρωση του αναλύτη». Τα βιολογικά υλικά μπορεί να είναι ιστοί, οργανίδια, μικροοργανισμοί, νουκλεϊνικά οξέα, DNA, ένζυμα, αντισώματα κ.λπ., και τα βιομιμητικά υλικά μπορεί να είναι καταλύτες, χημικά αντιδραστήρια, συνθετικοί υποδοχείς κ.ά. (*Γηρούση, 2005*).

Υπάρχουν περιορισμοί ως προς τη χρήση του όρου «βιοαισθητήρα». Δεδομένου ότι ο βιοαισθητήρας είναι μια αυτόνομη ολοκληρωμένη συσκευή, θα πρέπει να υπάρχει σαφής διάκριση από ένα βιοαναλυτικό σύστημα που ενσωματώνει πρόσθετα στάδια διαχωρισμού, όπως π.χ. συμβαίνει στην *υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης* (HPLC) με επιπρόσθετη επεξεργασία hardware υλικού/ ή και δείγματος, ή όπως συμβαίνει π.χ. στην *ανάλυση με έκχυση σε ροή* (flow injection analysis, FIA) με την εισαγωγή ενός ειδικού αντιδραστηρίου. Έτσι, ένας βιοαισθητήρας θα πρέπει να είναι μια αναλυτική συσκευή χωρίς αντιδραστήριο, αν και η παρουσία κάποιων συν-υποστρωμάτων του περιβάλλοντος, όπως νερό για υδρολάσες ή οξυγόνο για οξειδοοξειδοκτάσες, μπορεί να απαιτηθεί για τον προσδιορισμό του αναλύτη. Από την άλλη πλευρά, ο βιοαισθητήρας μπορεί να παρέχει, ως μέρος ενός ολοκληρωμένου συστήματος μερικά στάδια διαχωρισμού ή ενίσχυσης που επιτυγχάνονται από εσωτερικές ή εξωτερικές μεμβράνες ή στοιβάδες αντίδρασης (*Thevenot et al., 2001*). Συμπερασματικά, ένα σύστημα HPLC ή FIA μπορεί να ενσωματώσει έναν βιοαισθητήρα ως συσκευή ανίχνευσης, με τη FIA να θεωρείται συχνά ότι είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση της αναλυτικής απόδοσης του βιοαισθητήρα. Αντίθετα, ένα σύστημα FIA που περιέχει μια δεξαμενή αντιδραστηρίου, έναν ενζυματικό ή ανοσολογικό αντιδραστήρα και έναν ηλεκτροχημικό αισθητήρα, δεν είναι βιοαισθητήρας. Λόγω της ικανότητας που έχουν οι βιοαισθητήρες για επανειλημμένη βαθμονόμηση, προτείνεται να

διαχωρίζεται σαφώς ένας βιοαισθητήρας από ένα βιοαναλυτικό σύστημα, το οποίο απαιτεί πρόσθετα στάδια επεξεργασίας, όπως η προσθήκη αντιδραστηρίου (*Thevenot et al., 2001*). Μια συσκευή η οποία μετά από μία μέτρηση (δηλαδή μια χρήση) δεν μπορεί να παρακολουθεί συνεχώς τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας ή μπορεί αλλά μετά από ταχεία και αναπαραγωγίμη αναγέννηση, χαρακτηρίζεται *βιοαισθητήρας μιας χρήσης*.

Όπως αναφέρεται στο Κεφ. 1 § 1.2, τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένας βιοαισθητήρας είναι:

(α) **Ο αποδέκτης ή υποδοχέας** που είναι το **στοιχείο μοριακής αναγνώρισης** (molecular recognition element), το οποίο αποτελείται από κάποιο βιολογικό μόριο (ιστός, ένζυμο, αντίσωμα, νουκλειικό οξύ, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας) ή κάποιο στοιχείο βιολογικής προέλευσης ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του μεταλλάκτη. Η χρήση βιολογικών μορίων ή βιολογικών παραγόντων ως στοιχείο αναγνώρισης παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιοαισθητήρα με τον αναλύτη-στόχο παρουσία άλλων ενώσεων με παρόμοια δομή. Το ακινητοποιημένο βιολογικό μόριο επιλεκτικά αλληλεπιδρά με τον αναλύτη και είτε τον αποικοδομεί είτε το ίδιο το μόριο υφίσταται μεταβολή στη δομή του ή στις βιολογικές ή φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να μετατραπούν σε αναλυτικά σήματα.

(β) **Ο μεταλλάκτης σήματος ή μεταγωγέας**, δηλαδή ο φυσικός ανιχνευτής είναι απαραίτητος για τη μετατροπή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής μεταβολής, που προκύπτει από τη διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης της ουσίας-στόχου από το βιολογικό υλικό, σε ένα ηλεκτρικό σήμα που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αναλύτη. Ο μεταλλάκτης λειτουργεί με φυσικοχημικό τρόπο και συνδυάζει την εξειδίκευση και εκλεκτικότητα του βιολογικού τμήματος με τον μικροεπεξεργαστή και το ηλεκτρικό τμήμα του βιοαισθητήρα που καταγράφει το σήμα και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων (*Mehvar-Abdi, 2004*).



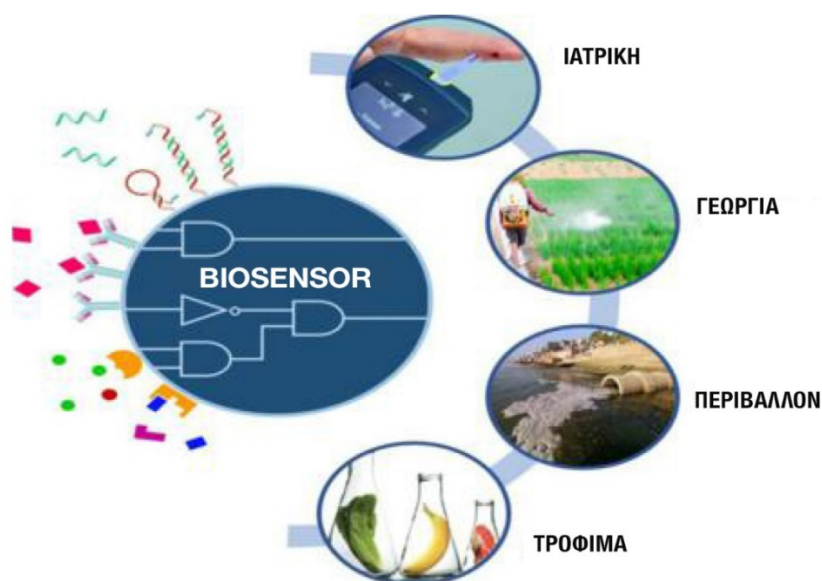
Σχήμα 2.4. Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα.

Η ικανότητα των βιολογικών μορίων να αντιδρούν με συστατικά πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων επιτρέπει στους βιοαισθητήρες να χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου του περιβάλλοντος και των βιολογικών διεργασιών, του ποιοτικού ελέγχου των τροφίμων, της γεωργίας, των στρατιωτικών και ιδιαίτερα των ιατρικών εφαρμογών. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα στο εμπόριο συστήματα βιοαισθητήρων εφαρμόζονται στις κλινικές και φαρμακευτικές αγορές. Ως εκ τούτου, η πλειονότητα της έρευνας και ανάπτυξης έχει αφιερωθεί σε αυτόν τον τομέα. Στην βιομηχανία τροφίμων, η ανίχνευση επιμολυντών, η επικύρωση του

περιεχομένου των προϊόντων, η παρακολούθηση της μετατροπής των πρώτων υλών και η φρεσκότητα των προϊόντων αποτελούν περιοχές εφαρμογής βιοαισθητήρων. Η βιομηχανία μύρας χρησιμοποιεί ήδη τρόπους βελτίωσης και ελέγχου των προϊόντων τους μέσω της χρήσης βιοαισθητήρων. Οι αισθητήρες μπορούν επίσης να αποτελέσουν αμυντικό εργαλείο μέσω της έγκαιρης ανίχνευσης επικίνδυνων υλικών, όπως είναι τα μικρόβια ή οι χημικοί πόλεμοι. Η ανίχνευση παράνομων ναρκωτικών και εκρηκτικών με σκοπό την ασφάλεια στόχων αποτελεί σημαντικό τομέα ανάπτυξης βιοαισθητήρων. Για περιβαλλοντικό έλεγχο και παρακολούθηση, οι βιοαισθητήρες μπορούν να παρέχουν γρήγορα και ειδικά δεδομένα για επιμολυσμένες περιοχές (Πίνακας 2.1). Διαθέτουν άλλα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις τρέχουσες αναλυτικές μεθόδους, όπως η δυνατότητα φορητότητας και εργασίας επί τόπου και η δυνατότητα μέτρησης των ρύπων σε πολύπλοκες μήτρες με ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων.

Πίνακας 2.1. Εφαρμογές βιοαισθητήρων

Τομέας	Παραδείγματα
Περιβάλλον	Έλεγχος υδάτων, Διαχείριση αποβλήτων και έλεγχος στο αέρα και στο έδαφος για Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, Ζιζανιοκτότα, Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), Διοξίνες, Τοξίνες, Χλωροφαινόλες. Υδατοδιαλυτά αρωματικά συστατικά (βενζόλιο, τολουόλιο, ξυλόλιο), Ορμόνες (οιστραδιόλη, οιστρόνη, αιθυνιλ-οιστραδιόλη), Νιτρώδη και νιτρικά, Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD), Βαρέα μέταλλα, Έλεγχος αερίων (CO ₂ , SO ₂ , CH ₄ κ.ά).
Υγεία/Ασφάλεια	Έλεγχος πόσιμου ύδατος για φυτοφάρμακα. Ατομικά συστήματα συναγερμού για τοξικές πτητικές ενώσεις. Έγκαιρη προειδοποίηση-ανίχνευση χημικών και βιολογικών ειδών (στρατιωτικές / αμυντικές εφαρμογές). Έλεγχος για ναρκωτικά.
Ιατρική	Κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές ασθενειών (βιοδείκτες): Γλυκόζη, χοληστερόλη, ρετινόλη, ουρία, ορμόνες, σάκχαρα, πεπτίδια, καρκινικοί δείκτες, καρδιαγγειακά νοσήματα κ.λπ. Παρακολούθηση χημειοθεραπείας. Ανίχνευση ναρκωτικών στο αίμα. Ανίχνευση και έλεγχος φαρμάκων. Νέες διαγνωστικές μέθοδοι με βιοαισθητήρες που αποτελούνται από ζωντανά κύτταρα, ιστούς ή ακόμα και ολόκληρα όργανα. Έλεγχος λειτουργίας τεχνητών οργάνων.
Βιομηχανία τροφίμων	Επεξεργασία, παρακολούθηση, αυθεντικότητα, ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων: Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα και πόσιμο νερό (E.coli, Salmonella enteritis, Salmonella typhymurium, Pseudomonas, Achromobacter, Listeria monocytogenes), Ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων aldicarb, carbaryl, paraoxon chlorpyrifosmethyl, οργανοφωσφορικών στο γάλα, στο κρασί και στον πορτοκαχυμό με βιοαισθητήρες AchE (ακετυλοχολινεστεράσης), προσδιορισμός σακχάρων, αιθανόλης σε ποτά, τεχνητών αρωματικών και γλυκαντικών, εντοπισμό συντηρητικών και τοξινών. Έλεγχος ζυμωτήρων.



Σχήμα 2.5. Σχηματικό διάγραμμα συνοπτικής περιγραφής των εφαρμογών βιοαισθητήρων.



Σχήμα 2.6. Σχηματικό διάγραμμα αναλυτικής περιγραφής των εφαρμογών βιοαισθητήρων.

Ένα αναλυτικό εργαστήριο χημείας περιβάλλοντος διαθέτει σήμερα μια ευρύτατη συλλογή μεθόδων και έξυπνων οργάνων ανάλυσης ικανών να εξάγουν αξιόπιστες πληροφορίες ποιοτικού και ποσοτικού χαρακτήρα σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματομετρία μάζας (MS), η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS), η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και άλλες συνδυαστικές μέθοδοι HPLC-MS-MS, ICP-MS. Εν τούτοις, ο μεγάλος αριθμός των εναλλακτικών μεθόδων συχνά προβληματίζει τον αναλυτή για την επιλογή της αναλυτικής μεθόδου και οργάνου, για την επίλυση του προβλήματός του, γνωρίζοντας τα

πλεονεκτήματα αλλά και τους υπάρχοντες περιορισμούς, όπως είναι το υψηλό κόστος απόκτησης, η απαίτηση για εξειδικευμένο προσωπικό, η προκατεργασία του δείγματος για τις περισσότερες τεχνικές, η αδυναμία για ταχύ ημιποσοτικό έλεγχο (screening) που θα μπορούσε να αποτρέψει την εκτέλεση περιττών αναλύσεων, η δυσκολία στην ανάπτυξη «φορητών συστημάτων έγκαιρης προειδοποίησης», η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο και ο μεγάλος χρόνος ανάλυσης.

Έναντι αυτών των περιορισμών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ευρύτατα οι βιοαισθητήρες. Κύριος στόχος των βιοαισθητήρων είναι η εφαρμογή των πολύπλοκων φυσικών μηχανισμών εκλεκτικής χημικής αναγνώρισης και η ανάπτυξη νέων αναλυτικών συστημάτων, που θα παρέχουν πληροφορίες ανάλογες με αυτές που δίνουν τα συστήματα GC/MS (Buck, 1990). Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα. Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές μικρού μεγέθους με βασικό πλεονέκτημα την υψηλή εκλεκτικότητα και τη γρήγορη απόκριση παρέχοντας εξ ίσου ορθά αποτελέσματα με τα σύγχρονα αναλυτικά όργανα. Η δυνατότητα να συνδυαστούν με φορητή οργανολογία χαμηλού κόστους και να χρησιμοποιηθούν σε εξωεργαστηριακές αναλυτικές εφαρμογές για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο και χρήσεις in situ και in vivo (Thompson and Krull, 1984) ή ως εμφυτεύματα για την παρακολούθηση κλινικών δεικτών (Belluzo, Riboneand and Lagier, 2008) είναι ένα πλέον ισχυρό πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων, που δεν κατέχουν τα όργανα υψηλής τεχνολογίας, παρά το πλήθος των πληροφοριών που παρέχουν. Επίσης, πλεονεκτήματα αποτελούν ο άμεσος εκλεκτικός, ευαίσθητος και συχνά in situ προσδιορισμός χημικών ενώσεων χωρίς επιπρόσθετες διαδικασίες διαχωρισμού από το υπόβαθρο του δείγματος (Thevenot, 2001), καθώς και η χρησιμοποίησή τους από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Επί πλέον οι βιοαισθητήρες προσφέρουν τη δυνατότητα προσδιορισμού όχι μόνο συγκεκριμένων χημικών ουσιών, αλλά και των βιολογικών επιπτώσεών τους, όπως οι τοξικότητες ή οι ενδοκρινικές διαταραχές, οι οποίες αποτελούν δείγμα πληροφοριών υψηλού ενδιαφέροντος Συμπερασματικά, και παρά το γεγονός ότι κάποιοι από τους βιοαισθητήρες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δεν καλύπτουν πλήρως τα παραπάνω πλεονεκτήματα, η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση τοξικών ουσιών επί του πεδίου, θα επιφέρει σημαντική πρόοδο στη Χημεία Περιβάλλοντος, χωρίς ωστόσο να παραβλέπεται η ανάπτυξη βιοαισθητήρων στην κλινική χημεία και χημεία τροφίμων.

Η ποικιλία των συστημάτων μοριακής αναγνώρισης και των ηλεκτροχημικών μεταλλακτών που ενσωματώνονται σε κάθε βιοαισθητήρα είναι πολύ μεγάλη. Ωστόσο, έχουν σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τις αρχές λειτουργίας τους και εξαρτώνται κυρίως από τον τύπο του μεταλλάκτη και το χρησιμοποιούμενο μοριακό υποδοχέα. Ένας βιοαισθητήρας για να είναι επιτυχημένος πρέπει να έχει τα ακόλουθα λειτουργικά χαρακτηριστικά (Reddy et al., 2013):

1. Ο βιοκαταλύτης πρέπει να έχει υψηλή εξειδίκευση για το σκοπό της ανάλυσης και να είναι σταθερός κάτω από συνήθεις συνθήκες αποθήκευσης.
2. Η αντίδραση θα πρέπει να είναι ανεξάρτητη από φυσικές παραμέτρους όπως ανάδευση, pH και θερμοκρασία.

3. Η απόκριση πρέπει να είναι ακριβής, επαναλήψιμη, αναπαραγώγιμη και γραμμική πάνω στη χρήσιμη αναλυτική περιοχή χωρίς αραίωση ή συγκέντρωση. Επίσης, θα πρέπει να είναι απαλλαγμένη από ηλεκτρικό θόρυβο.
4. Εάν ο βιοαισθητήρας πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για επεμβατική παρακολούθηση σε κλινικές καταστάσεις, ο καθετήρας πρέπει να είναι μικροσκοπικός και βιοσυμβατός που δεν έχει τοξικές ή αντιγονικές επιδράσεις.
5. Ο βιοαισθητήρας θα πρέπει να παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μικρά φυσικά ή ηλεκτρικά σοκ, και να έχει χαμηλό όριο ανίχνευσης (τάξη μεγέθους nM).
6. Ο πλήρης βιοαισθητήρας θα πρέπει να είναι φθηνός, μικρός, φορητός και ικανός να χρησιμοποιηθεί από μη επαγγελματίες χειριστές.
7. Οι βιοαισθητήρες θεωρούνται ανώτεροι και πιο ευαίσθητοι σε σύγκριση με τους φυσικά όργανα για τους εξής λόγους:
 - α. Σε ένα βιοαισθητήρα το ακινητοποιημένο βιολογικό υλικό βρίσκεται σε στενή επαφή με τον κατάλληλο μεταλλάκτη, έτσι ώστε το βιοχημικό σήμα να μετατρέπεται γρήγορα σε ηλεκτρικό σήμα.
 - β. Η ακινητοποίηση των βιομορίων επιτρέπει την επαναχρησιμοποίησή τους (τα οποία είναι δαπανηρά) και επιτρέπει την απλοποίηση ολόκληρης της συσκευής.
 - γ. Το στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης υπάρχει σε μια μικρή περιοχή και είναι πολύ ευαίσθητο διευκολύνοντας έτσι την ανάλυση των ουσιών σε μικρές ποσότητες.
 - δ. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να αναπτυχθούν ανάλογα με τις ειδικές ανάγκες και μπορεί να είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένοι ή να παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα.

2.3.1 Είδη βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο γενικές κατηγορίες: (α) ως προς το είδος του ακινητοποιημένου βιομορίου, που αναγνωρίζει τον αναλύτη-στόχο (β) ως προς την αρχή της μεθόδου και το είδος της μετρούμενης ιδιότητας (μεταλλάκτης ανίχνευσης). Σύμφωνα με το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται: σε ανοσοχημικούς, ενζυματικούς, μη ενζυματικούς υποδοχείς, ολόκληρους κυτταρικούς και βιοαισθητήρες DNA, ενώ σύμφωνα με το είδος της μετρούμενης ιδιότητας οι βιοαισθητήρες διακρίνονται: σε ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς, οπτικούς, συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (surface plasmon resonance, SPR), θερμικούς, πιεζοηλεκτρικούς και χωρικούς ή εμπεδησιομετρικούς (Πίνακας 2.2).

Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης είναι το τμήμα του βιοαισθητήρα που μεταφράζει πληροφορίες βιοχημικού χαρακτήρα, συνήθως τη συγκέντρωση του αναλύτη, σε φυσικό ή χημικό σήμα εξόδου με συγκεκριμένη ευαισθησία. Πρόκειται για ένα μακρομόριο ακινητοποιημένο σε κάποια επιφάνεια, η οποία είτε γειτνιάζει με ένα μεταλλάκτη είτε βρίσκεται σε επαφή με το μεταλλάκτη, ο οποίος έχει την ευθύνη μετατροπής της

αλληλεπίδρασης μεταξύ του βιολογικού τμήματος του βιοαισθητήρα και του αναλύτη σε μετρήσιμο αναλυτικό σήμα.

Πίνακας 2.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων

Με βάση το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης	Ενζυμικοί Ανοσοχημικοί	
	Βασιζόμενοι σε υποδοχείς (Βιολογικής Συγγένειας, Διστρωματικές Λιπιδικές Μεμβράνες)	
	Βασιζόμενοι σε ιστούς και κύτταρα	
Με βάση την αρχή μεθόδου και το είδος της μετρούμενης ιδιότητας/ μεταλλάκτη ανίχνευσης	Ηλεκτροχημικοί	Ποτενσιομετρικοί (διαφορά δυναμικού υπό μηδενικό ρεύμα)
		Αμπερομετρικοί (ρεύμα υπό σταθερή διαφορά δυναμικού)
		Αγωγιμομετρικοί (μέτρηση i του ρεύματος /διαφορά δυναμικού
	Οπτικοί	Απορρόφησης (ένταση ακτινοβολίας)
		Φθορισμού (ένταση φθορισμού)
		Φωταύγειας (ένταση ακτινοβολίας)
		Οπτικές ίνες
		Συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (μεταβολή δείκτη διάθλασης)
	Πιεζοηλεκτρικοί (μεταβολή ιδιοσυχνότητας κρυστάλλου χαλαζία)	
	Θερμικοί (ΔH ή ΔG αντίδρασης)	
	Χωρητικοί ή Εμπεδησιομετρικοί (μεταβολή χωρητικότητας ή εμπέδησης)	

2.3.1.1 Βιοαισθητήρες που στηρίζονται στο χημικό στοιχείο αναγνώρισης

2.3.1.1.1 Ανοσοαισθητήρες.

Είναι πολύ ευαίσθητοι, επιλεκτικοί και ευπροσάρμοστοι, δεδομένου ότι μπορούν να παραχθούν αντισώματα για να δεσμεύσουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, που δομικά είναι διαφορετικές μηχανικής (Rodriguez-Mozaz, Lopez de Alda and Barceló, 2006). Ο ανοσοαισθητήρας χρησιμοποιεί την πολύ ειδική συγγένεια δέσμευσης των αντισωμάτων για μια συγκεκριμένη ένωση ή ένα αντιγόνο. Η ειδική φύση της αλληλεπίδρασης αντισώματος-αντιγόνου είναι ανάλογη του μηχανισμού κλειδαριάς-κλειδιού με το αντιγόνο να δεσμεύεται μόνο στο αντίσωμα, εάν έχει τη σωστή διαμόρφωση. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε μια φυσικοχημική αλλαγή που σε συνδυασμό με έναν ιχνηθέτη, όπως φθορίζοντα μόρια, ένζυμα ή ραδιοϊσότοπα, μπορεί να δημιουργήσει ένα σήμα. Υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση αντισωμάτων σε αισθητήρες: α) Η ικανότητα δέσμευσης αντισώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της δοκιμασίας (π.χ. pH και θερμοκρασία). β) Η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου είναι γενικά μη

αναστρέψιμη. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η δέσμευση μπορεί να ανασταλεί από χαοτροπικά αντιδραστήρια, οργανικούς διαλύτες ή ακόμη και υπερηχητική ακτινοβολία (<https://en.wikipedia.org/wiki/Biosensor>).

2.3.1.1.2 Ενζυμικοί

Ενζυμικοί ή βιοκαταλυτικοί αισθητήρες. Λόγω της ειδικότητας και των καταλυτικών ιδιοτήτων τους, τα ένζυμα έχουν βρει ευρεία εφαρμογή στους βιοαισθητήρες. Στους ενζυμικούς βιοαισθητήρες, το ένζυμο που είναι το βιολογικό μόριο, καταλύει μια συγκεκριμένη αντίδραση στην οποία ο αναλύτης συμμετέχει ως αντιδρών (υπόστρωμα) προς παραγωγή ενός προϊόντος. Από το αναλυτικό σήμα που προκύπτει στο τέλος της αντίδρασης προσδιορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη. Οι βιοαισθητήρες αυτοί βασίζονται στην επιλεκτική αναστολή συγκεκριμένων ενζύμων από διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων, με τη μείωση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου, παρουσία του αναλύτη-στόχου ως παραμέτρου που συχνά χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων κατάλληλων για δράση ως στοιχεία αναγνώρισης και πολύ συχνά οι καταλυτικές τους ιδιότητες ή η ειδικότητα του υποστρώματος μπορούν να τροποποιηθούν μέσω γενετικής μηχανικής (*Rodriguez-Mozaz, Lopez de Alda and Barceló, 2006*). Ένζυμα που ανήκουν στις οξειδοαναγωγάσες, υδρολάσες και λυάσες έχουν ακινητοποιηθεί σε διάφορους μεταλλάκτες με στόχο τη δημιουργία βιοαισθητήρων με εφαρμογές στην ιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, την περιβαλλοντική χημεία και την άμυνα. Η πιο σημαντική ομάδα είναι οι οξειδοαναγωγάσες που καταλύουν την οξείδωση ή αναγωγή, χρησιμοποιώντας είτε το οξυγόνο είτε συμπράγοντες.

Το ένζυμο μπορεί να είναι ακινητοποιημένο ή ελεύθερο διαλυτοποιημένο. Ο όρος «**ακινητοποίηση**» αναφέρεται στη δέσμευση διαφόρων διαλυτών βιομορίων, που μπορεί να είναι ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊνικά οξέα κ.λπ. ή ακόμα και ολόκληρα κύτταρα σε αδρανή αδιάλυτα υλικά, και με τέτοιο τρόπο, που να συνεχίσουν να διατηρούν τη δραστηριότητά τους για πολύ χρόνο και με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους σε πολλές αναλύσεις (*Προδρομίδης, 2014*). Σημαντικό στοιχείο της επιτυχίας ενός βιοαισθητήρα είναι η επιλογή του κατάλληλου υλικού στήριξης για την ακινητοποίηση των βιομορίων. Η ακινητοποίηση του ενζύμου περιορίζει το ένζυμο σε μια φάση (μήτρα/στήριγμα) διαφορετική από αυτή για υποστρώματα και προϊόντα. Τα αδρανή πολυμερή και τα ανόργανα υλικά χρησιμοποιούνται συνήθως ως μεταφορικές μήτρες. Εκτός από την προσιότητα, η ιδανική μήτρα πρέπει να περιλαμβάνει χαρακτηριστικά όπως αδράνεια, φυσική αντοχή, σταθερότητα, δυνατότητα αναγέννησης, ικανότητα αύξησης της ειδικότητας / δραστηριότητας του ενζύμου και μείωση της αναστολής του προϊόντος, μη ειδική προσρόφηση και μικροβιακή μόλυνση (*Mohamad et al., 2015*). Η ακινητοποίηση του ενζύμου σε ένα υλικό στήριξης επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του (διαμόρφωση, σταθερότητα και καταλυτική δράση) και κατ' επέκταση επηρεάζει και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα. Άρα το βιομόριο πρέπει να συνδεθεί και να σταθεροποιηθεί στο υλικό με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εγγύτητα της επιφάνειας στήριξης του μεταλλάκτη με το βιομόριο (*Γυρούση, 2015*). Έτσι εξασφαλίζεται η σταθερότητα του ενζύμου, η οποία εκφράζεται με τη

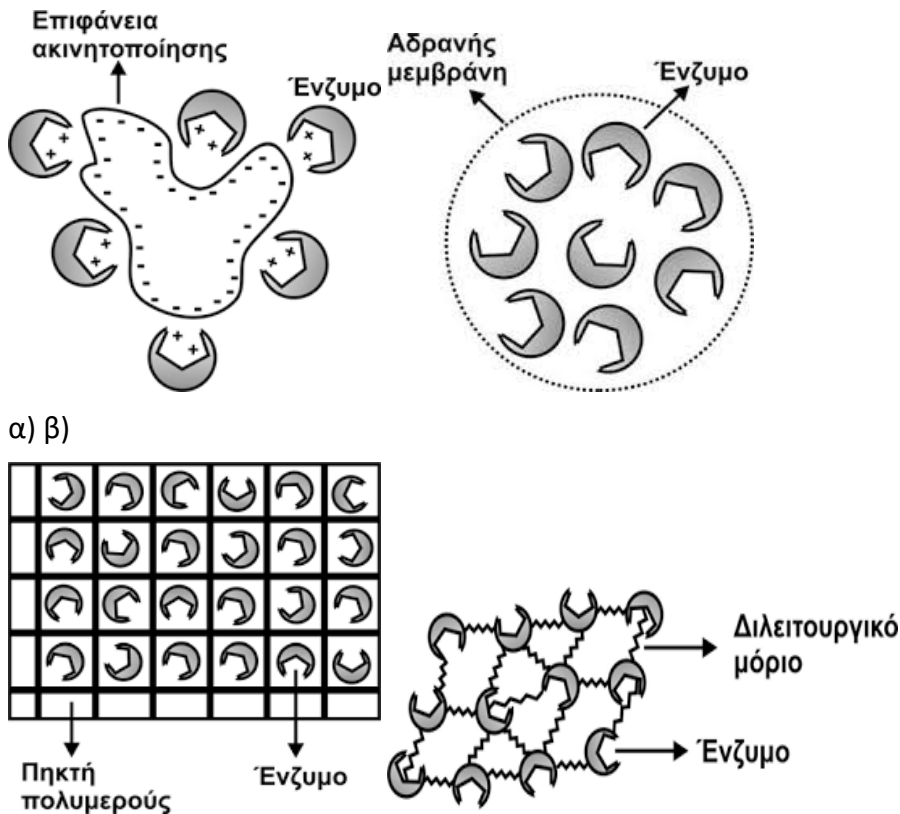
υψηλότερη δυνατή ενεργότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα (αύξηση ημιζωής του ενζύμου), η δυνατότητα πρόσβασης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, και η ταχεία μεταφορά μάζας του υποστρώματος και των προϊόντων προς και δια μέσου της στοιβάδας ακινητοποίησης.

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την ακινητοποίηση των ενζύμων αλλά και άλλων βιολογικά ενεργών ουσιών (αντιγόνα/αντισώματα, βακτήρια, ιστοί) βασίζονται σε **φυσικές μεθόδους**, σε **χημικές μεθόδους** και σε **συνδυασμούς αυτών** (υβριδικές τεχνικές). (Carr and Bowers, 1980; Bernstein, 1985; Schultz, 1987; Weber, 1992). Οι κύριες φυσικές μέθοδοι είναι η *προσρόφηση* (adsorption) σε μη υδατοδιαλυτό φορέα, η *ενθυλάκωση* (encapsulation) σε ημιπερατές αδρανείς μεμβράνες και η *παγίδευση* (gel entrapment) σε μη υδατοδιαλυτές πηκτές πολυμερών (Προδρομίδης, 2014).

Η φυσική προσρόφηση πραγματοποιείται είτε απ' ευθείας πάνω στο μεταλλάκτη είτε με ανάμειξη αραιού διαλύματος του ενζύμου με το υλικό στήριξης. Η ακινητοποίηση οφείλεται σε δεσμούς ομοιοπολικής φύσεως (ιοντικές, υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, δεσμοί Van der Waals) που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και του υλικού στήριξης.

Η ενθυλάκωση του ενζύμου πραγματοποιείται με διάχυση σε ημιπερατές μεμβράνες, όπου τα μόρια του ενζύμου εγκλωβίζονται σε συγκεκριμένο χώρο εντός του υλικού στήριξης, ενώ τους επιτρέπει να κινούνται ελεύθερα στο διάλυμα της ενζυμικής στοιβάδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ένζυμα να διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητά τους και το σύνολο των χαρακτηριστικών τους πριν την ακινητοποίηση.

Η φυσική παγίδευση του ενζύμου σε πηκτή πολυμερούς επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός διαλύματος μονομερούς, εντός του οποίου περιέχονται τα ένζυμα, τα οποία παγιδεύονται σε ένα τρισδιάστατο πλέγμα που δημιουργείται κατά τον πολυμερισμό του μονομερούς. Η σχηματιζόμενη πηκτή πολυμερούς-ένζυμου, επικαλύπτει την επιφάνεια του μεταλλάκτη. Τα συνήθη μονομερή που πολυμερίζονται χημικά είναι το ακρυλαμίδιο, η πολυβινυλαλκοόλη και διάφορα σιλοξάνια, ενώ τα μονομερή που πολυμερίζονται ηλεκτροχημικά είναι κυρίως το πυρρόλιο και διάφορα παράγωγά του. Τα πολυμερή ανήκουν κυρίως στα αγώγιμα, όπως η πολυ(πυρρόλη) ή άλλα πολυμερή η δομή των οποίων περιλαμβάνει οξειδοαναγωγικές ομάδες, όπως σύμπλοκα οσμίου. Τα ένζυμα λόγω του μεγέθους τους δεν υφίστανται εκρόφηση (διάχυση) από την πηκτή του πολυμερούς σε αντίθεση με άλλες ουσίες που έχουν μικρότερο μέγεθος όπως το υπόστρωμα ή το προϊόν της αντίδρασης. Η εν λόγω εκρόφηση μπορεί να περιορισθεί με κατάλληλο έλεγχο του πορώδους του πλέγματος κατά τον πολυμερισμό ή με τη δημιουργία σταυροδεσμών στο πολυμερές με κατάλληλα αντιδραστήρια διασταύρωσης. Με τον τρόπο αυτό λύνεται το πρόβλημα περιορισμού του εύρους της περιοχής γραμμικής απόκρισης, που συνεπάγεται η μεγάλη ταχύτητα ροής του υποστρώματος προς το ένζυμο και ο γρήγορος κορεσμός αυτού. Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η χρήση ήπιων συνθηκών που συμβάλλουν στη διατήρηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου.



α) β)

γ) δ)

Σχήμα 2.7. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης ενζύμων α) με προσρόφηση β) ενθυλάκωση γ) παγίδευση και δ) διασταυρούμενη σύνδεση (Προδρομίδης, 2014).

Από τις χημικές τεχνικές ακινητοποίησης οι πιο διαδεδομένες είναι η *διασταυρούμενη σύνδεση* (cross-linking) των ενζυμικών μορίων και η *ομοιοπολική σύνδεση* (covalent binding) σε ενεργοποιημένο φορέα.

Η *διασταυρούμενη* ή *διαμοριακή σύνδεση* μέσω *διλειτουργικών υποκαταστατών* (bifunctional agents) συνδυάζεται συνήθως με προσρόφηση ή παγίδευση των ενζύμων για τον περιορισμό εκρόφησής τους από το υλικό ακινητοποίησης. Η τεχνική ακινητοποίησης του ενζύμου με διασταυρούμενη σύνδεση είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος η οποία αποσκοπεί στο σχηματισμό ενός πολυμερικού πλέγματος, που προκύπτει από την αντίδραση μορίων ενζύμου με ένα αντιδραστήριο διασταυρούμενης σύνδεσης όπως είναι η γλουταραλδεϋδη, η δις-διαζωβενζιδίνη, το δισοκυανικό εξαμεθυλένιο (Lee et al., 2006) ή το καρβοδιμίδιο. Σε πολλές περιπτώσεις η γλουταραλδεϋδη συνδυάζεται με μια πρωτεΐνη φορέα όπως η αλβουμίνη (bovine serum albumin). Το πολυμερικό πλέγμα λόγω μεγέθους συγκρατείται καλύτερα πάνω στην επιφάνεια του ανιχνευτή / μεταλλάκτη ή μέσα στο φορέα ακινητοποίησης με το ένζυμο να αποτελεί τη δομική μονάδα.

Όπως προαναφέρθηκε η πρώτη κατασκευή βιοαισθητήρα στηρίχθηκε στο ηλεκτρόδιο ενζύμου-υποστρώματος (Clark and Lyons, 1962). Η τεχνική αυτή άνοιξε το δρόμο κατασκευής αναλυτικών οργάνων που βασίζονται σε ένζυμα, και τούτο διότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους αρκετές

φορές, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους κατασκευής αυτών των οργάνων (Νικολέλη, 2015). Επί πλέον ο αναλύτης δεν υφίσταται καμία μόλυνση από συστατικά του ενζυμικού παρασκευάσματος, γιατί το ακινητοποιημένο ένζυμο διαχωρίζεται πλήρως από το αναλυόμενο διάλυμα

2.3.1.1.3 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ιστούς και κύτταρα

Ολόκληρα κύτταρα ζώντων οργανισμών, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες, φυτικά και ζωικά κύτταρα ή ακόμη και τμήματα ιστού, έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστατικό αναγνώρισης μετρώντας τη γενική μεταβολική τους κατάσταση (Bouse, 1996; Gui et al., 2017; Roggo and Van de Meer, 2017). Οι βιοαισθητήρες αυτοί είναι χρήσιμοι στον προσδιορισμό της τοξικότητας ορισμένων ενώσεων στα κύτταρα επιλογής. Μία ομάδα από ολόκληρα κύτταρα ή μικροβιακούς αισθητήρες έχει κατασκευαστεί για την ανίχνευση τοξικών και ρυπογόνων στοιχείων. Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε κύτταρα έχουν εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς για την περιβαλλοντική παρακολούθηση των ρύπων (Pancrazio et al., 1999). Διαθέτουν την ικανότητα να καταγράφουν άμεσα τις βιολογικές επιδράσεις σε αντίθεση με το να παρέχουν απλώς και μόνο μία χημική ανάλυση για την καταγραφή των συνθηκών περιβάλλοντος. Τα πλεονεκτήματα αυτών είναι η αυξημένη σταθερότητα των ενεργών συστατικών που περιέχονται στα κύτταρα, αφού τα κύτταρα βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον, καθώς και το χαμηλό κόστος. Μειονεκτήματα αποτελούν η μειωμένη εκλεκτικότητα και οι μεγάλοι χρόνοι απόκρισης. Μια άλλη εφαρμογή των βιοαισθητήρων ολόκληρων κυττάρων είναι ο προσδιορισμός του "βιολογικός απαιτούμενου οξυγόνου" (BOD). Είναι γνωστό ότι γενετικά τροποποιημένα βακτήρια συχνά χρησιμοποιούνται σε βιοαισθητήρες που βασίζονται σε κύτταρα.

2.3.1.1.4 Βιοαισθητήρες που βασίζονται στη βιολογική συγγένεια

Η κατασκευή αυτού του είδους των βιοαισθητήρων βασίζεται στις εξειδικευμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους υποδοχείς και στους αναλύτες. Χρησιμοποιούνται κυρίως αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος. Παρόλα αυτά, ο βιολογικός υποδοχέας μπορεί να αποτελείται από ολιγονουκλεοτίδια (DNA ή RNA), ορμόνες ή λεκτίνες (πρωτεΐνες φυτών που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση υδρογονανθράκων). Συνδυασμοί των παραπάνω βιολογικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί, για να παρέχουν νέες ή βελτιωμένες αναλυτικές δυνατότητες. Ο αναλύτης (αντιγόνο ή μικροοργανισμός) με χαρακτηριστική αλληλουχία νουκλεοτιδίων, δεσμεύεται εκλεκτικά από τα κέντρα αυτά και η ανίχνευση γίνεται αμέσως ή εμμέσως.

Τα αντισώματα είναι ιδανικά στοιχεία βιοανάλυσης που παρέχουν αισθητήρες με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία (Sharma, Byrne and O'Kennedy, 2016). Ωστόσο η δημιουργία ισχυρών δεσμών μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος προκαλεί μη αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις με συνέπεια οι βιοαισθητήρες αυτοί να χρησιμοποιούνται μια φορά. Το πρόβλημα αυτό, για την ανεύρεση του τρόπου αναγέννησης του ενεργού μέρους του αντισώματος, έχει αντιμετωπιστεί με την αναπλήρωση των χημικών της συσκευής η οποία όμως είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος (Bier, Jockers and Schmid, 1994; Bier and Schmid, 1994). Η ανάπτυξη στον τομέα των μονοκλωνικών και πολυκλωνικών

αντισωμάτων όσο και η παραγωγή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων με χρήση στους βιοαισθητήρες-ανοσοαισθητήρες, έχουν φέρει επανάσταση στη διάγνωση για την ανίχνευση μιας πληθώρας αναλυτών όπως δείκτες νόσου, μολυσματικά τρόφιμα και περιβάλλον, παράγοντες βιολογικού πολέμου και παράνομα ναρκωτικά (*Sharma, Byrne and O’Kennedy, 2016*).

Στην περίπτωση των βιοαισθητήρων συγγένειας DNA για την ανίχνευση των ρύπων, εφαρμόζονται δύο στρατηγικές: η μια είναι η ανίχνευση υβριδισμού αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων από μολυσματικούς μικροοργανισμούς και η άλλη είναι η παρακολούθηση μικρών ρύπων, που αλληλεπιδρούν με την ακινητοποιημένη στοιβάδα DNA (φάρμακα, μεταλλαξιόγονοι ρύποι, κ.λπ.) (*Wang et al., 1997*).

2.3.1.1.5 Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες

Οι βιοαισθητήρες αυτοί χρησιμοποιούν τις λιπιδικές μεμβράνες ως υποστηρικτικό στοιχείο πάνω στις οποίες ακινητοποιούνται εκλεκτικά βιολογικά στοιχεία δέσμευσης (πρωτεΐνες, DNA κ.λπ./ υποδοχείς), τα οποία διατηρούν σε ικανοποιητικό βαθμό την εκλεκτική τους συμπεριφορά (*Nikoleli et al., 2018a*). Οι λιπιδικές μεμβράνες αποτελούν απομίμηση των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών. Μεταξύ υποδοχέα και αναλύτη πραγματοποιούνται μη ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλοεπιδράσεις (πράξη πρόσδεσης). Η αλληλεπίδραση υποδοχέα-αναλύτη είναι εξαιρετικά εκλεκτική με το σύμπλοκο να έχει χρόνο ζωής εξαρτώμενο από τη σταθερά σύνδεσης. Στην περιοχή σχηματισμού του συμπλόκου υποδοχέα-αναλύτη παρατηρείται μεταβολή της δομής ή του ηλεκτροστατικού πεδίου της μεμβράνης (*Siontorou et al., 2017*). Οι μεταβολές αυτές προκαλούνται είτε ηλεκτροχημικά και μπορούν να μετρηθούν ως μεταβολές του δυναμικού, του ιοντικού ρεύματος ή της χωρητικότητας είτε προκαλούνται οπτικά και μετριοούνται ως μεταβολές της απορρόφησης του φωτός, φθορισμού ή φωταύγειας. Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων του τύπου αυτού προτιμώνται οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες (*Nikolelis et al., 1995*). Αυτές σχηματίζονται με την τεχνική της αναδίπλωσης μονοστοιβάδας που προσφέρει τη δυνατότητα σχηματισμού ασύμμετρων διπλοστοιβάδων δηλαδή διπλοστοιβάδων με διαφορετική λιπιδική σύσταση κάθε μονοστοιβάδας ή διακλαδισμένων μεμβρανών με κατάλληλο σχεδιασμό της οπής πάνω σε ένα υμένιο από Teflon (*Montal and Mueller, 1972*). Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του μηχανισμού απόκρισης των βιοαισθητήρων λιπιδικών μεμβρανών που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι:

- η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR Spectroscopy),
- η φασματοσκοπία RAMAN (RAMAN Spectroscopy),
- η ηλεκτρονική μικροσκοπία σαρώσεως (Scanning Electron Microscopy)
- η διαφορική θερμιδομετρία σαρώσεως (Differential Scanning Calorimetry).

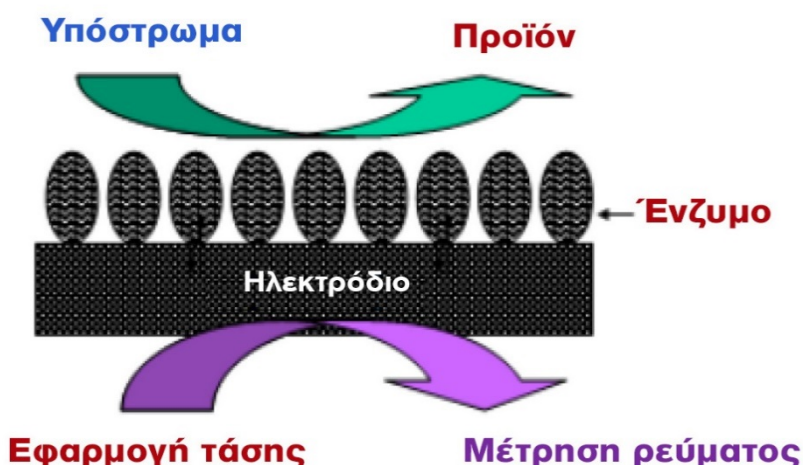
2.3.1.2 Βιοαισθητήρες που στηρίζονται στο είδος της μετρούμενης ιδιότητας /είδος μεταλλάκτη

Με βάση το στοιχείο του μεταλλάκτη οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, πιεζοηλεκτρικούς, θερμικούς και χωρικούς ή

εμπεδησιομετρικούς (βλ. Πίνακα 2.2) Οι περισσότεροι καταλυτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε ηλεκτροχημικές μεθόδους, ενώ οι βιοαισθητήρες συγγένειας έχουν αποδειχθεί γενικά πιο επιδεκτικοί στις οπτικές μεθόδους ανίχνευσης (Turner, 2000).

2.3.1.2.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες βασίζονται κυρίως στο γεγονός ότι κατά τη διάρκεια μιας βιοδραστικής διαδικασίας αλληλεπίδρασης, ηλεκτροχημικά είδη, όπως ηλεκτρόνια καταναλώνονται ή δημιουργούνται και παράγουν ένα φυσικά αναγνώσιμο ηλεκτρονικό σήμα το οποίο μπορεί να καταγραφεί με εφαρμογή διαφορετικών ηλεκτροχημικών ανιχνεύσεων. Ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιεί έναν ηλεκτροχημικό μετατροπέα, όπου τα ηλεκτροχημικά σήματα δημιουργούνται κατά τη διάρκεια των βιοχημικών αντιδράσεων και παρακολουθούνται χρησιμοποιώντας κατάλληλα ποτενσιομετρικά, αμπερομετρικά ή αγωγιμετρικά συστήματα αναλύσεων.



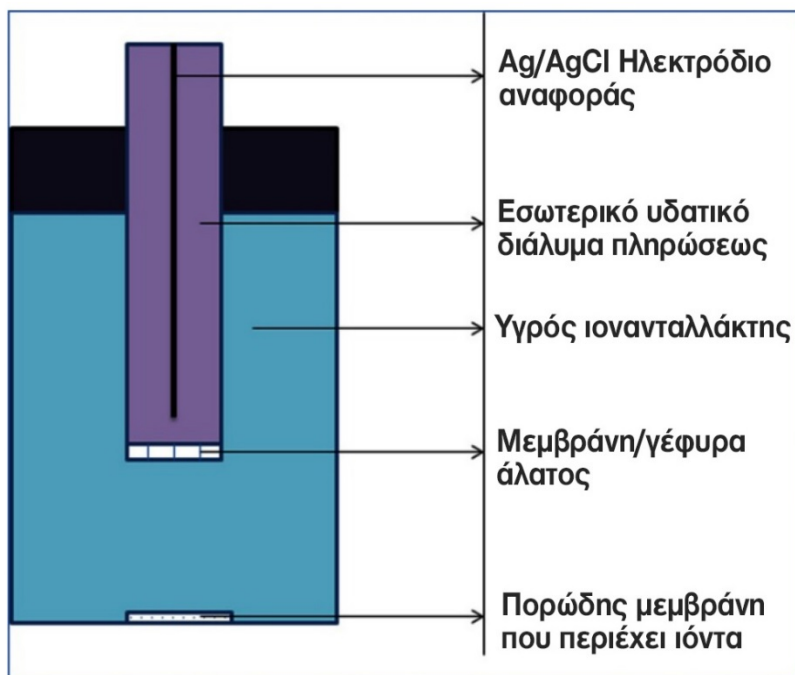
Σχήμα 2.8. Αρχή λειτουργίας ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων.

Θεωρείται ως ένα χημικώς τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, αφού το ηλεκτρονικό αγωγίμο, ημιαγωγίμο ή ιοντικό αγωγίμο υλικό επικαλύπτεται με βιοχημική μεμβράνη (Durst et al., 1997). Οι διάφοροι τύποι βιοαισθητήρων στην ηλεκτροχημική κατηγορία εξηγούνται παρακάτω:

1. Ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις προσδιορίζονται με βάση τη διαφορά δυναμικού μεταξύ ενός δείκτη και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς (σχ. 2.9). Ο μεταλλάκτης μπορεί να είναι ένα εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων, το οποίο είναι ένας ηλεκτροχημικός αισθητήρας, που βασίζεται σε λεπτές μεμβράνες ή εκλεκτικές μεμβράνες ως στοιχεία αναγνώρισης (Buck and Lindner, 1994). Οι εκλεκτικές σε ιόντα μεμβράνες, όταν βρίσκονται σε επαφή με το διάλυμα του αναλύτη, μεταβάλλουν την πυκνότητα του φορτίου στη διεπιφάνεια με αποτέλεσμα η μεταβολή αυτή να προκαλεί μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης. Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς εξαρτάται από τις ενεργότητες του ιόντος σε κάθε πλευρά της μεμβράνης, και εφόσον η ενεργότητα του ιόντος στο εσωτερικό διάλυμα αναφοράς είναι

σταθερή, η μετρούμενη διάφορα δυναμικού εξαρτάται μόνο από την ενεργότητα του ιόντος στο εξωτερικό διάλυμα. Έτσι η επιλεκτική δέσμευση του αναλύτη-ιόντος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας δημιουργεί τη διαφορά δυναμικού η οποία είναι ανάλογη του λογαρίθμου της ενεργότητας του ιόντος, όπως περιγράφεται από την εξίσωση Nerst (Skoog et al., 1994). Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας λειτουργεί σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας. Η πιο συνήθης ποτενσιομετρική συσκευή είναι το ηλεκτρόδιο pH, ενώ σήμερα υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων εκλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων (F⁻, I⁻, CN⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, NH₄⁺) ή αερίου (CO₂, NH₃).

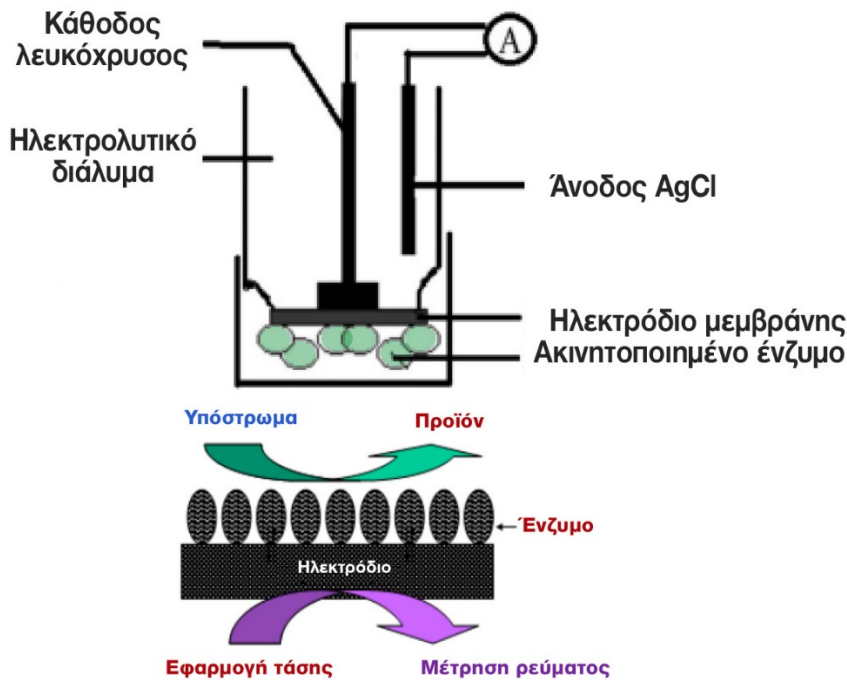


Σχήμα 2.9. Διαγραμματική αναπαράσταση ποτενσιομετρικού αισθητήρα.

2. Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος που προκύπτει από την ηλεκτροχημική οξείδωση ή μείωση ενός ηλεκτροενεργού είδους. Η μέτρηση εκτελείται διατηρώντας σταθερό δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας, που βασίζεται σε Pt, Au ή C ή σε συστοιχία ηλεκτροδίων σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς, το οποίο επίσης μπορεί να λειτουργεί κι ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, εάν τα ρεύματα είναι χαμηλά (10^{-9} έως 10^{-6} A). Το προκύπτον ρεύμα συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση των ηλεκτροενεργών ειδών ή με την ταχύτητα παραγωγής ή κατανάλωσής τους εντός της παρακείμενης βιοκαταλυτικής στοιβάδας. Καθώς τα ποσοστά βιοκαταλυτικής αντίδρασης συχνά εξαρτώνται από την αντίδραση πρώτης τάξεως της συγκέντρωσης του μαζικού αναλύτη (bulk), τα δημιουργούμενα ρεύματα σταθερής κατάστασης είναι συνήθως ανάλογα με τη συγκέντρωση του μαζικού αναλύτη (Thevenot et al., 2001). Το σήμα στις αμπερομετρικές συσκευές εξαρτάται από το ρυθμό της μεταφοράς μάζας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Πλεονεκτήματα των διατάξεων αυτών είναι η ευκολία κατασκευής τους, η απλότητα στη χρήση τους και το χαμηλό

κόστος. Αναλύτες όπως σάκχαρα, αλκοόλες, φαινόλες, ολιγονουκλεοτίδια και O_2 μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες. Επίσης συστήματα βιοαισθητήρων που βασίζονται σε ένα ένζυμο ή σε πολυένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων (σχ. 2.5). (Thakur and Ragavan, 2013). Βιοαισθητήρες με βάση ένα μόνο ένζυμο χρησιμοποιούν είτε ακετυλοχολινεστεράση (AChE) είτε βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE) ως βιολογικό συστατικό και αμπερομετρικά παρακολουθείται η παραγωγή θειοχολίνης ή παρακολουθείται ποτενσιομετρικά η παραγωγή οξέων. Συστήματα βιοαισθητήρα που βασίζονται σε πολυένζυμα χρησιμοποιούν χολινεστεράση σε συνδυασμό με οξειδάση της χολίνης και μέτρηση της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου ή της κατανάλωση οξυγόνου.



Σχήμα 2.10. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα

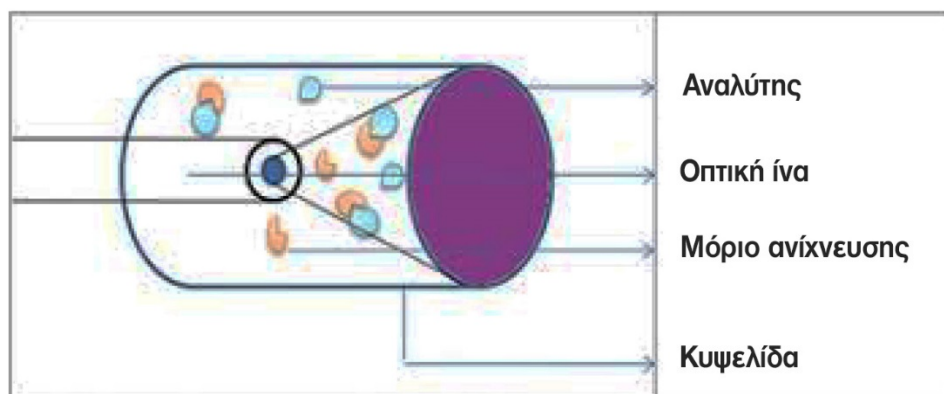
3. Αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι διατάξεις αυτές στηρίζονται στη μέτρηση μεταβολής της αγωγιμότητας, η οποία εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης των ιόντων. Όταν σε μια ηλεκτροχημική αντίδραση κατά τη διαδικασία της βιολογικής αναγνώρισης παραχθούν ηλεκτρόνια ή ιόντα, μεταβάλλεται η συνολική αγωγιμότητα ή η αντίσταση του δείγματος. Η αγωγιμότητα του διαλύματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντίστασης του διαλύματος και συνεπώς η αριθμητική τιμή της μέτρησης είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα, της κινητικότητας και του φορτίου τους. Οι αγωγιμομετρικές μέθοδοι ουσιαστικά είναι μη εκλεκτικές, πολλές όμως ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν σε μεταβολή της κινητικότητας των ιόντων ή του φορτίου τους με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η χρήση αγωγιμομετρικών μεταλλακτών (Jaffrezic-Renault and Dzyadevych, 2008) για τον προσδιορισμό διαφόρων περιβαλλοντικών ουσιών

όπως, οργανοφωσφορικών, βαρέων μετάλλων, νιτρικών, φορμαλδεΐδης, 4-χλωροφαινόλης και τριαζίνη. Εκτός από ένζυμα για την κατασκευή τους μπορεί να χρησιμοποιηθούν κύτταρα και μικροοργανισμοί. Μετά την εμφάνιση των τροποποιημένων επιφανειών που βελτιώνουν την εκλεκτικότητα, οι μέθοδοι έγιναν πιο βιώσιμες για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων. Υπάρχουν κάποιες πολύ πρακτικές θεωρήσεις που καθιστούν ελκυστικές μεθόδους μέτρησης, όπως ότι αποτελούν το πιο ευαίσθητο σύστημα μετάλλαξης της βιολογικής αναγνώρισης σε αναλυτικό σήμα (καταγραφή ρεύματος 10^{-9} A απαιτεί αντίδραση μόλις 10^{-14} mol/s για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ενός ηλεκτρονίου). Επίσης το χαμηλό κόστος και η απλότητα, καθώς δεν χρειάζεται η παρουσία ηλεκτροδίων αναφοράς. Βελτιωμένη οργανολογία έχει συμβάλει στο γρήγορο και εύκολο προσδιορισμό των αναλυόμενων ουσιών, με βάση μόνο τη μέτρηση της αγωγιμότητας.

2.3.1.2.2 Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες ενσωματώνουν την οπτική τεχνική με ένα βιολογικό στοιχείο για την αναγνώριση χημικών ή βιολογικών ειδών. Βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής μιας οπτικής ιδιότητας του αναλύτη (απορρόφηση, ανάκλαση, χημειοφωταύγεια, φθορισμός, δείκτη ανάκλασης ή άλλες οπτικές παραμέτρους) που προκαλείται κατά τη διαδικασία της χημικής αναγνώρισης και η οποία έχει σχέση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των διατάξεων αυτών είναι η ικανότητά τους να μετρούν όχι μόνο τις μεταβολές έντασης από μία ή περισσότερες δέσμες φωτός, αλλά και άλλων σχετικών ιδιοτήτων όπως ο χρόνος ζωής, ο δείκτης διάθλασης, ο σκεδασμός, η περίθλαση, η διάθλαση και η πόλωση (Jeronimo et al., 2007). Οι οπτικοί βιοαισθητήρες μπορεί να λειτουργήσουν είτε με τη μέθοδο του ενός σημείου, όπου απαιτείται μία μόνο μεταβολή φάσης για την ενεργοποίηση του αισθητήρα είτε μέσω μιας διανομής των σημείων, όπου ο αισθητήρας αντιδρά κατά μήκος μιας απλής συστοιχίας οπτικών ινών. Οι βιοαισθητήρες οπτικών ινών είναι γνωστοί με το όνομα "οπτρόδια" (optrodes) λόγω της ομοιότητάς τους με τα ηλεκτρόδια (σχ. 2.11) και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ανίχνευση ουσιών βιολογικού ενδιαφέροντος, όπως νουκλεϊνικά οξέα, αντισώματα κ.λπ. Η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το αντιδραστήριο, που βρίσκεται στο ένα άκρο της ίνας, προκαλεί μεταβολή μιας οπτικής ιδιότητας η οποία στη συνέχεια μεταδίδεται στον μεταλλάκτη μέσω της οπτικής ίνας.



Σχήμα 2.11. Διαγραμματική αναπαράσταση οπτικού βιοαισθητήρα

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βάσει των ιδιοτήτων τους έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές αναλυτικές τεχνικές, διότι καθιστούν δυνατή την άμεση ανίχνευση πολλών βιολογικών και χημικών ουσιών σε πραγματικό χρόνο και χωρίς ιχνηθέτες (label). Τα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνουν απουσία ηλεκτρομαγνητικών παρεμποδίσεων, ευρεία δυναμική περιοχή, υψηλή εξειδίκευση, ευαισθησία, μικρό μέγεθος και χαμηλό κόστος, ενώ ασφάλεια κατά την εργασία με εύφλεκτες και εκρηκτικές ενώσεις (*Lukowiak and Streck, 2009*). Πολλές προηγμένες έννοιες και διεπιστημονικές προσεγγίσεις όπως η μικροηλεκτρονική, τα μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα, οι μικρο/νανοτεχνολογίες, η μοριακή βιολογία, η βιοτεχνολογία και η χημεία εφαρμόζονται στην εκτέλεση νέων οπτικών βιοαισθητήρων. Η έρευνα και η τεχνολογική ανάπτυξη των οπτικών βιοαισθητήρων γνώρισε εκθετική ανάπτυξη κατά την τελευταία δεκαετία με την υγειονομική περίθαλψη, τις περιβαλλοντικές εφαρμογές και τη βιομηχανία της βιοτεχνολογίας (*Damborsky, Svitel and Katrlík, 2016*). Οι δυνητικές εφαρμογές των βιοαισθητήρων στα πεδία της ιατρικής, του περιβάλλοντος και της βιοτεχνολογίας είναι πολυάριθμες με το κάθε πεδίο να έχει τις δικές του απαιτήσεις, όσον αφορά τη συγκέντρωση του αναλύτη, την απαιτούμενη ακρίβεια, την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται, το χρόνο πλήρωσης του δειγματολήπτη, τον απαραίτητο χρόνο επαναχρησιμοποίησης του βιοαισθητήρα και τις απαιτήσεις καθαρισμού του συστήματος (*Dey and Goswami, 2011*). Ο οπτικός βιοαισθητήρας μπορεί να χρησιμοποιεί διάφορα βιολογικά υλικά, όπως ένζυμα, αντισώματα, αντιγόνα, υποδοχείς, νουκλεϊνικά οξέα, ολόκληρα κύτταρα και ιστούς ως στοιχεία βιοαναγνώρισης.

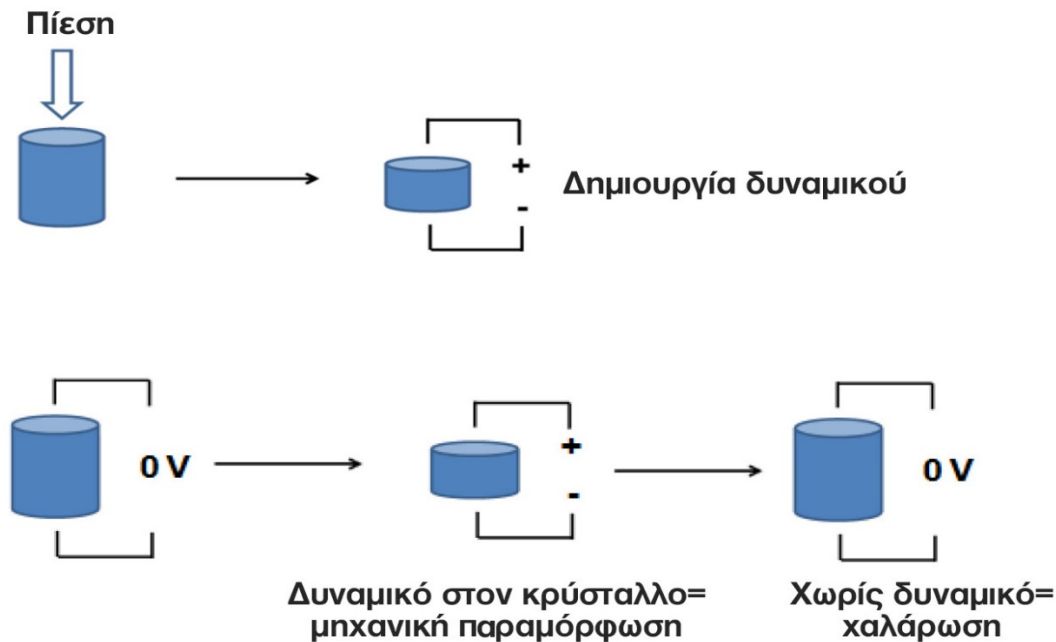
Η τεχνική του **συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων** (Surface Plasmon Resonance, SPR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο οπτικής που χρησιμοποιείται για τη μελέτη επιφανειακών φαινομένων πάνω σε ένα λεπτό στρώμα ενός μετάλλου. Το φαινόμενο SPR συμβαίνει στην επιφάνεια του μετάλλου (ή άλλων αγώγιμων υλικών) στη διεπαφή των δύο μέσων (συνήθως υάλου και υγρού) όταν φωτίζεται από πολωμένο φως σε συγκεκριμένη γωνία. Αυτό δημιουργεί επιφανειακά πλασμόνια και κατά συνέπεια μείωση της έντασης του ανακλώμενου φωτός υπό μια συγκεκριμένη γωνία που είναι γνωστή ως γωνία συντονισμού. Αυτή η επίδραση είναι ανάλογη της μάζας στην επιφάνεια. Ένα αισθητηριογράφημα (sensorgram) μπορεί να ληφθεί μετρώντας την μετατόπιση της ανακλαστικότητας της γωνίας ή των μηκών κύματος έναντι του χρόνου. Σε όλες τις διαμορφώσεις της συσκευής το φαινόμενο SPR επιτρέπει την άμεση, χωρίς ιχνηθέτη (label-free) και σε πραγματικό χρόνο μεταβολή του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήρα, η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του βιομορίου (*Damborsky, Svitel and Katrlík, 2016*). Τα αντισώματα είναι τα κοινά χρησιμοποιούμενα βιομόρια για τη σύλληψη του αναλύτη από το δείγμα. Για να μετρηθεί μια αλληλεπίδραση σύνδεσης-αναλύτη, ένα αλληλοεπιδρών μόριο πρέπει να ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η ομοιοπολική προσκόλληση βιομορίων στην επιφάνεια του αισθητήρα είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για αξιόπιστες συνθήκες προσδιορισμού. Οι βιοαισθητήρες SPR προσφέρουν μοναδική δυνατότητα ταχείας, ελεύθερου ιχνηθέτη και αποτελεσματική ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο και κόστος, ταυτοποίηση των βιομορίων.

Τελευταία, η ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων έχει επικεντρωθεί στη χρήση της τεχνολογίας **παροδικού ή φθίνοντος κύματος** (evanescent wave). Στους βιοαισθητήρες αυτούς η βιολογική αναγνώριση και η επακόλουθη σύνδεση γίνεται εντός των ορίων ενός παροδικού κύματος, το οποίο προκύπτει από τον τρόπο με τον οποίο το φως συμπεριφέρεται, όταν αυτό περιορίζεται σε ένα κυματοδηγό (waveguide) ή σε οπτικές ίνες. Το κατευθυνόμενο φως ανακλάται καθ' ολοκληρία εσωτερικά, όταν συναντά τη διεπαφή του κυματοδηγού με αποτέλεσμα ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που ονομάζεται παροδικό κύμα, να διαδίδεται πέρα από την διεπαφή μέσα σε ένα περιβάλλον με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης ή που μπορεί να συνδυαστεί με φθορίζοντες δείκτες (Damborsky, Svitel and Katrlík, 2016). Μια μεγάλη ποικιλία βιοαισθητήρων αναπτύχθηκε με βάση αυτή την αρχή με μια ευρεία σειρά εφαρμογών που κυμαίνονται από την κλινική διάγνωση μέχρι τη βιοανάδραση σε δοκιμές τροφίμων (Taïtt, Anderson and Ligler, 2015).

Πρόσφατα, η ομάδα *Thakur and Ragavan (2013)* δημοσίευσε αρκετές ερευνητικές εργασίες για την παρακολούθηση φυτοφαρμάκων, βιταμινών, καρκινογόνων ουσιών και τοξινών με βάση τη χημειοφωταύγεια και το φθορισμό.

2.3.1.2.3 Πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες

Οι βαρυμετρικοί βιοαισθητήρες διαχωρίζονται στους **πιεζοηλεκτρικούς** αισθητήρες (piezoelectric) και στους **ακουστικούς επιφανειακών κυμάτων**, (surface acoustic wave, SAW). Σύμφωνα με το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, όταν ένα κρύσταλλος συμπιέζεται ή εφελκύεται οι θέσεις των θετικών και αρνητικών του φορτίων μετατοπίζονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ηλεκτρικού δίπολου, δηλαδή στα άκρα του εμφανίζεται μία ποσότητα φορτίου (μια διαφορά δυναμικού, + και -). Το προαναφερθέν φαινόμενο απεικονίζεται στο σχήμα 2.12.



Σχήμα 2.12. Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο εμφανίζεται α) όταν δημιουργείται τάση λόγω μηχανικής παραμόρφωσης και β) όταν η μηχανική παραμόρφωση αρχίζει από εφαρμοζόμενη τάση.

Οι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες στηρίζονται στην μέτρηση της μεταβολής της συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων του αισθητήρα, λόγω μεταβολής της ολικής μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου (*Pohanka, 2017*).

Η μηχανική παραμόρφωση είναι μια απλή κατάσταση και η ταλάντωση είναι αυτή που επιλέγεται στις κοινές εφαρμογές συσκευής βιοαισθητήρα. Στην περίπτωση ταλάντωσης, επιβάλλεται εναλλασσόμενη τάση στον κρύσταλλο και στη συνέχεια συμβαίνει μηχανική ταλάντωση. Οι αισθητήρες αυτοί ουσιαστικά λειτουργούν ως αισθητήρες μάζας, πράγμα που οφείλεται στην γραμμική σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην αλλαγή της ολικής μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου (η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση) και στην συχνότητα ταλάντωσής της.

Η αρχή των ακουστικών αισθητήρων στηρίζεται στο πιεζοηλεκτρικό αποτέλεσμα δημιουργίας διαφοράς δυναμικού, όπως προαναφέρθηκε. Στους ακουστικούς βιοαισθητήρες η μεταβολή της ολικής μάζας των κρυστάλλων ανιχνεύεται μετρώντας τις αλλαγές στη συχνότητα, που προκαλούνται από τις αλλαγές στη συχνότητα συντονισμού, ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου κύματος το οποίο διέρχεται από την επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Η εξαιρετικά μεγάλη συχνότητα μεταξύ των ακουστικών συσκευών, το μικρό μέγεθος, η ταχύτερη απόκριση, η υψηλή αντοχή και η ικανότητα ενσωμάτωσης με διάφορα βιοϋλικά υποδοχής είναι μερικά από τα πιστοποιημένα χαρακτηριστικά των αισθητήρων SAW. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τους αισθητήρες SAW ιδιαίτερα κατάλληλους στο πεδίο ανίχνευσης για ποικίλους στόχους (*Mujahid and Dickert, 2017*), όπως πτητικές οργανικές ενώσεις, τοξικά αέρια, χημικά μέσα για πολεμικές επιχειρήσεις, εκρηκτικά και βιοαναλύτες συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, κύτταρα ζυμομυκήτων για την παρακολούθηση της βιοτεχνολογικής διαδικασίας και καρκινικά κύτταρα για κλινική διάγνωση.

2.3.1.2.4 Θερμικοί βιοαισθητήρες

Οι θερμικοί αισθητήρες βασίζονται στη μεταβολή της θερμοκρασίας η οποία είναι απόρροια της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται κατά τη διάρκεια μιας βιοχημικής αντίδρασης. Η συνολική θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται είναι ανάλογη προς τη μοριακή ενθαλπία και το συνολικό αριθμό των μοριακών προϊόντων που σχηματίστηκαν κατά τη βιοχημική αντίδραση. Από τη στιγμή που παράγεται η θερμότητα και καταναλώνεται στις περισσότερες αντιδράσεις, η μεταβολή αυτή μετατρέπεται σε αναλυτικό σήμα και καταγράφεται η συγκέντρωση του αναλύτη (*Ramanathan and Danielsson, 2001*). Γενικά ένας θερμικός αισθητήρας είναι συνδυασμός ενός κατάλληλου βιοκαταλύτη (ένζυμο) και ενός αισθητήρα θερμοκρασίας, οπότε σχηματίζεται το θερμίστορ ενζύμου (enzyme thermistor), που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κάποιας ουσίας. Τα θερμίστορ ενζύμου είναι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν θερμικές αντιστάσεις για τη μέτρηση της αλλαγής θερμοκρασίας, που προκαλείται από μια ενζυματική αντίδραση. Συνδυάζουν την επιλεκτικότητα των ενζύμων με την ευαισθησία των βιοαισθητήρων και επιτρέπουν τη συνεχή ανάλυση σε συστήματα έγχυσης ροής. π.χ. ουρίας σε ένα δείγμα (*Mishra et al., 2014*).

Οι θερμικοί βιοαισθητήρες διακρίνονται για την ανθεκτικότητά τους, την απλότητα, το χαμηλό κόστος και την εκτεταμένη σταθερότητα. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η γενική αρχή ανίχνευσης που έχει συνδυαστεί με την εξειδίκευση των βιολογικών αντιδράσεων. Μια σειρά από ενζυματικές αντιδράσεις για την ανάλυση της ουρίας, της γλυκόζης, της λακτάσης, της χοληστερόλης, των βαρέων μετάλλων, της φρουκτόζης της έχουν μελετηθεί από θερμικούς βιοαισθητήρες. Οι βασικοί τομείς εφαρμογής των θερμικών βιοαισθητήρων που σχετίζονται με τις μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας είναι η κλινική παρακολούθηση, ο προσδιορισμός πολυανάλυσης, η υβριδική ανίχνευση και η περιβαλλοντική ανάλυση (*Ramanathan and Danielsson, 2001*).

2.3.1.2.5 Χωρητικοί ή εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες

Η συμπεριφορά ενός χωρητικού βιοαισθητήρα σε ιδανικές συνθήκες προσομοιάζει με αυτή του πυκνωτή, ο οποίος αποτελείται από δύο αγώγιμους οπλισμούς και το διηλεκτρικό υλικό. Ο πυκνωτής μπορεί να αποθηκεύει φορτία και μέσω μιας αλγεβρικής εξίσωσης να προσδιορίζεται η χωρητικότητά του. Αντιστοίχως στο βιοαισθητήρα το ηλεκτρόδιο εργασίας λειτουργεί όπως ο ένας οπλισμός του πυκνωτή, με τον ηλεκτρολύτη να αντιπροσωπεύει το δεύτερο οπλισμό. Το διηλεκτρικό υλικό υπό μορφή μονωτικής στοιβάδας αναπτύσσεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και φέρει ένα εκλεκτικό βιοποδοχέα, ως προς ένα αναλύτη, με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του αναλύτη με την τροποποιημένη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων γίνεται αντιληπτή λόγω της μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς ή της αύξησης του πάχους της διηλεκτρικής στοιβάδας στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη (*Προδρομίδης, 2014*). Η συμπεριφορά των χωρητικών βιοαισθητήρων επηρεάζεται από τη συμπεριφορά της στοιβάδας των ακινητοποιημένων βιομορίων και της διηλεκτρικής στοιβάδας (μείωση της ευαισθησίας). Οι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες με βάση τη φύση του μετρούμενου σήματος διακρίνονται στους χωρητικούς (capacitive) και στους φαρανταϊκούς (faradic) αισθητήρες. Οι μεταβολές μπορούν να προσδιοριστούν με μέτρηση της ηλεκτρικής χωρητικότητας ή της σύνθετης αντίστασης είτε με τη χρήση ηλεκτροδίων αλληλεπίδρασης είτε συχνότερα με ποτενσιοστατικές μεθόδους (*Berggren, Biarnason and Johansson, 2001*). Οι χωρητικοί βιοαισθητήρες έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση αντιγόνων, αντισωμάτων, πρωτεϊνών, θραυσμάτων DNA και ιόντων βαρέων μετάλλων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰

3 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

3.1 Εισαγωγή

Η ανίχνευση βιολογικών δραστικών μορίων έχει κρίσιμη σημασία από άποψη βιοϊατρικής, περιβάλλοντος και ασφάλειας. Μια τέτοια ανίχνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένα βιοαισθητήρα. Η αποδοτικότητά του βιοαισθητήρα εξαρτάται από τα συστατικά του μεταξύ των οποίων σημαντικό ρόλο έχει ο τύπος του στερεού υποστρώματος που συγκρατεί το αισθητήριο βιομόριο (υποδοχέας) και είναι γνωστός ως μήτρα. Το υλικό της μήτρας ενισχύει τη μεταγωγή του σήματος και βοηθά στην ακινητοποίηση βιομορίων με διατηρημένη ή ενισχυμένη δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ζωής του βιοαισθητήρα (Arya, et al., 2012). Μια ιδανική διαδικασία ακινητοποίησης πρέπει να εξασφαλίζει τη σταθερή παρουσία των πρωτεϊνών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, διατηρώντας ταυτόχρονα και τις ηλεκτροκαταλυτικές τους ιδιότητες. Η διαδικασία ακινητοποίησης πρωτεΐνης και η βελτίωση της είναι πρωταρχικής σημασίας για την ενίσχυση της απόδοσης του βιοαισθητήρα (Frasconi et al., 2009). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της μήτρας υπαγορεύουν τη μέθοδο ακινητοποίησης και τη λειτουργική σταθερότητα του βιοαισθητήρα.

Από το σύνολο των βιοαισθητήρων, οι ηλεκτροχημικοί αποτελούν την κυριότερη κατηγορία, διότι παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα που τους καθιστούν ιδιαίτερα εκλεκτικούς για χρήση. Έτσι χρησιμοποιούνται σε ποσοστό που υπερβαίνει το 65% με πρώτους σε εφαρμογή του ποτενσιομετρικούς και αμπερομετρικούς, ενώ ακολουθούν οι βιοαισθητήρες με μεταλλάκτη επαγόμενου πεδίου και οι αγωγιμομετρικοί. Κατ' αρχήν η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας κατέστησε δυνατή τη μαζική παραγωγή βιοαισθητήρων ως συμπαγείς, μικρού μεγέθους και χαμηλού κόστους διατάξεις που παρουσιάζουν μηχανική αντοχή, απλότητα και αξιοπιστία μετρήσεων. Επίσης έχουν σύντομους χρόνους απόκρισης, χαμηλές απαιτήσεις ισχύος και μπορούν να εφαρμοστούν σε πολύπλοκα δείγματα. Εν τούτοις, ο στόχος των ερευνητών να χρησιμοποιήσουν αυτούς τους τύπους βιοαισθητήρων ως διαγνωστικές συσκευές για χωρική διάκριση ασθενειών (Esteves-Villanueva, Trzeciakiewicz, and Martic, 2014; Sin et al., 2014), για ανίχνευση και διάγνωση βιομορίων (Lee et al., 2016) για τη χορήγηση φαρμάκων (Ngoepe et al., 2013; Vigneshvar et al., 2016) και την ασφάλεια τροφίμων (Alocilja and Radke, 2003; Thakur and Ragavan, 2013) συνεχίζεται προσδοκώντας στη βελτίωση σημαντικών παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοσή τους.

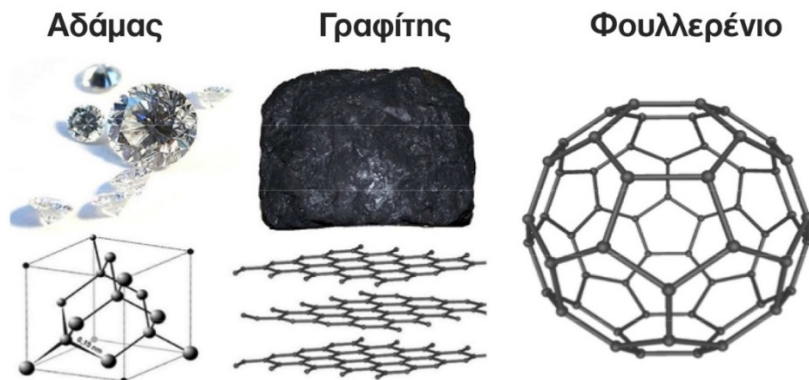
Σε πολλές ερευνητικές προσπάθειες παρατηρήθηκε, ότι σημαντικές απαιτήσεις των βιοαισθητήρων είναι, ότι ο υποδοχέας πρέπει όχι μόνο να είναι εξαιρετικά εκλεκτικός και

ειδικός για το βιομοριακό στοιχείο, αλλά επίσης ότι και ο μεταλλάκτης πρέπει να είναι υπερευαίσθητος και με επαρκή αναπαραγωγικότητα για αξιόπιστες μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο. Για περισσότερη ακρίβεια, η παρουσία της χημικής δέσμευσης ή της βιολογικής εξειδίκευσης για έναν αναλύτη σε μια επισημασμένη τεχνική χρησιμοποιείται για να διασφαλιστεί, ότι μόνο οι σημασμένες βιολογικές δραστηριότητες δίνουν ένα ισχυρό σήμα. Ωστόσο, η τεχνική αυτή απαιτεί μια διαδικασία επισήμανσης κατά την προετοιμασία με φθορίζουσες χρωστικές, μόρια χημειοφωταύγειας, νανοσωματίδια φωτοφωταύγειας και κβαντικές τελείες (quantum dots) (*Suvarnaphaet and Pechprasan, 2017*). Εναλλακτικά, η τεχνική χωρίς επισήμανση (label-free) χρησιμοποιεί μοριακές, φυσικές, μηχανικές, ηλεκτρικές, οπτικές ιδιότητες και αλληλεπίδραση φορτίου για την παρακολούθηση της δέσμευσης. Οι μέθοδοι χωρίς επισήμανση (*Sang et al., 2015*) μπορούν σε πραγματικό χρόνο, να παρακολουθούν τα βιομοριακά συμβάντα και να παρέχουν πιο άμεσες πληροφορίες σχετικά με τα βιομόρια στόχους, χωρίς παρεμποδίσεις από τη διαδικασία επισήμανσης. Σήμερα, οι βιοαισθητήρες χωρίς επισήμανση είναι απαραίτητοι στην εξατομικευμένη γονιδιοματική, τη διάγνωση του καρκίνου και τη μεταφορά μορίων φαρμάκων (*Guigen, 2009*) όπου η ευαισθησία είναι μία από τις βασικές απαιτήσεις που πρέπει έχουν οι σχεδιαζόμενοι βιοαισθητήρες τελευταίας τεχνολογίας (*Li et al., 2016*).

Η εμφάνιση της νανοτεχνολογίας άνοιξε νέους ορίζοντες για τους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. Πιστεύεται ότι εξαιρετικά ευαίσθητοι και εκλεκτικοί βιοαισθητήρες μπορούν να επιτευχθούν μέσω της ενσωμάτωσης των βιομορίων και των νανοϋλικών που βασίζονται σε πλατφόρμες αισθητήρων. Νανοϋλικά, ή μήτρες με τουλάχιστον μία από τις διαστάσεις τους να κυμαίνεται σε κλίμακα από 1 έως 100 nm, εμφανίζουν μοναδικά φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά που αποτελούν την αιτία των επιδράσεων όπως π.χ. το αποτέλεσμα του κβαντικού μεγέθους, του μικρού μεγέθους, της επιφάνειας κ.λπ. Οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στη δημιουργία μητρών ακινητοποίησης / υποστήριξης βιομορίων, με τη χρήση νανοδομημένων υλικών προκειμένου να βελτιωθεί η ηλεκτροχημική ανίχνευση. Οι δομές αυτές έχουν το βασικό πλεονέκτημα της υψηλής ειδικής επιφάνειας, που επιτρέπει την ακινητοποίηση μιας αυξημένης ποσότητας μονάδων βιοϋποδοχέα, και δίνει τη δυνατότητα στο βιοαισθητήρα για ταχύτερη απόκριση, μεγαλύτερη ευαισθησία και μείωση των ορίων ανίχνευσης (*Νικολέλη, 2015*). Με την πρόσφατη πρόοδο των νανοϋλικών και των νανοδομημένων υλικών, οι συσκευές βιοαισθητήρα έχουν δείξει μια δυνητική ανάπτυξη στις μελλοντικές εξατομικευμένες διαγνωστικές/θεραπευτικές πρακτικές περίθαλψης, καθώς και στις περιβαλλοντικές μελέτες και στην ασφάλεια των τροφίμων. Επειδή το μέγεθος των νανοϋλικών είναι διαστάσεων κάτω του μικρού, καθίσταται δυνατή η ταχεία ανάλυση πολλαπλών ουσιών *in vivo*.

3.2 Νανο-υλικά γραφενίου που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων

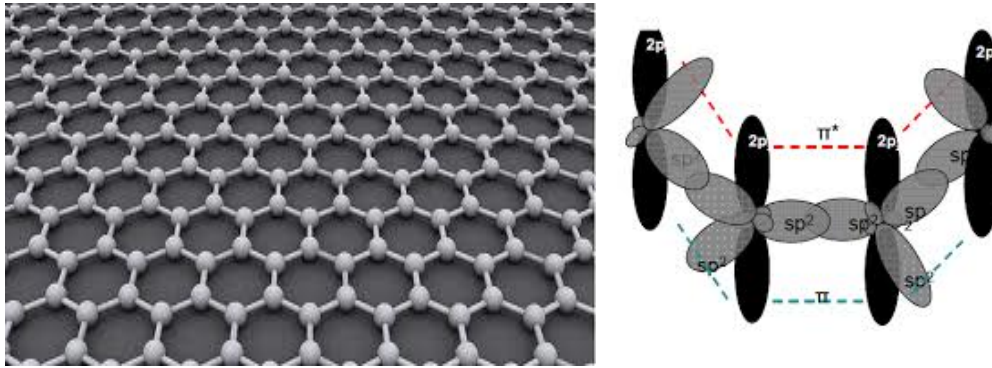
Ο άνθρακας αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή κατασκευαστικά υλικά βιοαισθητήρων που διατίθεται σε διάφορες φυσικές και χημικές μορφές. Οι ευρύτερα γνωστές φυσικές κρυσταλλικές αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα είναι αυτές του γραφίτη, του διαμαντιού και του άμορφου άνθρακα.



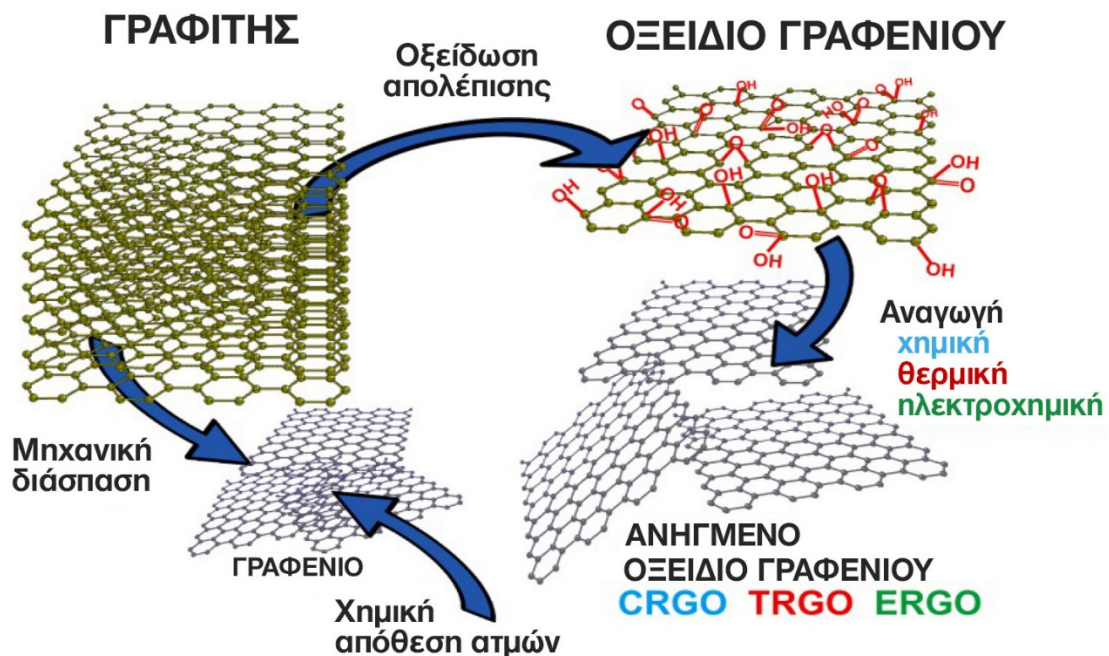
Σχήμα 3.1. Αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα.

Από τις νανομορφές του άνθρακα οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων κατά την τελευταία δεκαετία είναι: τα γραφένια, οι νανοσωλήνες, τα νανοςύρματα, οι νανοράβδοι και τα φουλλερένια. Το γραφένιο αποτελεί την πιο σημαντική αλλοτροπική μορφή του άνθρακα από επιστημονική και τεχνολογική άποψη. Ορίζεται ως **"ένα στρώμα πάχους ενός ατόμου με εξαγωνικά διατεταγμένα, sp^2 -δεσμευμένα άτομα άνθρακα, που εμφανίζονται μέσα σε μια δομή άνθρακα"** (Bianco et al., 2013). Το γραφένιο είναι επίσης γνωστό ως στρώμα γραφενίου ή μονοστιβάδα γραφενίου και σύμφωνα με το πιο πρόσφατο πρότυπο ISO (ISO / TS 80004-13: 2017), είναι **«ένα μονό3 στρώμα ατόμων άνθρακα με κάθε άτομο ομοιοπολικά δεσμευμένο με τρία γειτονικά διατεταγμένα σε σχήμα κυψέλης»**. Αυτό παριστάνεται καλύτερα ως μονοκρυσταλλικό φύλλο από καθαρό άνθρακα που περιέχει ένα μόνο διαστάσιο (2D) στρώμα ατόμων άνθρακα, πυκνά δομημένο σε μια παρόμοια δομή με αυτήν του βενζολικού δακτυλίου (Geim and Novoselov, 2007), όπως φαίνονται στο σχήμα 3.2.

Το γραφένιο μπορεί να κατασκευαστεί μέσω μιας πληθώρας διαδρομών με το καθένα να έχει τα δικά του μοναδικά πλεονεκτήματα (π.χ. κόστος, χρόνος κατασκευής, ποιότητα και κλίμακα). Το καθαρό παρθένο γραφένιο, δεν μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί ως βάση των ηλεκτροχημικών αισθητήρων λόγω του υψηλού κόστους και της έλλειψης κλιμακωτής κατασκευής. Ως εκ τούτου, το συχνότερα χρησιμοποιούμενο υλικό επιλογής για τους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες και τις συναφείς εφαρμογές, την ευκολία κατασκευής και την ικανότητα παραγωγής σε μαζική κλίμακα είναι το **ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (RGO)**, το οποίο κατασκευάζεται συνήθως από την οξείδωση / απολέπιση του γραφίτη σε **οξείδιο του γραφενίου (GO)** και στη συνέχεια τη μείωση του σε γραφένιο μέσω μιας ποικιλίας οδών όπως χημικών, θερμικών ή ηλεκτροχημικών (Hammond et al., 2016; Rowley-Neale et al., 2018).



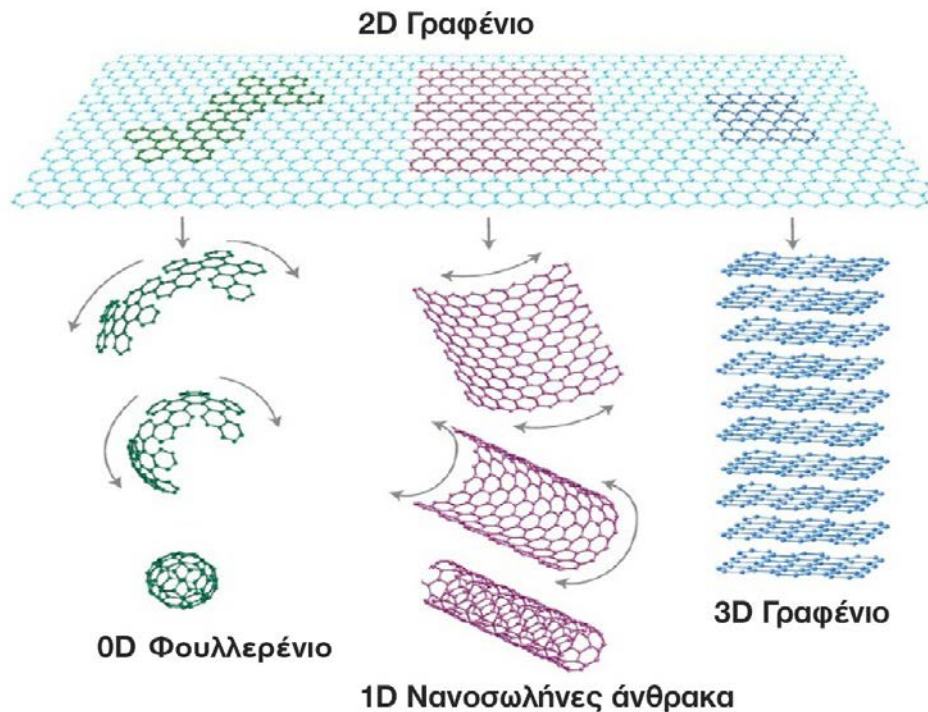
Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση του κρυσταλλικού πλέγματος του γραφενίου αποτελούμενου από άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε κυψελωτή διδιάστατη διάταξη. Οι δεσμοί sp^2 (γκρι απόχρωση) που δημιουργούν τα γειτονικά άτομα άνθρακα στο κρυσταλλικό πλέγμα του γραφενίου και τα τροχιακά $2p_z$ στα οποία κινείται το τέταρτο ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου άνθρακα.



Σχήμα 3.3. Ένα σχήμα που παρουσιάζει τους διάφορους τρόπους παραγωγής γραφενίου και παρασκευές υλικών που βασίζονται στο γραφένιο. CRGO= χημικώς ανηγμένο οξείδιο γραφενίου, TRGO= θερμικώς ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου, ERGO= ηλεκτροχημικώς ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου.

Το γραφένιο παρουσιάζει μοναδικές θερμικές, ηλεκτρικές, και μηχανικές ιδιότητες που προκύπτουν αυστηρά από τη δισδιάστατη (2D) δομή του, και προσφέρει τεράστιες δυνατότητες για τεχνικές εφαρμογές. Μεταξύ των υφιστάμενων νανοϋλικών το γραφένιο παρουσιάζει την πιο μεγάλη ειδική επιφάνεια ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$ για γραφένιο μονής στρώσης) που είναι διαθέσιμη για άμεση αλληλεπίδραση σε ένα ευρύ φάσμα βιομορίων. Παρουσιάζει υψηλό συντελεστή Young ($\sim 1,0 \text{ TPa}$) δηλαδή υψηλή μέτρο ελαστικότητας, υψηλή θερμική αγωγιμότητα ($\sim 5000 \text{ W/m}^1 \cdot \text{K}^{-1}$), υψηλή οπτική μετάδοση ($\sim 97,7\%$), υψηλή κινητικότητα ηλεκτρονίων ($200.000 \text{ cm}^2/\text{vs}$), και καλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. (Geim and Novoselov, 2007; Tadyszak, Wychowaniec and Litowczenko, 2018). Το

ηλεκτροχημικό δυναμικό του γραφενίου είναι 2,5 V σε 0,1 PBS, το οποίο είναι υψηλότερο από τα περισσότερα υλικά που βασίζονται στον άνθρακα. Είναι το λεπτότερο υλικό στον κόσμο, είναι εύκαμπτο, αλλά πιο σκληρό από το διαμάντι (Lee, et al., 2008) και παράγει ηλεκτρική ενέργεια ταχύτερα σε θερμοκρασία δωματίου από οποιοδήποτε άλλο υλικό (Geim and Novoselov, 2007). Αποτελεί τη βασική δομή όλων των γραφιτικών υλικών (σχ. 3.4)



Σχήμα 3.4. Το γραφένιο αριστερά τυλίσσεται δημιουργώντας φουλερένιο 0D, στο κέντρο διπλώνεται δημιουργώντας νανοσωλήνα άνθρακα 1D και δεξιά στοιβάζεται δημιουργώντας γραφίτη 3D.

Οι μεμβράνες με βάση το γραφένιο είναι αδιαπέραστες σε όλα τα αέρια και υγρά (δηλ. είναι στεγανές σε κενό). Το πάχος της μεμβράνης του γραφενίου με πλευρικό μέγεθος 100 μm παρατηρείται ως επίπεδα άνθρακα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δυνάμεις van der Waals, που δρουν σε απόσταση περίπου 0,335 nm. Πρόκειται για ένα διαφανές υλικό με πολύ χαμηλό κόστος παραγωγής, χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο, εύκολη κατασκευή χωρίς τα συνηθισμένα προβλήματα που σχετίζονται με τους νανοσωλήνες άνθρακα, όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ακαθαρσιών που μπορεί να οδηγήσει σε απροσδόκητες και ανεξέλεγκτες ηλεκτροκαταλυτικές επιδράσεις και ο πολύ αργός ετερογενής ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα τοιχώματα (Ambrosi, Sasaki and Pumera, 2010). Για το γραφένιο οι τιμές της ετερογενούς ταχύτητας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο άκρο είναι 0,10 cm /s και στο βασικό επίπεδο είναι 1×10^{-7} cm /s.

Ανάλογα με τον αριθμό των συσσωρευμένων (στοιβαγμένων) στρώσεων το γραφένιο χαρακτηρίζεται ως: α) μονής στρώσης β) λίγων στρωμάτων (2-10 στρώσεις) γ) πολυστρωματικό, το οποίο είναι γνωστό και ως λεπτός γραφίτης. Για τη διατήρηση το γραφένιο τις διακριτές του ιδιότητες θα πρέπει η χρήση του να περιοριστεί στη μορφολογία της μιας στρώσης ή των λίγων στρωμάτων. Ωστόσο πλεονεκτικές ιδιότητες

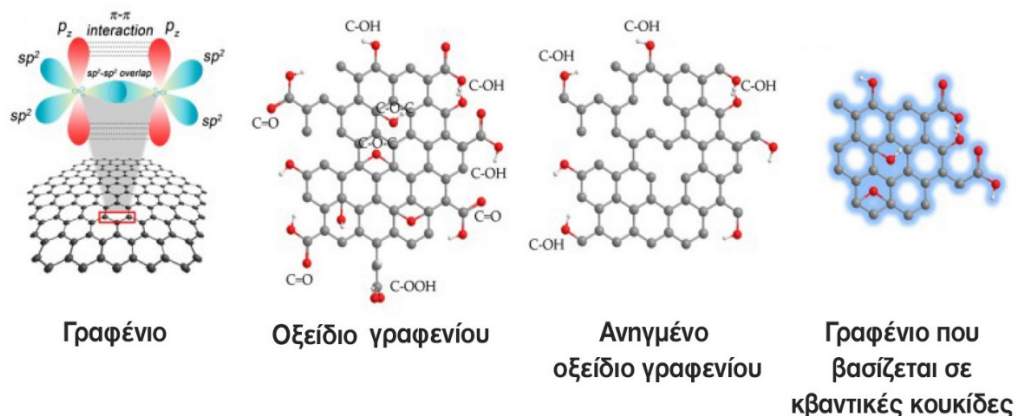
μπορούν ακόμα να παρατηρηθούν και σε μορφή λεπτού γραφίτη. Ο αριθμός στρώσεων γραφενίου που απαιτούνται για να ταιριάζουν πλήρως με τις ιδιότητες του χύδην γραφίτη είναι πάνω από 100 και η καταμέτρησή τους γίνεται με φασματοσκοπία Raman, AFM, απεικόνιση Rayleigh και μεθόδους οπτικής μικροσκοπίας (*Ambrosi, Sasaki and Pumera, 2010*)

Η ηλεκτρονική ποιότητα του γραφενίου είναι εξαιρετική και στηρίζεται στις δύο βασικές ιδιότητες: την κινητικότητα των ηλεκτρονίων και τη χαμηλή ειδική αντίσταση, γεγονός που τις κάνει, να κατατάσσονται μεταξύ των καλύτερων επιδόσεων για οποιοδήποτε υλικό. Από τις υπόλοιπες ιδιότητες, οι περισσότερες εξαρτώνται από τον αριθμό των στρώσεων του γραφενίου (*Artiles, Rout and Fisher, 2011*). Επίσης υψηλού ενδιαφέροντος είναι οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες του γραφενίου, με την κύρια ηλεκτροχημική του χρησιμότητα να βασίζεται α) στο ευρύ ηλεκτροχημικό παράθυρο δυναμικού β) στη χαμηλή αντίσταση φορτίου σε σύγκριση με τον υαλώδη άνθρακα και γ) στις καλά καθορισμένες κορυφές οξειδοαναγωγής, όπως συμβαίνει με τις αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις στην κυκλική βολταμετρία (μεγάλες τιμές της ταχύτητας μεταφοράς φορτίου) οι οποίες είναι γραμμικά ευθυγραμμισμένες με την τετραγωνική ρίζα του ρυθμού σάρωσης, υποδηλώνοντας ότι η οξειδοαναγωγή ελέγχεται καθαρά από τη διάχυση. (*Artiles, Rout and Fisher, 2011*). Τα ηλεκτρόδια γραφενίου λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους επιδεικνύουν υψηλό φορτίο ενζύμων, πράγμα που οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία. Επίσης από το εμβαδόν της επιφάνειας των ηλεκτροδίων εξαρτάται και ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο οποίος μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με τη δημιουργία συγκεκριμένων επιφανειακών λειτουργικών ομάδων. Η έρευνα έδειξε ότι οι άκρες των φύλλων γραφενίου διαθέτουν μια ποικιλία οξειδωμένων ειδών και ότι η διαφορά στη μεταφορά ηλεκτρονίων οφείλεται κυρίως στη συγκέντρωση αυτών των ειδών (οξειδίων) που παρουσιάζονται στο ηλεκτρόδιο και όχι στην απορρόφηση της επιφάνειας.

Οι χρήσεις υλικών με βάση το γραφένιο για κατασκευή βιοαισθητήρων περιλαμβάνει δύο απόψεις. Η μία βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις φορτίου-βιομορίων σε π-π περιοχές, σε ηλεκτροστατικές δυνάμεις και ανταλλαγή φορτίου που οδηγούν σε ηλεκτρικές παραλλαγές στο παρθένο (pristine) γραφένιο. Οι άλλες χρήσεις είναι η επίδραση των ελαττωμάτων, της αταξίας και της χημικής λειτουργοποίησης για την ακινητοποίηση των μοριακών υποδοχέων στην επιφάνεια των υλικών με βάση το γραφένιο, δηλαδή του *οξειδίου του γραφενίου* (graphene oxide, GO), του *ανηγμένου οξειδίου του γραφενίου* (reduced graphene oxide, RGO) και των *κβαντικών κουκκίδων* (graphene-based quantum dots, GQDs). Το σχήμα 3.5 δείχνει τους κύριους τύπους υλικών με βάση το γραφένιο, που είναι χρήσιμοι στην κατασκευή βιοαισθητήρων (*Suvarnaphaet and Pechprasan, 2017*).

Μεγάλο πλήθος τεχνικών και μεθόδων σύνθεσης του γραφενίου έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Η πιο διάσημη και εύκολη μέθοδος παραγωγής μονής στρώσης γραφενίου είναι αυτή της **μικρομηχανικής αποφυλλοποίησης** που έγινε για πρώτη φορά το 2004 στο Πανεπιστήμιο Mechester από πυρολυτικό γραφίτη, χρησιμοποιώντας ειδική συγκολλητική ταινία. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν δύο κύριες τεχνολογίες για την παραγωγή του γραφενίου: α) επαναλαμβανόμενη μηχανική απολέπιση νιφάδων γραφίτη

και β) ανάπτυξη με χημική εναπόθεση ατμού (Chemical Vapor Deposition, CVD) σε διαφορετικά υποστρώματα μετάλλων μετάπτωσης (Ni, Cu, Co και Ru) ή σε διαφορετικούς υδρογονάνθρακες. Ούτε η μία, ούτε η άλλη τεχνική παραγωγής περιέχουν μεγάλες ποσότητες ελαττωμάτων ή λειτουργιών. Η χημική δείχνει να έχει καλύτερη βιολογική απόδοση, λόγω των μεγαλύτερων περιοχών υποστρώματος από τους άλλους τρόπους παραγωγής. Ωστόσο οι μαζικές ποσότητες νανοϋλικών που βασίζονται στο γραφένιο, παρασκευάζονται με **αναγωγή του διοξειδίου του γραφενίου (GO)**.



Σχήμα 3.5. Οι δομές υλικών με βάση το γραφένιο (α) παρθένο γραφένιο με sp^2 -υβριδοποιημένα άτομα άνθρακα, και το χημικώς τροποποιημένο γραφένιο που περιλαμβάνει (β) το οξειδίο γραφενίου (GO), (γ) το ανηγμένο οξειδίο γραφενίου (RGO) και (δ) το γραφένιο που βασίζεται σε κβαντικές τελείες (GQD).

Το GO προέρχεται από την απολέπιση του οξειδίου του γραφίτη, η δομή του οποίου για περισσότερα από εκατό χρόνια έρευνας, εξακολουθεί να υπόκειται σε συζήτηση. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα χημικώς τροποποιημένο γραφένιο το οποίο συνήθως παρασκευάζεται με οξείδωση και απολέπιση των λειτουργικών ομάδων οξυγόνου που είναι συνδεδεμένες με το γραφίτη, όπως καρβοξυλ(-OOH), υδροξυλ(-OH) ή εποξυ(-O) στα βασικά επίπεδα και στις άκρες με την τροποποιημένη μέθοδο *Hummers (Tadyszak, Wychowaniec and Litowczenko, 2018)*. Από την οξείδωση του γραφίτη οι οξυγονωμένες λειτουργικές ομάδες εισάγονται στη δομή του γραφίτη και έτσι επεκτείνεται όχι μόνο ο διαχωρισμός των στρωμάτων, αλλά επίσης καθιστά το υλικό υδρόφιλο, ιδιότητα που επιτρέπει στο οξειδίο του γραφίτη να απολεπιστεί σε νερό ή σε οργανικούς διαλύτες με χρήση υπερήχων, παράγοντας τελικά μονό- ή λίγο-στρωματικό γραφένιο, που είναι γνωστό ως GO. Το GO έχει μια δομή που δεν είναι πλήρως επίπεδη επειδή το δίκτυο άνθρακα sp^2 είναι βαριά κατεστραμμένο. Περιέχει μεγάλες ποσότητες ομάδων που περιέχουν οξυγόνο, γεγονός που μπορεί να είναι επωφελές για τη λειτουργικοποίηση, μέσω της δράσης των βιομορίων κατά τη διαδικασία της βιοαναγνώρισης. Συμπερασματικά το GO είναι ένα παράγωγο του γραφίτη που περιέχει ομάδες οξυγόνου (καρβοξυλ-, υδροξυ-, και εποξυ-ομάδες) οι οποίες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες πάνω στην επιφάνεια του, ενώ το υλικό αυτό συγκρατεί την φυλλόμορφη δομή του με μεγαλύτερο ενδοστρωματικό χώρο από τον αρχικό γραφίτη, εξαιτίας της παρουσίας των μορίων του νερού ανάμεσα στα φύλλα του.

Διάφορες επεξεργασίες, όπως χημική, θερμική, φωτοχημική, φωτοθερμική, επεξεργασία με μικροκύματα ή μικροοργανισμούς / βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν πάνω στο GO για να μειώσουν την περιεκτικότητα του σε οξυγόνο με τελικό αποτέλεσμα στην παραγωγή του λεγόμενου **ανηγμένου οξειδίου του γραφενίου RGO (ISO / TS 80004-13: 2017)**. Οι ανηγμένες μορφές έχουν ένα μερικώς αποκαταστημένο πλέγμα sp^2 , καθώς εξακολουθούν να κατέχουν κάποιο μέρος ομάδων που περιέχουν οξυγόνο. Το θερμικά ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (TRGO) περιέχει μεγάλες ποσότητες ελαττωμάτων και διαφέρει σημαντικά από το παρθένο γραφένιο, το οποίο έχει μια τέλεια δομή πλεγμάτων κηρήθρας. Η παρουσία των ελαττωμάτων δεν είναι μειονεκτική. Αντίθετα, είναι γνωστό ότι η ετερογενής μεταφορά ηλεκτρονίων στην ηλεκτροχημεία των sp^2 ανθράκων συμβαίνει στις άκρες και στα ελαττώματα και όχι στο βασικό επίπεδο των φύλλων γραφενίου (Pumera, 2011). Ο βαθμός αναγωγής του GO επηρεάζει σημαντικά τις φυσικές ιδιότητες των χημικά ανηγμένων υλικών του οξειδίου, όπως π.χ. το λόγο άνθρακα προς οξυγόνο καθώς και την ηλεκτρική αγωγιμότητα η οποία ποικίλλει ανάλογα με την χημική σύσταση των αναγωγικών μέσων. Επίσης τροποποίηση του GO με οργανικά ή ανόργανα μόρια επιδρά στις μαγνητικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες του γραφενίου καθώς λειτουργεί ως δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων με τα μόρια που εισέρχονται στον ενδοστρωματικό χώρο. Κατά την τροποποίηση αυξάνονται οι ατέλειες στο πλέγμα και πολλά από τα sp^2 άτομα άνθρακα μετατρέπονται σε sp^3 . Αυτό επιδρά στις ηλεκτρικές ιδιότητες καθιστώντας πολλά υποσχόμενο υλικό στον χώρο της νανοηλεκτρονικής με τις πιο ελπιδοφόρες εφαρμογές του τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου, η κατασκευή βιοαισθητήρων για τη διάγνωση ασθενειών. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει ότι η τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου μειώνει την τοξικότητα του γραφενίου το οποίο βρίσκει βιο-ιατρικές εφαρμογές.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν αρκετοί τύποι γραφενίου που βασίζονται σε κβαντικές τελείες (GQDs) λόγω των εξαιρετικών οπτικών χαρακτηριστικών τους. Οι κβαντικές τελείες είναι «αδιάστατα» σωματίδια στη νανοκλίμακα, με μέγεθος μόλις μερικών νανομέτρων. Λόγω του εξαιρετικά μικρού μεγέθους τους, υπόκεινται στους νόμους της κβαντικής φυσικής, γεγονός που τους προσδίδει μοναδικές οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες, (εκπομπή φωτός ρυθμιζόμενης έντασης, ταυτόχρονη διέγερση πολλαπλών χρωμάτων φθορισμού, υψηλή φωτεινότητα σήματος, φωτοσταθερότητα κ.λπ). Παρουσία φωτοφωταύγειας οι GQDs αναπτύσσουν ειδική ικανότητα δέσμευσης (σύνδεσης) σε ένα ευρύ φάσμα βιομορίων με σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της φωτοευαισθησίας τους, τη χαμηλή ένταση σήματος και τη χαμηλή φασματική αλληλοεπικάλυψη (Jin, 2011). Το πιο σημαντικό όμως είναι, ότι τα νέα αυτά υλικά είναι λιγότερο τοξικά και είναι συμβατά με την κυτταρική εσωτερικευση (internalization).

Σχετικά με την ανάπτυξη της ηλεκτροχημικής τεχνολογίας, τα μικροηλεκτρόδια γραφενίου που έχουν ενσωματωθεί με διπλοστοιβάδες λιπιδικές μεμβράνες έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα τόσο σε στατικά όσο και σε ανάμεικτα πειράματα (Nikoleli et al., 2017). Επιπλέον, εξαιτίας της υποστήριξης από λιπιδική μεμβράνη, ο βιοαισθητήρας επιτυγχάνει καλή αναπαραγωγικότητα, επαναχρησιμοποίηση, υψηλή εκλεκτικότητα, χρόνους γρήγορης απόκρισης, μεγάλη διάρκεια ζωής και υψηλή ευαισθησία. Αυτό επιτρέπει μια άμεση ποτενσιομετρική μέτρηση. Οι Nikolelis et al. έχουν αναφέρει τη

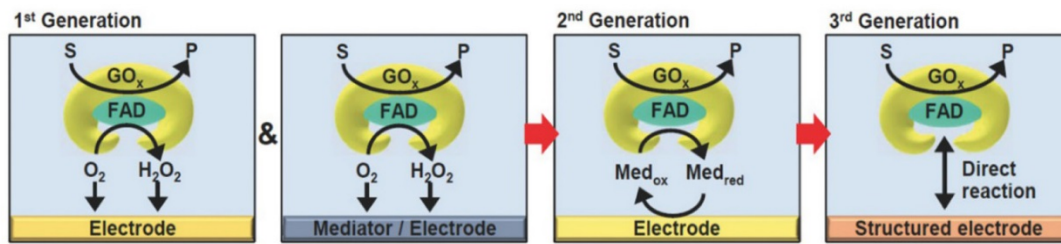
χρήση των μικροηλεκτροδίων γραφενίου για την ανίχνευση τοξικών ουσιών, όπως καρμποφουράνιου σε φρούτα, σαξιτοξίνη, τοξίνη χολέρας, διάγνωση d-διμερών, ουρίας και χοληστερόλης (*Suvarnaphaet and Pechprasan, 2017*).

3.3 Εφαρμογές βιοαισθητήρων που βασίζονται σε γραφένιο

3.3.1 Βιοαισθητήρες γλυκόζης που βασίζονται σε γραφένιο

Η ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα του γραφενίου ως προς το υπεροξειδίο του υδρογόνου και η άμεση ηλεκτροχημική απόκριση ως προς το ένζυμο, οξειδάση της γλυκόζης, καθιστά τη χρήση γραφενίου και των παραγώγων του κατάλληλο συστατικό υποψήφιου βιοαισθητήρα για την άμεση ηλεκτροχημεία της οξειδάση της γλυκόζης. Η ένταξη των ενζύμων στα ηλεκτρόδια αποτελεί το πρώτο βήμα στην κατασκευή βιοαισθητήρα, επειδή τα ένζυμα είναι εξαιρετικά επιλεκτικά και ανταποκρίνονται γρήγορα σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Οι **ενζυματικοί βιοαισθητήρες** βασίζονται στην άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ενζύμων οξειδοαναγωγής και της επιφάνειας των ηλεκτροδίων. Η επιτάχυνση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Η οξειδάση της γλυκόζης (GOD) χρησιμοποιείται ως ένζυμο στους περισσότερους βιοαισθητήρες γλυκόζης, καθώς καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης παρουσία οξυγόνου προς παραγωγή γλυκονολακτόνης και H_2O_2 . Το **νουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης** (FAD, υπομονάδα του ενζύμου) είναι το ενεργό κέντρο του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την οξειδοαναγωγική αντίδραση. Η ποσοτικοποίηση της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης του ενζυμικά απελευθερούμενου H_2O_2 (*Atta, Galal and Ekram, 2015*).

Οι **βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς** γλυκόζης ανιχνεύουν ηλεκτροχημικά το H_2O_2 που παράγεται στο ηλεκτρόδιο λόγω ενζυματικής δράσης, αλλά η παραγωγή του H_2O_2 εξαρτάται από το οξυγόνο που απαιτεί υψηλότερο δυναμικό ανίχνευσης, γιατί παρεμβαίνουν σε αυτό κι άλλες οξειδοαναγωγικές ενώσεις. Οι **βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς** που βασίζονται στην οξειδάση της γλυκόζης εξαλείφουν πλήρως την εξάρτηση από το οξυγόνο, για το σχηματισμό H_2O_2 χρησιμοποιώντας οξειδοαναγωγικούς μεσολαβητές (mediators). Αυτοί βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή και μπορούν να διαχέονται ελεύθερα για να φτάσουν στο FAD ή ενσύρματα μέσω ηλεκτρονίων μεταφοράς ενζύμου στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα, και στη συνέχεια να παράγουν ένα αμπερομετρικό σήμα (*Badhulik et al., 2015*). Οι **βιοαισθητήρες γλυκόζης τρίτης γενιάς** λειτουργούν σε χαμηλότερο δυναμικό χωρίς τη χρήση οξειδοαναγωγικών μεσολαβητών με απ' ευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων (DET) από το οξειδοαναγωγικό κέντρο στο ηλεκτρόδιο.



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση των τριών γενεών βιοαισθητήρων που βασίζονται στην οξειδάση της γλυκόζης

Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν τροποποιημένα ένζυμα οι δομές των οποίων διευκολύνουν την απ' ευθείας ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ των ηλεκτροδίων και των ενσωματωμένων ενζύμων. Η μεγαλύτερη δυσκολία στην μεταφορά ηλεκτρονίων οφείλεται στην πυκνή πρωτεΐνη που είναι ενσωματωμένη στο ενεργό κέντρο οξειδοαναγωγής. Παρά το γεγονός ότι γλυκόζη και οι μεσολαβητές έχουν πρόσβαση στο κέντρο μέσω διάχυσης και διείσδυσης του 3D μοριακού δικτυώματος, αυτό δεν είναι δυνατό να γίνει σε ένα επίπεδο ηλεκτρόδιο (*Toghill and Compton, 2010*). Με την ανάπτυξη όμως των νανοδομών ηλεκτρονίων, όπως ηλεκτρόδια από νανοσωλήνες άνθρακα και ιδιαιτέρως πορωδών υλικών η επιφάνεια των ηλεκτροδίων, που παγιδεύει και περικλείει το ένζυμο, έχει αυξηθεί με αποτέλεσμα να μπορεί να συζευχθεί με την οξειδάση της γλυκόζης, έτσι ώστε το ηλεκτροχημικά ενεργό κέντρο FAD να μεταφέρει ηλεκτρόνια απευθείας στα ηλεκτρόδια (*Lee et al., 2018*). Κατά τη μεταφορά άμεσα παρατηρείται ένα ρεύμα που αντιστοιχεί στην οξείδωση του ενζύμου χωρίς τις επιπλοκές των μεσολαβητών την εισβολή των ηλεκτροενεργών παρεμποδίσεων ή την εξάρτηση από το διαλυμένο οξυγόνο.

Ο Kang κ.ά χρησιμοποίησε μια νανოსύνθεση οξειδίου γραφενίου-χιτοζάνης (GO/chitosan) για την τροποποίηση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα, ο οποίος φέρει υψηλή συγκέντρωση οξειδάσης της γλυκόζης περίπου $1,12 \times 10^{-9}$ mol/cm². Η βιοδραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου κατακρατήθηκε από τη χιτοζάνη και το γραφένιο, που είχε διασπαρεί στο διάλυμα χιτοζάνης. Η γραμμική απόκριση του βιοαισθητήρα (GO/chitosan/GOD) βρέθηκε από 0,08 έως 12 mM και το όριο ανίχνευσης 0,02 mM (*Kang et al., 2009*). Για επαρκή διασπορά του ανηγμένου οξειδίου του γραφενίου (RGO) και ακινητοποίηση του αρνητικά φορτισμένου ενζύμου ο Shan κ. ά. κατασκεύασαν ένα νέο ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα γραφενίου με ιοντικό υγρό ενεργοποιημένης πολυαιθυλενιμίνης/οξειδάσης της γλυκόζης (RGO/GOD/PFIL) που προστατεύεται από πολυβινυλοπυρρολιδόνη. Ο βιοαισθητήρας επιτυγχάνει την άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων του ενζύμου, διατηρεί τη βιοδραστικότητά του και παρουσιάζει πιθανή εφαρμογή για την παρασκευή νέων βιοαισθητήρων γλυκόζης με γραμμική απόκριση γλυκόζης 2-14 mM και καλή αναπαραγωγικότητα (*Shan et al., 2009*).

Μια άμεση ηλεκτροχημική μέθοδος προσδιορισμού της γλυκόζης προτάθηκε από το Wang κ.ά για αναγωγή του μονού στρώματος οξειδίου του γραφενίου προσροφημένου σε αγώγιμα ηλεκτρόδια τροποποιημένα με 3-αμινοπροπυλ-τριαθοξυσιλάνιο (APTES). Το

ανηγμένο GO προσροφημένο στο υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιήθηκε με οξειδάση γλυκόζης, με ομοιοπολική σύνδεση μέσω ενός πολυμερούς που δημιουργήθηκε με ηλεκτρογραφικό ακρυλικό N-σουξινιμιδύλιο. Στο λαμβανόμενο ηλεκτρόδιο (GCE-APTES-RGO-GOD) η βιοδραστικότητα του του ενζύμου διατηρείται πολύ καλά με απ' ευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και των μορίων της οξειδάσης (Wang et al., 2009). Ο βιοαισθητήρας έδειξε γραμμική περιοχή ανίχνευσης 0-24 mM και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ανίχνευση της γλυκόζης ανοίγοντας μια πιθανή εφαρμογή κατασκευής βιοαισθητήρα.

Επίσης, το υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα (GCE) τροποποιήθηκε με ηλεκτροχημικά ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου /δωδέκυλο θειικό νάτριο (GCE /ERGO/SDS) και ακολούθως με οξειδάση της γλυκόζης για να χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρας ενζυματικής γλυκόζης. Έλεγχος με κυκλική βολταμετρία έδειξε ένα ζεύγος αναστρέψιμων κορυφών να παρουσιάζεται στο ηλεκτρόδιο GCE/ERGO/SDS/GOD. Ο διαχωρισμός αιχμής-αιχμής του ακινητοποιημένου ενζύμου είναι 28 mV σε 0,1 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,0) με ρυθμό σάρωσης 50 mV/s. Ο βιοαισθητήρας που προέκυψε είχε καλή απόκριση στη γλυκόζη με γραμμικό εύρος από 1 έως 8 mM, καλή αναπαραγωγικότητα και όριο ανίχνευσης 40,8 μ M (Atta, Galal and Ekram, 2015).

Για την περαιτέρω αξιοποίηση του ενδογενών πλεονεκτημάτων του γραφενίου ως βιοαισθητήρα ομάδα ερευνητών (Wang et al., 2010) χρησιμοποίησε επεξεργασμένο πλάσμα αζώτου στη σύνθεση γραφενίου, μέσω χημικής μεθόδου για την παρασκευή ντοπαρισμένου με άζωτο (N-doped) γραφενίου (N-RGO). Το ποσοστό του αζώτου κυμαίνεται από 0,11 έως 1,35% και ρυθμίζεται με έλεγχο του χρόνου έκθεσης του γραφενίου στο πλάσμα. Το παρασκευασμένο με αυτό τον τρόπο γραφένιο παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα για τη μείωση του H₂O₂ και την ταχεία άμεση κινητική μεταφορά ηλεκτρονίων για την οξειδάση της γλυκόζης. Οι παράγοντες αυτοί συνέβαλαν στην ενίσχυση του αναγωγικού ρεύματος κατά περίπου 20 φορές περισσότερο από ένα γυμνό ηλεκτρόδιο γραφενίου. Ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τη βιοανίχνευση της γλυκόζης με συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 0,01 mM παρουσία παρεμποδιστών.

Είναι γνωστό, ότι η αρχή της λειτουργικότητας των βιοαισθητήρων RGO είναι να χρησιμοποιήσουν τις θέσεις ελαττωμάτων τους, οι ρίζες των οποίων είναι διάφορες ομάδες -OH, -C=O -O- κ.λπ. για την ακινητοποίηση των βιομορίων. Ωστόσο οι θέσεις των ελαττωμάτων προς χρήση δεν είναι ομοιόμορφες και δεν ελέγχονται με ακρίβεια. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αναπτύχθηκε μια εναλλακτική μέθοδος κατασκευής γραφενίου με χημική εναπόθεση ατμών (CVD), που προσδίδει στο RGO πλεονεκτήματα ως προς τη ομοιομορφία του και τη δυνατότητα ελέγχου, μέσω επιφανειακής τροποποίησης της δομής του, χρησιμοποιώντας αλληλεπιδράσεις π-π (Huang et al., 2010; Kim et al., 2009).

Ο Kwak κ. ά. χρησιμοποιώντας γραφένιο με χημική εναπόθεση ατμών σχεδίασαν έναν βιοαισθητήρα κατασκευής τρανζίστορ γραφενίου επίδρασης πεδίου (field effect transistor, FET) υγρής θύρας δυναμικού, σε ένα εύκαμπτο υπόστρωμα πολυαιθυλενοτερεφθαλικού οξέος. Το γραφένιο που αναπτύχθηκε ενεργοποιήθηκε με

μόρια συνδετήρα, προκειμένου να ακινητοποιηθούν τα ένζυμα, που προκαλούν καταλυτική απόκριση της γλυκόζης (Kwak et al., 2012). Ο βιοαισθητήρας έδειξε αμφιπολικά χαρακτηριστικά μεταφοράς και μπορούσε να ανιχνεύσει επίπεδα γλυκόζης στην περιοχή των 3,3-10,9 mM, η οποία καλύπτει κυρίως την περιοχή αναφοράς της ιατρικής εξέτασης ή της εξέτασης διαγνωστικού ελέγχου του διαβήτη Παρέχει εξαιρετική προσαρμογή ακόμα και όταν παραμορφώνεται, υψηλή διαχωριστική ικανότητα και συνεχή παρακολούθηση της γλυκόζης σε πραγματικό χρόνο, ενώ είναι πολλά υποσχόμενος για φορητές και εμφυτεύσιμες εφαρμογές παρακολούθησης του επιπέδου της γλυκόζης.

Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες γλυκόζης κατασκευάστηκαν επίσης χρησιμοποιώντας ενεργοποιημένα (functionalized, f) νανόφυλλα γραφενίου, νανοσωματίδια Pt-Au και Au, και το πολυμερές nafion. Η ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης έγινε πάνω στο πολυμερές με τα ευδιάλυτα μεταλλικά νανοσωματίδια Pt-Au και Au διασκορπισμένα στα ηλεκτρόδια γραφενίου με φυσική προσρόφηση (Atta, Galal and Ekram, 2015). Το βιοηλεκτρόδιο που προέκυψε διατηρεί τη βιοκαταλυτική του δραστηριότητα και καθιστά την ποσοτικοποίηση της γλυκόζης γρήγορη και ευαίσθητη. Ιδιαίτερως ο βιοαισθητήρας με βάση το [f-G- (Au)] έδειξε καλύτερη απόδοση με γραμμική απόκριση έως 30 mM με εξαιρετικό όριο ανίχνευσης 1 μM.

3.3.2 Βιοαισθητήρες γλυκόζης και υπεροξειδίου του υδρογόνου που βασίζονται σε γραφένιο

Οι εξαιρετικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων του γραφενίου και των μεταλλικών οξειδίων έχουν συνδυαστεί και παρέχουν μια νέα προσέγγιση για κατασκευή εξαιρετικά ευαίσθητων ενζυματικών και μη-ενζυματικών βιοαισθητήρων γλυκόζης και H₂O₂. Οι ενζυματικοί βιοαισθητήρες H₂O₂ έχουν τα πλεονεκτήματα της υψηλής απόδοσης και της καλής εκλεκτικότητας. Ωστόσο η ακινητοποίηση και σταθεροποίηση του ενζύμου είναι περίπλοκη και είναι δύσκολο να επιτευχθεί η απ' ευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων σε γυμνό ηλεκτρόδιο. Με την ανάπτυξη των νανοϋλικών του άνθρακα βελτιώθηκε η επίδοση των βιοαισθητήρων H₂O₂.

Για παράδειγμα, μία βιονανοσύνθεση μεμβράνης αποτελούμενη από οξειδάση της γλυκόζης/λειτουργικά φύλλα γραφενίου/νανοσωματίδια λευκοχρύσου/χιτοζάνη (GOD/Pt/FGS/chitosan) χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση της γλυκόζης. Με την ηλεκτροκαταλυτική συνέργεια των νανοσωματιδίων γραφενίου και Pt, με το H₂O₂, επιτεύχθηκε ένας ευαίσθητος βιοαισθητήρας με γραμμικό εύρος ανίχνευσης από την περιοχή υπο-μM έως 5 mM και όριο ανίχνευσης 0,6 μM γλυκόζης (Wu et al., 2009). Επίσης παρουσίασε καλή αναπαραγωγιμότητα, σταθερότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα και χωρίς παρεμποδισείς από τα συνυπάρχοντα οξέα ασκορβικό και ουρικό οξύ

Αντί της χρήσης των νανοσωματιδίων Pt άλλοι ερευνητές (Shan et al., 2010) εισήγαγαν νανοσωματίδια χρυσού (Au) για την τροποποίηση του ηλεκτροδίου οξειδίου του γραφενίου/χιτοζάνη/χρυσός (RGO/CHI/Au), το οποίο εμφάνισε επίσης καλή

ηλεκτροκαταλυτική δράση στο H_2O_2 . Ακολούθως, όταν η οξειδάση της γλυκόζης ακινητοποιήθηκε στη μεμβράνη της σύνθεσης γραφενίου/νανοσωματίδια Au/χιτοζάνη ο βιοαισθητήρας (RGO/CHI/Au/GOD), παρουσίασε για τη γλυκόζη γραμμική περιοχή από 2-10 mM (στους -0.2 V) και 2-14 mM (στα 0.5 V) με όριο ανίχνευσης 180 μ M.

Σε μια μελέτη κατασκευής ενός νέου ενζυματικού βιοαισθητήρα που να καλύπτει τόσο τη γλυκόζη όσο και το H_2O_2 (Karuppiyah et al., 2014), χρησιμοποιήθηκε οξειδάση της γλυκόζης ακινητοποιημένη πάνω σε σύνθετο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου (G) και νανοσωματιδίων οξειδίου του κοβαλτίου (Co_3O_4 -NPs). Το σύνθετο υλικό G/ Co_3O_4 -NPs παρασκευάστηκε με υδροθερμική μέθοδο και χαρακτηρίστηκε με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, περίθλασης ακτίνων X και στοιχειακής ανάλυσης. Το ακινητοποιημένο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο G/ Co_3O_4 -NPs/οξειδάση της γλυκόζης δείχνει μια καλά καθορισμένη οξειδοαναγωγική συμπεριφορά, η οποία υποδεικνύει την αναστρέψιμη αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων και ηλεκτρονίων του ενζύμου. Η γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων του ενζύμου αποδίδεται στην εξαιρετική βιοσυμβατότητα των Co_3O_4 -NPs και στην υψηλή αγωγιμότητα του γραφενίου. Ο βιοαισθητήρας εμφανίζει ευρεία γραμμική απόκριση για τη γλυκόζη από 0,5 mM έως 16,5 mM με την ευαισθησία 13,52 μ A mM⁻¹ cm⁻². Επιπλέον, το σύνθετο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο G/ Co_3O_4 -NPs χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός μη ενζυματικού αισθητήρα H_2O_2 , ο οποίος παρουσίασε εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική δράση ως προς το H_2O_2 με χρόνο απόκρισης <10 s. (Karuppiyah et al., 2014). Η απόκριση H_2O_2 στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο G/ Co_3O_4 -NPs εμφανίζει γραμμική απόκριση που κυμαίνεται από 0,2 έως 211,5 μ M με όριο ανίχνευσης 0,06 μ M.

Τα είδη των ενζύμων που συνήθως χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες H_2O_2 είναι η υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (horseradish, HRP) και η καταλάση. Η απόδοσή τους βελτιώθηκε με σταθεροποίηση των ενζύμων παρουσία γραφενίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κατασκευή ενός πρόσφατα παρασκευασμένου βιοαισθητήρα H_2O_2 με ακινητοποίηση του ενζύμου υπεροξειδάση αγριοραπανίδας με ηλεκτροπολυμερισμό του κυανού της τολουιδίνης σε γραφένιο (Yang, et al., 2017). Ο βιοαισθητήρας βασίζεται στην επιφάνεια ενός υαλώδους ηλεκτροδίου άνθρακα, που ήταν μη ομοιοπολικά τροποποιημένο με γραφένιο, το οποίο ενεργοποιήθηκε από το διαμεσολαβητή ηλεκτρονίων, δηλαδή από το κυανού της τολουιδίνης. Οι νανοσυνθέσεις γραφενίου-κυανού της τολουιδίνης χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά και οι καταλυτικές επιδόσεις του βιοαισθητήρα ερευνήθηκαν χρησιμοποιώντας κυκλική βολταμετρία και χρονοαμπερομετρία. Ο βιοαισθητήρας παρουσίασε εξαιρετική καταλυτική απόδοση για την ανίχνευση H_2O_2 . Το εύρος γραμμικής απόκρισης του βιοαισθητήρα ήταν $5,0 \times 10^{-7}$ έως $1,35 \times 10^{-5}$ mol/L, είχε μεγάλη ευαισθησία 4,32 A.L mol⁻¹, συντελεστή συσχέτισης 0,999 και όριο ανίχνευσης $3,5 \times 10^{-7}$ mol/L.

Η χρήση των **μη ενζυματικών ηλεκτροδίων ως αισθητήρων γλυκόζης και H_2O_2** πιθανώς υπόσχεται μια τέταρτη γενιά βιοαισθητήρων στην αναλυτική χημεία. Οι μη ενζυματικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν το γραφένιο και τα νανοσύνθετά του για τον προσδιορισμό γλυκόζης και H_2O_2 . Οι κατασκευές αυτές συνοδεύονται από αρκετά πλεονεκτήματα όπως, η μη χρήση ακριβών ενζύμων και η αποφυγή απώλειας της

δραστηριότητας του. Δύο πρόσφατες ανασκοπήσεις (*Mohd Yazid et al., 2014; Atta, Galal and Ekram, 2015*) επικεντρώνεται στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων γλυκόζης και H_2O_2 που έχει επέλθει σε προηγούμενα χρόνια, χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα λειτουργικού γραφενίου με διαφορετικά νανοδομησιμα οξειδία μετάλλων όπως Cu, Zn, Ni, Ti, Co, Fe κ.ά. Τα νανοσωματίδια οξειδίων των μετάλλων που προαναφέρθηκαν έχουν μεγάλες αναλογίες επιφάνειας προς όγκο και μπορούν να δράσουν ως ενεργή θέση για την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης και του υψηλού ισοηλεκτρικού σημείου (IEP). Το οξείδιο του ψευδαργύρου και του νικελίου που έχουν υψηλά IEP μπορεί να είναι πιο κατάλληλα υλικά για το ηλεκτρόδιο γραφενίου για βιοαισθητήρες γλυκόζης. Επιπλέον, το υψηλό IEP των δύο αυτών παρέχει μια καλύτερη επιφάνεια για ακινητοποίηση γλυκόζης οξειδάσης η οποία βελτιώνει περαιτέρω την ευαισθησία και εκλεκτικότητα κατά τη διάρκεια παρακολούθησης της γλυκόζης (*Mohd Yazid et al., 2014*). Νανოსυνθέσεις γραφενίου και μεταλλικών οξειδίων έχουν παρασκευαστεί επιτυχώς με βάση το οξείδιο του γραφενίου (GO) ή το ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (RGO).

Πολλές τροποποιημένες επιφάνειες ηλεκτροδίων έχουν χρησιμοποιηθεί ως μη ενζυματικοί βιοαισθητήρες H_2O_2 (*Atta, Galal and Ekram, 2015*). Αναφέρουμε ενδεικτικά ορισμένες: α) νανοσωματίδια Ag / νανόφυλλα γραφενίου, β) γραφένιο/ Nafion/azurc I/σύνθεση νανοσωματιδίων Au σε τροποποιημένο υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα γ) ανηγμένο οξείδιο γραφενίου και νανოსυνθέσεις Fe_3O_4 δ) κατιονικό πολυηλεκτρολυτικά ενεργοποιημένο ιοντικό υγρό διακοσμημένο με νανοςύνθεση φύλλων γραφενίου, CuO και ανηγμένο οξείδιο γραφενίου ε) ανηγμένο οξείδιο γραφενίου-νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων/ $Ni(OH)_2$ σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα κ.λπ.

Οι Yalin κ.ά. κατασκεύασαν ένα νέο μη ενζυμικό ηλεκτροχημικό αισθητήρα χρησιμοποιώντας μια σύνθεση μεμβράνης από νανοσυσσώματα πολυνουκλεοτιδίου-αργύρου (DNA-AgNCs)/γραφενίου για την ανίχνευση H_2O_2 (*Yalin et al., 2013*). Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου υαλώδους άνθρακα GC χρησιμοποιήθηκε επειδή το γραφένιο έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η εξαιρετική αγωγιμότητα, βιοσυμβατότητα και μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκο. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μεμβράνη γραφενίου/DNA-AgNCs έχει αξιοσημείωτη ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα προς την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και εύκολα ακινητοποιείται στην επιφάνεια του γραφενίου/ υαλώδους άνθρακα με π-π συσσώρευση. Ο αισθητήρας επέδειξε γρήγορη απόκριση (περίπου 3s), χαμηλό όριο ανίχνευσης (3 μ M), ευρύ γραμμικό εύρος από 15 μ M έως 23mM, υψηλή εκλεκτικότητα και καλή επαναληψιμότητα. Τα αποτελέσματά του δεν επηρεάζονται από τις γνωστές παρεμποδίσεις ουρικού οξέος, ασκορβικού οξέος, ντοπαμίνης κ.λπ.

Οι Ensafi κ.ά. ανέφεραν έναν αμπερομετρικό αισθητήρα H_2O_2 βασισμένο σε ένα υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα με επικάλυψη Nafion/απολεπισμένο οξείδιο του γραφενίου/οξείδιο του κοβαλτίου (Nafion/EGO/ Co_3O_4). Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο έδειξε σαφώς καθορισμένα και σταθερά ζεύγη οξειδοαναγωγικών σημάτων τόσο σε αλκαλικά όσο και σε φυσικά υδατικά διαλύματα με εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική δράση για την οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (*Ensafi, Jafari and Rezaei, 2013*). Ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου για την επίτευξη του 95% του ρεύματος σταθερής κατάστασης

καταγράφηκε στα 4 s. Το όριο ανίχνευσης ήταν $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ με γραμμικότητα έως και τέσσερις τάξεις μεγέθους και ευαισθησία $560 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{Lcm}^{-2}$. Επιπλέον, το ηλεκτρόδιο Nafion /EGO/Co₃O₄-GCE έδειξε καλή εκλεκτικότητα για την ανίχνευση H₂O₂ παρουσία ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος και γλυκόζης. Η ικανότητα του αισθητήρα για αναλύσεις ρουτίνας αποδείχθηκε με την ανίχνευση H₂O₂ σε δείγματα γάλακτος με αξιόλογες τιμές ανάκτησης. Τα πλεονεκτήματα του βιοαισθητήρα αυτού τον καθιστούν υποψήφιο για τη μηχανική σύνθεση των πιθανών αισθητήρων H₂O₂.

Ένα απλό μη ενζυματικό σύστημα ανίχνευσης για H₂O₂ περιγράφηκε από τους Butwang κ.ά με ηλεκτροαπόθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του καδμίου (CdO) σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένο με νανοσωληνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNT). Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (CdO/MWCNT) παρουσίασε υψηλή συνεργιστική ηλεκτροκαταλυτική δράση για το H₂O₂ (Butwang *et al.*, 2014). Ο αισθητήρας ήταν ικανός να μειώνει το H₂O₂ στα 1,2 V έναντι του ηλεκτροδίου Ag/AgCl (H₂O₂ + 2H⁺ + 2e⁻ → 2H₂O) σε ευρεία κλίμακα pH. Στο βέλτιστο pH 7 ο αισθητήρας επέδειξε όριο ανίχνευσης 0,1 μM, ευρεία γραμμικότητα από 0,5 έως 200 μM, καλή αναπαραγωγικότητα και μακροπρόθεσμη σταθερότητα χωρίς παρεμποδίσεις από ντοπαμίνη, ουρικό και ασκορβικό οξύ, επιβεβαιώνοντας έτσι την εκλεκτικότητα του τροποποιημένου με CdO/MWCNT ηλεκτροδίου για το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επιπλέον, η διαδικασία τροποποίησης είναι απλή και πιο βολική από εκείνη που χρησιμοποιείται για άλλους αισθητήρες H₂O₂.

Παρά την εντυπωσιακή πρόοδο στην τεχνολογία βιοαισθητήρων γλυκόζης και H₂O₂, υπάρχουν ακόμα αρκετές προκλήσεις που σχετίζονται με την επίτευξη σταθερής και αξιόπιστης ανίχνευσης αυτών με βάση τις νανοσυνθέσεις γραφενίου/οξειδίων μετάλλων. Οι προκλήσεις περιλαμβάνουν τον καθορισμό της τοξικότητας και βιοσυμβατότητα των νανοσυνθέσεων γραφενίου/οξειδίων μετάλλων. Πρόσφατες μελέτες (Deng *et al.*, 2018) αποκαλύπτουν ότι τα διμεταλλικά κράματα, όπως Pt-Ni, Pt-Ru, Pt-Au, Ni-Co, Pt-Co και Co-Cu παρουσιάζουν καλύτερη καταλυτική απόδοση από εκείνη των μονο-μετάλλων στην ανίχνευση γλυκόζης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία του Zhao κ.ά. που παρασκεύασαν ένα νέο τύπο ανεξάρτητου και εύκαμπτου ηλεκτροδίου βασισμένου σε χαρτί γραφενίου (GP) που υποστηρίζεται από μονολιθικό νανοπορώδη χρυσό (NPG) για να σχηματίσει ένα ηλεκτροφόρο NPG υποστηριζόμενο από το γραφένιο. Ακολούθως, για τη βελτίωση των επιδόσεων του ηλεκτροδίου NPG/GP, τροποποιήθηκε η επιφάνεια του NPG από ένα πολύ πυκνό στρώμα πολύ λεπτών νανοσωματιδίων PtCo με υψηλό φορτίο και καλή διασπορά, μέσω μιας εύκολης και αποτελεσματικής μεθόδου ηλεκτροαπόθεσης υπερήχων. Τα στοιχεία κατασκευής του βιοαισθητήρα (Zhao *et al.*, 2016) προσφέρουν μια σειρά πλεονεκτημάτων που αντικατοπτρίζουν τον ίδιο το βιοαισθητήρα PtCo /NPG/GP: α) το μακροσκοπικό χαρτί γραφενίου συναρμολογημένο από νανοσφαιρίδια γραφενίου παρουσιάζει καλή χημική και θερμική σταθερότητα, υψηλή ηλεκτρονική αγωγιμότητα, επιθυμητή μηχανική αντοχή και ευκαμψία, η οποία χρησιμεύει ως ένα ιδανικό εύκαμπτο υπόστρωμα ηλεκτροδίων για την υποστήριξη του NPG, β) το μονολιθικό 3D NPG με μεγάλη επιφάνεια διευκολύνει την ακινητοποίηση των νανοσωματιδίων κράματος PtCo σε αυτό, καθώς επίσης και να προάγει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και ιόντων μέσω των ιδιαίτερα αγωγίμων 3D διασυνδεδεμένων οδών τους,

γ) τα νανοσωματίδια κράματος PtCo που είναι διακοσμημένα στο δομικό σκελετό NPG με την μέθοδο ηλεκτροδιάθεσης με υπερήχους είναι πολύ πυκνά, καλά διασκορπισμένα και εξαιρετικά λεπτά, τα οποία διαθέτουν υψηλή ηλεκτροκαταλυτική δράση προς την ηλεκτρο-οξειδωση της γλυκόζης. Η απόκριση του αισθητήρα είναι γραμμική σε συγκεντρώσεις γλυκόζης στην περιοχή από 35 μM έως 30 mM, με όριο ανίχνευσης 5 μM (S/N = 3) και ευαισθησία 7,84 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$.

Ένα υβριδικό ηλεκτρόδιο αποτελούμενο από νανοσωματίδια κράματος NiFe και οξειδίου του γραφένιου (NiFe/GO) παρασκευάστηκε για την ανίχνευση ηλεκτροχημικής γλυκόζης (Deng et al., 2018). Η προσθήκη του στοιχείου Fe σε νανοσωματίδια Ni για να σχηματίσουν νανοσωματίδια κράματος NiFe βελτίωσε την ηλεκτροχημική απόδοση του βιοαισθητήρα γλυκόζης, η οποία έδειξε υψηλότερο ρεύμα από το ηλεκτρόδιο Ni/GO. Επιπροσθέτως το οξείδιο του γραφενίου GO δεν λειτουργεί μόνο ως υποστήριξη για τη φόρτωση του κράματος NiFe από τη συσσωμάτωση, αλλά παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ηλεκτρονική μετάδοση. Το ηλεκτρόδιο NiFe/GO/GCE παρουσίασε τις καλύτερες επιδόσεις όταν η αναλογία Fe προς Ni ήταν 1:1. Η ηλεκτροχημική απόδοση ανίχνευσης της γλυκόζης του υβριδικού NiFe/GO μελετήθηκε με κυκλική βολταμετρία και αμπερομετρική μέτρηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένο με NiFe/GO είχε ευαισθησία 173 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ για ανίχνευση γλυκόζης με γραμμικό εύρος μέχρι 5 mM, το οποίο είναι ανώτερο από εκείνο των κοινώς χρησιμοποιούμενων νανοσωματιδίων Ni. Επιπλέον, το ηλεκτρόδιο εμφανίζει υψηλή επιλεκτικότητα στην ανίχνευση γλυκόζης με δυνατότητα εφαρμογής στον ανθρώπινο ορό. Όλα τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι ο βιοαισθητήρας NiFe/GO/GCE είναι ένας υποσχόμενος υποψήφιος στην προσπάθεια ανάπτυξης φτηνών, σταθερών και ευαίσθητων μη ενζυματικών βιοαισθητήρων γλυκόζης.

3.3.3 Βιοαισθητήρες DNA με βάση το γραφένιο

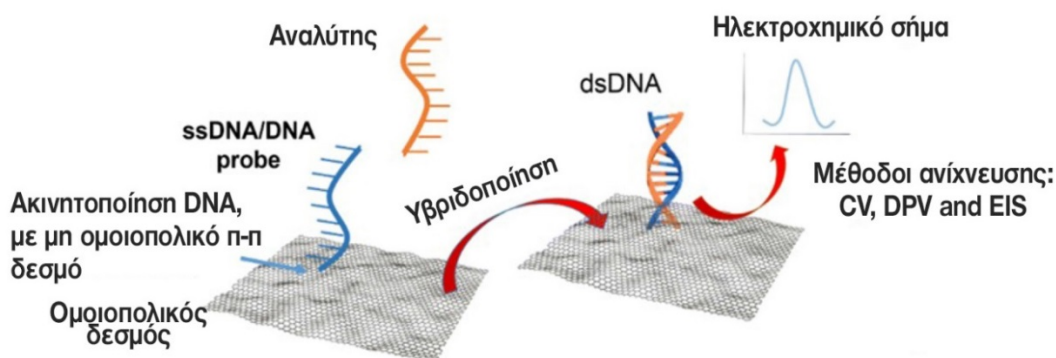
Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) έχει ένα ευρύ φάσμα φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων που το καθιστούν εξαιρετικά κατάλληλο για τεχνολογίες βιοαισθητήρα. Μεταξύ των πιο κρίσιμων ιδιοτήτων του DNA για έναν βιοαισθητήρα είναι η ευκινησία του, η εύκολη σύνθεση, η ευκολία του να προσκολλάται σε διαφορετικές πλατφόρμες, η απλή αναγέννηση και η υψηλή εξειδίκευση λόγω μοναδικών ακολουθιών νουκλεοτιδίων. Τα πλεονεκτήματα των βιοαισθητήρων DNA είναι η υψηλή εξειδίκευση, η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, η σχεδίαση ως ένα μικρό σύστημα μέτρησης και η εκτέλεση πολλαπλών μετρήσεων διαφορετικών στόχων. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα των βιοαισθητήρων DNA είναι ότι εύκολα το DNA μπορεί να αποικοδομηθεί (συνεπώς απαιτώνται ειδικές συνθήκες αποθήκευσης και ανάλυσης) και ότι η αποτελεσματικότητα των βιοαισθητήρων επηρεάζεται από αλλαγές στο pH ή τη θερμοκρασία (Pena-Bahamonde et al., 2018).

Στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, μία μονόκλωνη αλληλουχία DNA ακινητοποιείται σε ένα ηλεκτρόδιο, και γίνεται μέτρηση της μεταβολής της τάσης, του ρεύματος ή της σύνθετης αντίστασης που προκαλούνται από την υβριδοποίηση αυτής με το DNA-στόχο.

Η ακινητοποίηση του DNA γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων π-π στην επιφάνεια των νανοϋλικών με βάση το γραφένιο. Επίσης οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται στις άκρες του γραφενίου, GO ή RGO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αλληλεπιδράσουν ομοιοπολικά με το DNA (Kuila et al., 2011). Τα ηλεκτροχημικά σήματα που παράγονται από το βιοαισθητήρα ανιχνεύονται με χρήση κυκλικής βολταμετρίας, διαφορικής παλμικής βολταμετρίας ή φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής αντίστασης.

Έρευνες για τη βελτίωση της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων εστιάστηκαν κυρίως στην τροποποίηση των μεταλλακτών. Σε μια τέτοια μελέτη (Zhou, Zhai and Dong, 2009) το αρχικό υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιήθηκε με GO για την άμεση ανίχνευση της αδερίνης (A), θυμίνης (T), κυτοσίνης (C) και γουανίνης (G) για dsDNA ή ssDNA χρησιμοποιώντας διαφορική παλμική βολταμετρία σε pH 7,0. Σε μια άλλη μελέτη, το ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιήθηκε με RGO και DNA ανιχνευτές προς υβριδοποίηση του DNA στόχου και διερευνήθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής αντίστασης και κυκλική βολταμετρία. Η μελέτη αυτή εκμεταλλεύεται την μεγάλη επιφάνεια και την υψηλή αγωγιμότητα του RGO (Benedi, 2014).

Ο συνδυασμός γραφενίου και ssDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτροχημικά για την ανίχνευση των τεσσάρων ελεύθερων βάσεων DNA (G, A, T, και C) (Lu et al., 2009a). Επίσης ο Akhavan κ.ά. διερεύνησαν τον αισθητήρα DNA χρησιμοποιώντας τις αιχμηρές και ενεργές άκρες των ανηγμένων νανοστοιχείων γραφενίου για την ανίχνευση του dsDNA με ευαισθησία που κυμαίνεται από 0,1 μM έως 10 mM. Αποδείχθηκε ότι οι θέσεις των ενεργών άκρων των νανοσωλήνων ανηγμένου γραφενίου ενισχύουν την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του DNA και του ηλεκτροδίου, στη διαφορική παλμική βολταμετρία, περισσότερο ομοιόμορφα (Akhavan, Ghaderi and Rahighi, 2012). Ανάλογα με το υλικό ανίχνευσης και το στόχο, οι βιοαισθητήρες μπορεί να έχουν ευρύτερο εύρος ανίχνευσης και ευαισθησίας, όπως π.χ. συμβαίνει στην περίπτωση της ανίχνευσης dsDNA, όπου τα νανόφυλλα γραφενίου αναγνωρίζονται στη βιβλιογραφία ως το καλύτερο υλικό που μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες τόσο χαμηλές όσο 0,1 fM. Για ssDNA, η τροποποίηση ανηγμένων αισθητήρων οξειδίου γραφενίου με επισημασμένα ssDNA και νανοσωματίδια χρυσού (ssDNA-AuNPs-ERGO) αυξάνει την ευαισθησία σε ακόμα κατώτερο όριο ανίχνευσης 0,005 fM (Pena-Bahamonde et al., 2018).



Σχήμα 3.7. Ηλεκτροχημική ανίχνευση βιοαισθητήρα DNA που βασίζεται σε νανοϋλικά με βάση το γραφένιο.

Ο ηλεκτροχημικός προσδιορισμός παρουσιάζεται αποτελεσματικός με χαμηλά όρια ανίχνευσης. Η τεχνική εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα ακινητοποίησης του DNA στα νανοϋλικά που βασίζονται στο γραφένιο και τη μέθοδο μέτρησης. Η μέθοδος λαμβάνει υπόψη την μεγάλη επιφάνεια και την αγωγιμότητα των νανοϋλικών. Η ανίχνευση βασίζεται στους τύπους και τους αριθμούς των βάσεων που υπάρχουν στο DNA, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει αλλαγές στις ηλεκτρικές δυνατότητες για τη μέτρηση. Ως εκ τούτου, η ομοιογενής εναπόθεση του ανιχνευτή στο υλικό του γραφένιου είναι απαραίτητη για ακριβείς μετρήσεις. Επίσης, το ηλεκτροστατικό δυναμικό και το μήκος του DNA θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απόδοση του αισθητήρα. Γενικά οι DNA βιοαισθητήρες (ηλεκτροχημικοί και φθορισμομετρικοί) που κατασκευάζονται με υλικό το γραφένιο και ιδιαίτερα το οξειδίο του γραφένιου, επιδεικνύουν εξαιρετική απόδοση με πολλά πλεονεκτήματα όπως υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα, ευρύ φάσμα ανίχνευσης, γρήγορη απόκριση και χαμηλό κόστος. Κάθε τύπος αισθητήρα ανίχνευσης DNA επιδεικνύει εξαιρετική συμπεριφορά για να αναγνωρίσει ποικιλίες τύπων κλώνου DNA με σχετική απαίτηση χαμηλής συγκέντρωσης. Αλλά ο ακριβής μηχανισμός του κάθε τύπου αισθητήρα DNA είναι φτωχά κατανοητός και η κρίσιμη πειραματική απόδειξη είναι ελλιπής (*Pena-Bahamonde et al., 2018*). Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων DNA υβριδισμού υπόσχεται πολλά αναφορικά με την απόκτηση πληροφοριών που αφορούν στη διευκρίνιση της αλληλουχίας του DNA και η οποία θα ήταν χρήσιμη σε κλινικές, περιβαλλοντικές καθώς και εγκληματολογικές έρευνες.

3.3.4 Βιοαισθητήρες ντοπαμίνης με βάση το γραφένιο

Η ντοπαμίνη (DA) είναι ένας σημαντικός νευροδιαβιβαστής στη λειτουργία του ανθρώπινου μεταβολισμού. Δυστυχώς συνυπάρχει στους οργανισμούς με ασκορβικό οξύ (AA) και ουρικό οξύ (UA), που έχουν παρόμοιο δυναμικό οξειδωσης (ιδιαίτερως το ασκορβικό οξύ) στην ηλεκτροχημική ανίχνευση. Η ανάπτυξη ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της ντοπαμίνης, χωρίς την παρέμβαση του ασκορβικού οξέος προσέλκυσε το ενδιαφέρον των ερευνητών. Οι Ramesh, Suresh and Sampath κατασκεύασαν ηλεκτρόδια από απολεπισμένο γραφίτη και προχώρησαν σε επιλεκτικό προσδιορισμό ντοπαμίνης, καθώς η σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο και οι περιοχές άκρων του γραφίτη προσφέρουν μια υψηλά ενεργή επιφάνεια για αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, με συνεπακόλουθο την οξείδωση των DA και AA. (*Ramesh, Suresh and Sampath, 2004*) Ακολούθησαν και άλλα υλικά άνθρακα για την επεξεργασία της επιφάνειας των ηλεκτροδίων εργασίας όπως νανοσωλήνες, ναναΐες άνθρακα και κυρίως γραφένιο.

Μια ηλεκτροχημική μέθοδος για την επιλεκτική ανίχνευση DA που βασίζεται σε πολυστρωματικές μεμβράνες νανοιφάδων γραφένιου σε υπόστρωμα Si, με χημική εναπόθεση ατμών, αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική στην κατασκευή βιοαισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ντοπαμίνης (DA), του ασκορβικού οξέος (AA) και του ουρικού οξέος (UA) (*Shang et al., 2008*). Αυτή η ηλεκτροχημική πλατφόρμα βελτίωσε την απόδοση των βιοαισθητήρων DA, παρουσία των κοινών παρεμβαλλόμενων παραγόντων

AA και UA, και σε σχέση με άλλα γυμνά ηλεκτρόδια στερεάς κατάστασης είναι ανώτερη και συγκρίσιμη μόνο με εκείνη του πυρολυτικού γραφίτη με επίπεδο άκρο.

Τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου κατασκευάστηκε από το Wang κ.ά για την ανίχνευση ντοπαμίνης παρουσία του ασκορβικού οξέος. Το γραφένιο συντέθηκε χημικά με τη μέθοδο Hummers και Offeman και εφαρμόστηκε στον επιλεκτικό προσδιορισμό της DA με γραμμική περιοχή από 5 μM έως 200 μM σε μεγάλη περίσσεια AA. Η επιλεκτική ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με πλήρη εξάλειψη του AA, διαφορετική από τις μεθόδους που βασίζονται στους πιθανούς διαχωρισμούς (Wang et al., 2009). Η συσσώρευση (stacking) π-π της αλληλεπίδρασης μεταξύ της DA και της επιφάνειας του γραφενίου επιτάχυνε τη μεταφορά ηλεκτρονίων, ενώ αποδυνάμωσε την οξειδωση του AA στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο. Το ηλεκτρόδιο εμφάνισε επίσης καλύτερη απόδοση από το αντίστοιχο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων.

Σε άλλη μελέτη (Kim et al., 2010) χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος Hummer για τη σύνθεση του γραφενίου και οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένο με γραφένιο με τη μέθοδο έγχυσης σταγόνων. Το κυκλικό βολταμόγραμμα του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρι/σιδηροκυανιδίου σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου, έδειξε αυξημένη ένταση ρεύματος σε σύγκριση τόσο με το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, όσο και με τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφίτη. Ο πλήρης διαχωρισμός των κορυφών μεταξύ DA και AA που ελήφθη από τις καμπύλες κυκλικής βολταμετρίας και διαφορικής παλμικής βολταμετρίας κατέδειξε ότι το γραφένιο επηρέασε τη μεταφορά ηλεκτρονίων των DA και AA. Η εκλεκτική ικανότητα ανίχνευσης της DA του τροποποιημένου ηλεκτροδίου γραφενίου επιβεβαιώθηκε σε επαρκή ποσότητα ασκορβικού οξέος (1 mM), με το γραμμικό εύρος προσδιορισμού της συγκέντρωσης της DA να κυμαίνεται από 4 μM έως 100 μM και το όριο ανίχνευσης εκτιμήθηκε ότι ήταν 2,64 μM (Kim et al., 2010).

Διάφορα ηλεκτροχημικά και χημικά ηλεκτρόδια γραφίτη και υαλώδη άνθρακα (GCE) τροποποιημένα με γραφένιο (G), GO ή RGO ακινητοποιημένα ή μη έχουν κατασκευαστεί με επικαλυμμένη την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας από μεμβράνες ιονοανταλλαγής nafion ή chitosan, για την επίλυση των βολταμετρικών κορυφών DA, AA και UA (Mallesha et al., 2011; Szoke et al., 2016; Wang et al., 2016; Kim, Lee and Piao, 2017; Cogal, 2018). Γενικά τα προετοιμασμένα ηλεκτρόδια π.χ. GCE/GO/Nafion, G/ακεταμινοφαίνη/GCE/Nafion, πολυβινυλοπυρρολιδόνη/G/GCE, φυτικό οξύ/GO/GCE, πολύ(3,4αιθυλενοδιοξυθειοφαίνιο)/RGO/GCE κ.ά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή βιοαισθητήρων ντοπαμίνης και εξετάζονται με βολταμετρικές τεχνικές, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία, εκλεκτικότητα, υψηλή αναπαραγωγικότητα, σταθερότητα, ευρεία γραμμική περιοχή και χαμηλό όριο ανίχνευσης.

Κατασκευές πολλών ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό ντοπαμίνης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία που βασίζονται σε τυπωμένα τροποποιημένα ηλεκτρόδια (screen printed electrodes, SPEs) άνθρακα με εκτύπωση γραφενίου. Σε μια πρόσφατη μελέτη ανίχνευσης της DA (Avan and Filik, 2018) χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο άνθρακα που είχε τυπωθεί με εκτύπωση γραφενίου και σε συνδυασμό με τη μέθοδο μαγνητικής εκχύλισης σε στερεή φάση, πέτυχε απόκριση του βιοαισθητήρα γραμμικά

ανάλογη της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης στην περιοχή από 0,01-6,0 μΜ με συντελεστή συσχέτισης περίπου 0,9992. Το όριο ανίχνευσης του αισθητήρα βρέθηκε να είναι 5,0 nM με βολταμετρία τετραγωνικού κύματος. Η συνδυασμένη μεθοδολογία εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό της ντοπαμίνης σε δείγματα ούρων με καλές ανακτήσεις που κυμαίνονται από 95 έως 98%. Οι βιοαισθητήρες αυτοί έχουν οδηγήσει σε νέες δυνατότητες ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βιομορίων, παρασιτοκτόνων, αντιγόνων, DNA, μικροοργανισμών και ενζύμων.

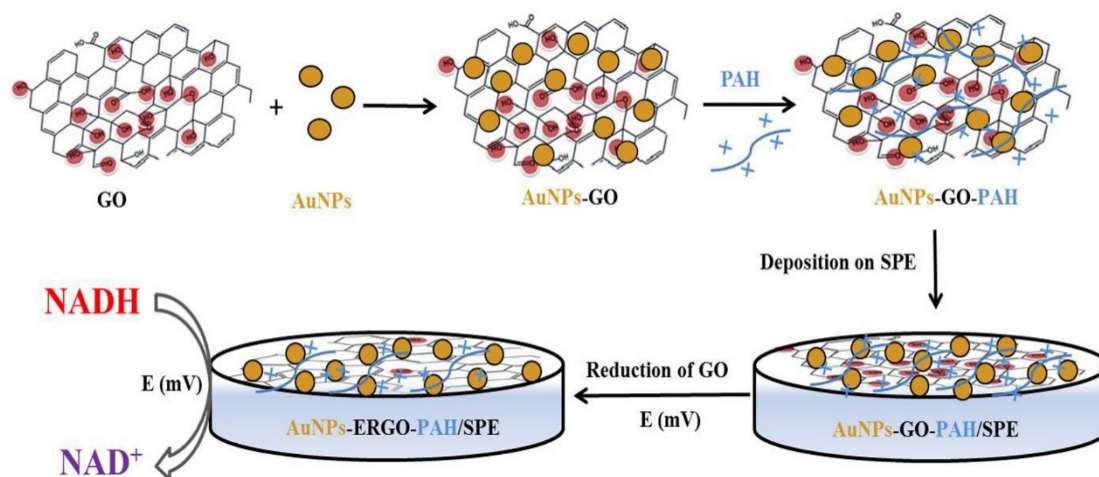
3.3.5 Βιοαισθητήρες NADH βασισμένοι σε γραφένιο

Το β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και η ανηγμένη μορφή του (NADH) είναι ένας συμπαράγοντας πολλών αφυδρογονών και ως εκ τούτου έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων που σχετίζονται με εξαρτώμενες από NAD^+/NADH αφυδρογονάσες. Η οξείδωση του NADH λειτουργεί ως το ανοδικό σήμα και αναπαράγει το συμπαράγοντα NAD^+ ο οποίος έχει μεγάλη σημασία στην βιοανίχνευση για σημαντικά υποστρώματα. Προβλήματα εγγενή σε μια τέτοια ανοδική ανίχνευση είναι το υψηλό δυναμικό για οξείδωση του NADH και επιφανειακή ρύπανση που σχετίζεται με τη συσσώρευση προϊόντων αντίδρασης (*Shao et al., 2010*). Το γραφένιο φαίνεται να μπορεί να αντιμετωπίσει αυτά τα προβλήματα. Ο Tang κ.ά. μελέτησαν την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του NADH σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου (ανηγμένο οξείδιο γραφενίου σε λεπτά φύλλα μεμβρανών γραφενίου, RGOSF), το οποίο δείχνει μια αξιοσημείωτη αύξηση της ταχύτητας μεταφοράς ηλεκτρονίων σε σύγκριση με ηλεκτρόδια γραφίτη/υαλώδη άνθρακα (GC) και GC. Η οξείδωση του NADH (δυναμικά κορυφής) μετατοπίζεται από 0,75 V σε γυμνό ηλεκτρόδιο GC και γραφίτη έναντι Ag/AgCl , το οποίο μειώθηκε σε 0,42 V σε RGOSF/GC (*Tang et al., 2009*). Αυτά αποδίδονται στην υψηλή πυκνότητα των θέσεων των ελαττωμάτων στην άκρη του επιπέδου του RGOSF, οι οποίες παρέχουν πολλές ενεργές θέσεις για μεταφορά ηλεκτρονίων σε βιολογικά είδη.

Ο Liu κ. ά. παρουσίασαν μια βελτιωμένη απόδοση του ηλεκτροδίου για την οξείδωση του NADH , που βασίζεται στο γραφένιο, μέσω της αυξημένης διασποράς του γραφενίου και της λειτουργοποίησής του με υδατοδιαλυτό ηλεκτροενεργό πράσινο του μεθυλενίου (methylene green, MG) (*Liu et al., 2009*). Η οξείδωση του NADH για το ηλεκτρόδιο ανηγμένου γραφενίου /πράσινο του μεθυλενίου λαμβάνει χώρα στα 0,14 V περίπου, το οποίο είναι πολύ χαμηλότερο από τα +0,40 V που βρέθηκε για αρχικό γραφένιο (δηλαδή χωρίς το πράσινο του μεθυλενίου). Η ενισχυμένη δραστηριότητα των τροποποιημένων ηλεκτροδίων γραφενίου για οξείδωση του NADH επιβεβαιώθηκε επίσης μετά από σύγκριση με το πυρολυτικό επίπεδο του γυμνού άκρου ηλεκτροδίου γραφίτη (edge plane pyrolytic graphite electrode, EPPGE), που έχει πολλές ελαττωματικές θέσεις. Είναι γνωστό ότι η υψηλή πυκνότητα σε ελαττωματικές θέσεις στο επίπεδο άκρο του γραφενίου μπορεί να προσφέρει πολλές ενεργές θέσεις για τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε βιολογικά είδη, οι οποίες ενισχύουν τη δραστηριότητα των υλικών άνθρακα για την οξειδοαναγωγή των μικρών βιομορίων όπως το NADH (*Shao et al., 2010*).

Πρόσφατα κατασκευάστηκε ένας νέος τύπος αισθητήρα NADH που βασίζεται σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο (screen-printed electrode, SPE) που έχει τροποποιηθεί με ένα σύνθετο υλικό βασισμένο στο ηλεκτροχημικά ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (ERGO) και την πολυ(υδροχλωρική αλλουλαμίνη) (PAH) (Istrate, Rotariu and Bala, 2016). Το σύνθετο υλικό παρασκευάστηκε σε δύο στάδια: πρώτα ένα μείγμα οξειδίου του γραφενίου και πολυ(υδροχλωρική αλλουλαμίνη) εναποτέθηκε στην επιφάνεια του εκτυπωμένου σε οθόνη ηλεκτροδίου άνθρακα και μετά ακολούθησε η ηλεκτροχημική αναγωγή του GO σε ERGO με την κορυφή οξειδωσης του NADH να καταγράφεται στα +450 mV. Υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ο αισθητήρας ERGO-PAH/SPE παρουσίασε υψηλή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα προς την οξείδωση του NADH, η οποία εκφράζεται με σταθερά υψηλής ταχύτητας και σταθερή απόκριση για συγκεντρώσεις έως 0,8 mM. Η ευαισθησία είναι $108,6 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$, ο χρόνος απόκρισης 20 s για το 95% του ρεύματος σταθερής κατάστασης και το όριο ανίχνευσης είναι 6,6 μM . Μια κορυφή διαχωρισμού ελήφθη στα 300 mV περίπου σε προσδιορισμό του NADH παρουσία ασκορβικού οξέος με διαφορική παλμική βολταμετρία. Αυτό καθιστά τον νέο αισθητήρα κατάλληλο για επιλεκτική ανίχνευση του NADH, όπου δεν απαιτούνται αντιδραστήρια, ενώ η εύκολη προετοιμασία των τροποποιημένων ηλεκτροδίων παραμένει ένα κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας.

Μια προσθήκη νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) στο ίδιο σύνθετο υλικό ERGO-PAH/SPE της προηγούμενης έρευνας δημιούργησε μια νέα βελτιωμένη πλατφόρμα για αισθητήρες NADH (Istrate et al., 2016). Η σύνθεση AuNPs-ERGO-PAH προωθεί τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του NADH και της τροποποιημένης επιφάνειας ηλεκτροδίου, που εκτυπώνεται σε οθόνη με τάση +510 mV, με υψηλή ευαισθησία $131,0 \pm 1,2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ και με όριο ανίχνευσης 3,5 μM σε αμπερομετρικές μετρήσεις.



Σχήμα 3.8. Στάδια παρασκευής βιοαισθητήρα NADH από εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα (SPE) με την προσθήκη νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) σε μείγμα οξειδίου του γραφενίου (GO) και πολυ(υδροχλωρική αλλουλαμίνη, PAH).

Η προσθήκη της πολυ(υδροχλωρικής αλλουλαμίνης) στο σύνθετο υλικό από νανοσωματίδια χρυσού-ηλεκτροχημικά ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (AuNPs-ERGO) σταθεροποιεί τα AuNPs στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μετά την ηλεκτροχημική

αναγωγή του GO, όπως αποδείχθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους (SEM και Raman) και ενισχύει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του NADH και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Η βολταμετρία διαφορικού παλμού επέτρεψε την επιλεκτική ανίχνευση NADH παρουσία ασκορβικού οξέος, ντοπαμίνης, γλυκόζης και ουρικού οξέος.

3.3.6 Βιοαισθητήρες χοληστερόλης που βασίζονται σε νανόφυλλα γραφενίου

Η χοληστερόλη είναι ένα στεροειδές που υπάρχει παντού ως συστατικό της μεμβράνης του πλάσματος όλων των ζώων και των κυττάρων. Ενεργεί ως πρόδρομος για τα χολικά οξέα, τη βιταμίνη D και τα γλυκοκορτικοειδή όπως οιστρογόνα, προγεστερόνη κ.λπ. Το ανθρώπινο αίμα περιέχει 70% χοληστερόλη σε εστερική μορφή και 30% ως ελεύθερη μορφή, που μαζί δίνουν την ολική χοληστερόλη η οποία προκαλεί σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο, οπότε η ακριβής μέτρησή της είναι απαραίτητη για ιατρική γνωμάτευση.

Ένας νέος ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας χοληστερόλης που βασίζεται σε ηλεκτρόδιο γραφενίου έχει παρασκευαστεί μέσω της ακινητοποίησης της σταθεροποιημένης πολυμερούς λιπιδικής μεμβράνης επί του ηλεκτροδίου γραφενίου (Nikoleli et al., 2013). Η σταθεροποιημένη πολυμερής λιπιδική μεμβράνη αποτελείται από ένζυμο οξειδάσης της χοληστερόλης και μείγμα πολυμερισμού, η οποία ασκεί πρωταρχική επίδραση στις ιδιότητες του βιοαισθητήρα χοληστερόλης. Ουσιαστικά παρέχει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον ώστε τα βιομόρια χοληστερόλης να έχουν εύκολη πρόσβαση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ενώ παράλληλα βελτιώνει την ικανότητα του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα. Ο παρουσιαζόμενος βιοαισθητήρας αποκαλύπτει μια αξιοσημείωτη αναπαραγωγικότητα, καλή εκλεκτικότητα, ταχεία απόκριση (περίπου 5 s) και υψηλή ευαισθησία 64 mV/ δεκάδα συγκεντρώσεων για μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων χοληστερόλης από 1×10^{-6} M έως 1×10^{-3} M. Η ισχυρή βιοσυμβατότητα μεταξύ σταθεροποιημένων πολυμερικών λιπιδικών μεμβρανών και ανθρώπινων βιορευστών παρέχει τη δυνατότητα χρήσης για δείγματα πραγματικού αίματος και άλλες βιολογικές εφαρμογές.

Οι Gholivad και Khodadadian κατασκεύασαν ένα πολύ ευαίσθητο βιοαισθητήρα προσδιορισμού της χοληστερόλης με συν-ακινητοποίηση της οξειδάσης της χοληστερόλης (ChOx) και της καταλάσης (CAT) στην επιφάνεια ενός τροποποιημένου με γραφένιο/ιοντικό υγρό (GR-IL/GCE) υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα (Gholivad and Khodadadian, 2014). Το H_2O_2 που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της ενζυματικής αντίδρασης της ChOx με τη χοληστερόλη μειώνεται ηλεκτροκαταλυτικά από την ακινητοποιημένη CAT και λαμβάνεται μια ευαίσθητη αμπερομετρική απόκριση για τη χοληστερόλη. Η απ' ευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ενζύμων και της επιφάνειας των ηλεκτροδίων διερευνήθηκε με κυκλική βολταμετρία. Και τα δύο ένζυμα έδειξαν καλά καθορισμένες κορυφές οξειδοαναγωγής με αναστρέψιμες συμπεριφορές. Ο βιοενζυματικός βιοαισθητήρας (CAT/ChOx/GR-IL/GCE) χοληστερόλης έδειξε εξαιρετική ευαισθησία $4,163 \text{ mA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, χρόνο απόκρισης μικρότερο από 6 s, γραμμικό εύρος 0,25-215 μM και καλή αναπαραγωγικότητα (RSDs <5%) με ελάχιστη παρεμπόδιση από

συνυπάρχουσες ηλεκτροενεργές ενώσεις, όπως ασκορβικό και ουρικό οξύ. Το ιοντικό υγρό είναι τετηγμένο άλας με σημείο τήξης πλησίον ή κάτω από τη θερμοκρασία δωματίου. Βάσει των καλών ιδιοτήτων που έχουν τα ILs χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με φύλλα γραφενίου ως τροποποιητές ηλεκτροδίων διότι μπορεί να αυξήσουν την ευαισθησία του βιοαισθητήρα και να διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων διαφόρων βιομορίων οξειδοαναγωγής.

Ο Wu κ. ά. για την κατασκευή ενός πολύ ευαίσθητου και επιλεκτικού αμπερομετρικού βιοαισθητήρα χοληστερόλης, χρησιμοποίησαν νανοσωλήνες αργύρου (AgNWs) και οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) τα οποία τροποποιούνται πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο οξειδίου του κασσιτέρου-ινδίου (ITO) με οξείδιο του γραφενίου (GO) και χιτοζάνη (CS). Η σύνθεση AgNW-ZnO ενίσχυσε επιτυχώς την ηλεκτρονική μετάδοση και με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, κυκλική βολταμετρία και μετρήσεις αντίστασης διερευνήθηκαν οι ηλεκτροχημικές επιδόσεις του ηλεκτροδίου $\text{ChOx/ZnO/Ag/GO-CS/ITO}$ (Wu *et al.*, 2016). Η γραμμική απόκριση για τη χοληστερόλη στην περιοχή του κατασκευασμένου βιοαισθητήρα είναι $0,25\text{-}400 \text{ mg dL}^{-1}$ ($6,5 \text{ }\mu\text{M}$ έως 10 mM) με ευαισθησία $9,2 \text{ }\mu\text{A }\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Επιπλέον, το όριο ανίχνευσης είναι $0,287 \text{ }\mu\text{M}$ ($S/N = 3$) και η σταθερά Michaelis-Menten υπολογίζεται ότι είναι περίπου $0,295 \text{ }\mu\text{M}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH } 7$).

3.3.7 Βιοαισθητήρες κυτοχρώματος C που βασίζονται σε γραφένιο

Το κυτόχρωμα c (cyt c) είναι μια μικρή υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη οξειδοαναγωγής αιμάτη που χαρακτηρίζεται από σχετικά εύκαμπτη δομή, ιδιαίτερα στη μορφή τρισθενούς σιδήρου και βρίσκεται μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών μεμβρανών των μιτοχονδρίων σε διάφορα ζώα. Ανάλογα με τις συγκεκριμένες συνθήκες, τις αλληλεπιδράσεις και τον κυτταρικό εντοπισμό, μπορούν να σταθεροποιηθούν διάφορες διαμορφώσεις, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή, τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες, τις συγγένειες δέσμησης και την ενζυματική δραστηριότητα.

Ένας νέος βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε με την παγίδευση του κυτοχρώματος c σε λεπτές μεμβράνες ιοντικού υγρού (RTIL) σε θερμοκρασία δωματίου, που περιέχει μια σύνθεση νανοσωματιδίων από πολυ(διαλλυλο-διμεθυλ-χλωριούχου-αμμωνίου) - νανοφύλλων γραφενίου - νανοσωματιδίων χρυσού (PDDA-Gp-AuNPs) πάνω σε τροποποιημένο με μερκαπτοδεκανοϊκό οξύ-6-μερκαπτο-1-εξανόλη, ηλεκτρόδιο χρυσού (Song *et al.*, 2013). Η νανοςύνθεση PDDA-Gp-AuNPs μπορεί να αυξήσει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, να ενισχύσει την σταθερή ποσότητα του κυτοχρώματος (Cyt c) σε αυτό, να προωθήσει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και να διευκολύνει την καταλυτική του δραστηριότητα. Οι λεπτές μεμβράνες ιοντικού υγρού βοηθούν στη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας του Cyt c, ενεργώντας αποτελεσματικά στην ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού Cyt c στο ηλεκτρόδιο, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως μεσολαβητής και να έχει καλή αγωγιμότητα για να βελτιώσει τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Συνεπώς, το ηλεκτρόδιο που προέκυψε παρουσίασε καλή ηλεκτροχημική απόδοση και ηλεκτροκαταλυτική δράση.

Ο Guo κ.ά. κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα που βασίζεται στο συνδυασμό κυτοχρώματος c, ηλεκτροχημικώς ανηγμένου οξειδίου γραφενίου (ERGO) και νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) πάνω σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) (Guo et al., 2018). Στο προτεινόμενο ηλεκτρόδιο βιοαισθητήρα (GCE/ERGO-Nafion/AuNPs/Cyt c/Nafion), πρώτα εναποτέθηκε υπό μορφή στάγδην το ανάμεικτο GO-Nafion, όπου μετά από ηλεκτροχημική αναγωγή μετατρέπεται σε ERGO-Nafion και ακολούθησε ηλεκτροχημική εναπόθεση των νανοσωματιδίων χρυσού στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου ERGO-Nafion και εναπόθεση των άλλων συστατικών (Cyt c/Nafion) με τη μέθοδο πτώσης-ξήρανσης. Για την αξιολόγηση της απόδοσης του προτεινόμενου βιοαισθητήρα ελήφθη H_2O_2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο βιοαισθητήρας έχει μεγάλη αναλυτική απόδοση, συμπεριλαμβανομένης υψηλής ευαισθησίας, ευρείας γραμμικής κλίμακας, χαμηλό όριο ανίχνευσης, καλή σταθερότητα, αναπαραγωγικότητα και αξιοπιστία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4⁰

4 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

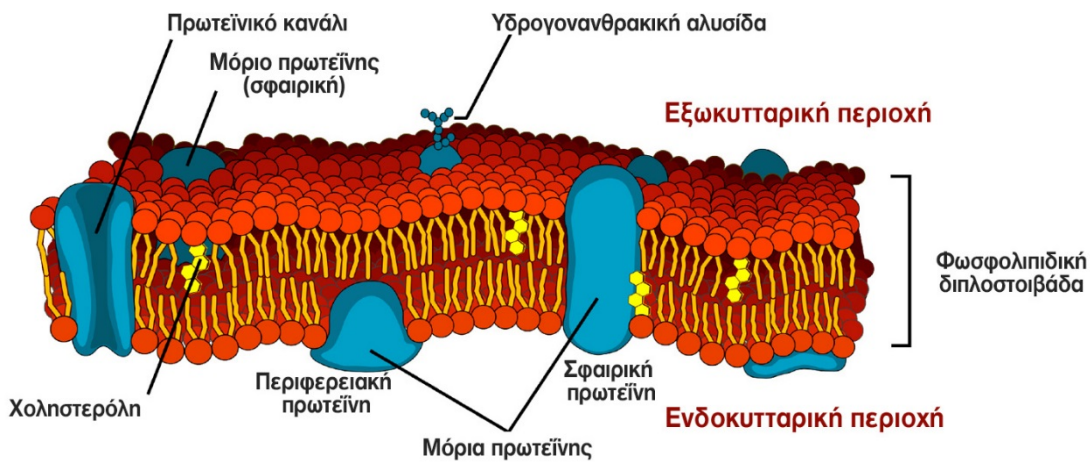
4.1 Εισαγωγή

Τα φυσικά συστήματα μοριακής αναγνώρισης και μεταγωγής τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία ζώντων οργανισμών, έχουν προταθεί για άμεση χρήση στην παρασκευή βιοαισθητήρων. Η βιολογική αναγνώριση των μορίων πραγματοποιείται μέσω μη ομοιοπολικών αναστρέψιμων αλληλεπιδράσεων μεταξύ συμπληρωματικών δομών, που τελικά οδηγούν στην προσάρτηση του μορίου σε μια θέση του υποδοχέα που σχετίζεται με το μακρομόριο (*Nikolelis et al., 1995*). Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών που συμβαίνουν στα φυσικά συστήματα, δηλαδή η μορφολογία των κυτταρικών (βιολογικών) μεμβρανών και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, μας οδηγούν να αντιληφθούμε πληρέστερα τη λειτουργία των τεχνικών βιοαισθητήρων (παρ. 4.2).

Η **κυτταρική μεμβράνη** αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και σε μικρότερο ποσοστό από υδατάνθρακες. Με τη χρήση τεχνικών μεθόδων ανάλυσης (περίθλαση ακτίνων Χ, ηλεκτρονική μικροσκοπία) διαπιστώθηκε ότι όλες οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν τη ίδια βασική δομή, δηλαδή δύο αντικριστές μονοστοιβάδες που περιέχουν αμφίφιλα μόρια (*Fisher and Branton, 1974*), τα οποία αποτελούνται από μία πολική περιοχή (κεφαλή) και δύο μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες. Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες προσανατολίζονται η μία απέναντι στην άλλη σχηματίζοντας το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης, που λειτουργεί ως φραγμός στη διέλευση υδρόφιλων μορίων και ιόντων, ενώ οι πολικές κεφαλές κατευθύνονται προς το υδατικό περιβάλλον σχηματίζοντας τις δύο υδρόφιλες επιφάνειες (*Lodish et al., 2005*). Η διάταξη αυτή είναι γνωστή ως **διστρωματική λιπιδική μεμβράνη** (*bilayer lipid membrane, BLM*) και έχει πάχος που κυμαίνεται από 50 έως 100 Å (*Thompson and Krull, 1984*). Η δομή αυτή καθιστά δυνατή τη μεταφορά ουσιών με απλή ή παθητική διάχυση, η οποία συνίσταται στη διάχυση των ουσιών μέσω της μεμβράνης, χωρίς να αναλωθεί η μεταβολική ενέργεια και χωρίς τη βοήθεια μεταφορικών πρωτεϊνών (*Yeagle, 2012*). Αν η μεταφερόμενη ουσία έχει καθαρό ηλεκτρικό φορτίο, θα κινηθεί όχι μόνο ως απάντηση σε βαθμίδα συγκέντρωσης, αλλά και σε ηλεκτροχημική κλίση λόγω του δυναμικού της μεμβράνης. Εάν η ανταλλαγή ουσιών συμβαίνει προς την κατεύθυνση της κλίσης, δηλαδή, προς την κατεύθυνση της μείωσης του δυναμικού, δεν υπάρχει απαίτηση για ενέργεια εισόδου εκτός του συστήματος. Αν όμως η μεταφορά είναι ενάντια στην κλίση θα απαιτήσει την εισροή μεταβολικής ενέργειας (*Lodish et al., 2005*).

Τα μόρια των λιπιδίων και οι πρωτεΐνες της λιπιδικής μεμβράνης συγκρατούνται μαζί με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως οι δυνάμεις Van der Waals που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της διστρωματικής λιπιδικής δομής. Οι πρωτεΐνες είναι ενσωματωμένες

στη λιπιδική μεμβράνη σε μια αναλογία μάζας (λιπιδικών μορίων/ ενσωματωμένες σε αυτά πρωτεΐνες) που κυμαίνεται από 1:4 έως 4:1 (Alberts et al., 2008). Οι δύο τύποι πρωτεϊνών (ενσωματωμένες και περιφερειακές) διατρέχουν τη λιπιδική μεμβράνη ή συνδέονται ηλεκτροστατικά με την επιφάνεια της μεμβράνης έχοντας παράλληλα τη δυνατότητα περιστροφή ή διάχυσης στο επίπεδο. Τα λιπίδια κινούνται πιο ελεύθερα με δυνατότητα μεταφοράς τους από τη μια μονοστοιβάδα της μεμβράνης στην άλλη ή από τη μια μεμβράνη στην άλλη (Yeagle, 2012). Τα φωσφολιπίδια με ορισμένες ομάδες κεφαλής μπορούν να μεταβάλλουν την χημεία της επιφάνειας μιας διπλοστοιβάδας και μπορούν π.χ. να χρησιμεύσουν ως σήματα καθώς και ως "άγκυρες" για άλλα μόρια στις μεμβράνες των κυττάρων (Nullin and Robin, 1995). Οι βιολογικές μεμβράνες περιλαμβάνουν εκτός των φωσφολιπιδίων και άλλους τύπους μορίων όπως η χοληστερόλη, η οποία συμβάλλει στην ενίσχυση της διπλοστοιβάδας και στη μείωση της διαπερατότητάς της (σχ. 4. 1).



Σχήμα 4.1. Φωσφολιπίδιο κυτταρικής διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης με ενσωματωμένα μόρια πρωτεΐνης που επιτρέπουν την εκλεκτική διέλευση ιόντων και μορίων μέσω της μεμβράνης.

Οι πρωτεΐνες της λιπιδικής μεμβράνης εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες (Andersen et al., 2007), π.χ. ορισμένα είδη εμπλέκονται στη διαδικασία σύντηξης, η οποία επιτρέπει την ένωση δύο διαφορετικών δομών, δηλαδή δύο μαζί διπλοστοιβάδες. Οι διαταραχές ή παραμορφώσεις των διπλοστοιβάδων που προκαλούνται από τη σύζευξη μεταξύ των υδρόφοβων πεδίων της πρωτεΐνης και του υδρόφοβου πυρήνα της διπλοστοιβάδας, επιφέρουν μεταβολή των ιδιοτήτων του υλικού της διπλοστοιβάδας (πάχος στοιβάδας, εσωτερική καμπυλότητα λιπιδίων, ελαστική συμπίεση και κάμψη).

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα λειτουργεί ως το φράγμα που διατηρεί ιόντα, πρωτεΐνες και άλλα μόρια, όπου αυτά χρειάζονται, ενώ εμποδίζει να διαχέονται σε άλλες απαγορευμένες περιοχές. Οι κινήσεις των περισσότερων διαλυτών μέσω της μεμβράνης προκαλούνται από πρωτεΐνες μεταφοράς οι οποίες εξειδικεύονται σε ποικίλους βαθμούς στη μεταφορά συγκεκριμένων μορίων (Lodish et al., 2005). Η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι ιδανικά κατάλληλη για το ρόλο αυτό και παρ' ότι έχει πλάτος μερικά μόνο nm είναι αδιαπέραστη στα πιο υδρόφιλα μόρια. Χρησιμοποιώντας όμως τις πρωτεΐνες, που

ονομάζονται αντλίες ιόντων, τα ιόντα μεταφέρονται στις μεμβράνες επιτρέποντας έτσι τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των αλάτων και το pH (Andersen et al., 2007). Σύμφωνα με τις σύγχρονες θεωρίες η δέσμευση ενός μορίου-διεγέρτη από ένα πρωτεϊνικό μόριο, συνοδεύεται από μεταβολές στη δομή και διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα κατά μήκος της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης δημιουργούνται ιοντικά αγωγίμοι διάυλοι, δια μέσου των οποίων διέρχεται ένας μεγάλος αριθμός ιόντων από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη, υπό την επίδραση χημικού ή ηλεκτροχημικού δυναμικού. Το σύστημα των διαύλων ιόντων συνδέεται επιλεκτικά και αναστρέψιμα με το χημικό σηματοδότη για την ενίσχυση και μεταγωγή της χημικής πληροφορίας σε έναν ηλεκτρικό παλμό με τελικό αποτέλεσμα την εναλλαγή της αγωγιμότητας του διαύλου και κατ' επέκταση της αγωγιμότητας της ίδιας της μεμβράνης (Νικολέλη, 2015). Η δίοδος ροής των ιόντων είναι ο φορέας του χημικού σήματος που περιέχει τη χημική πληροφορία την οποία διοχετεύει στο νευρικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, εξωκυτταρικά γεγονότα μετατρέπονται σε ενδοκυτταρικά σήματα και πληροφορίες, τα οποία στη συνέχεια διοχετεύονται στο νευρικό σύστημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα αισθητήρια συστήματα ζώων οργανισμών, τα οποία λειτουργούν για την ανίχνευση και την απόκριση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως π.χ. η όσφρηση και η γεύση των θηλαστικών και το οσφρητικό σύστημα των εντόμων. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιχειρήσει να χρησιμοποιήσουν αυτήν την ιδιότητα ανίχνευσης των υποδοχέων μεμβράνης για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων (Misawa, Osaki and Takeuchi, 2018).

Είναι γνωστό ότι οι αλλαγές στη σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών μπορούν να τροποποιήσουν σημαντικά τη δράση των πρωτεϊνών μεμβράνης (Bloom et al., 1991). Τα ένζυμα, οι αντλίες ιόντων και μορίων και οι πρωτεΐνες διαύλου ιόντων είναι συχνά ευαίσθητες σε μεταβολές των ομάδων στις λιπιδικές κεφαλές και στο μήκος της αλυσίδας ή στις συγκεντρώσεις χοληστερόλης και σε μικρές διαλυμένες ουσίες.

Από τα παραπάνω προκύπτει, ότι οι κυτταρικές λιπιδικές μεμβράνες παίζουν σημαντικό ρόλο στις περισσότερες φυσιολογικές διεργασίες (προστασία και ενδοεπικοινωνία κυττάρων, έλεγχος μικρο-περιβάλλοντος, μεταβολισμός). Ωστόσο, παρά τη συνεχή για τέσσερις δεκαετίες μελέτη των μεμβρανών, η δομική τους οργάνωση σε μεγάλο βαθμό και η αλληλεξάρτηση μεταξύ όλων των συστατικών σε μοριακό επίπεδο παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής (Siontorou et al., 2017). Για παράδειγμα οι δύο πλευρές (leaflets) του πλάσματος της μεμβράνης έχουν διαφορετική σύνθεση των φωσφολιπιδίων. Η ασυμμετρία αυτή, ενώ εξυπηρετεί ορισμένες λειτουργίες της μεμβράνης, δεν είναι σαφές πώς προκύπτει αυτή η ασυμμετρία. Πειραματικά δεδομένα μειγμάτων φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνης-σφιγγομυελίνης-χοληστερόλης) που βασίζονται σε ακτίνες Χ, μικροσκοπικές και φασματοσκοπικές παρατηρήσεις, επιφανειακές πιέσεις και θερμιδομετρικές μετρήσεις, αξιολογήθηκαν για το ρόλο των λιπιδίων και τη δημιουργία μικροπεριοχών (microdomains) στην πλευρική δομή των βιολογικών μεμβρανών και καταρρίφθηκε η από 25 ετών άποψη, ότι τα λιπίδια είναι τυχαίως οργανωμένα δομικά στοιχεία βιολογικών μεμβρανών (Goñi et al., 2008). Πρόσφατες ενδείξεις από σπειροειδής υποστηριζόμενες λιπιδικές στοιβάδες υποδηλώνουν έντονα ότι η δυναμική

οργάνωση της λιπιδικής μεμβράνης είναι όντως συνάρτηση των λιπιδικών μικροπεριοχών (Siontorou et al., 2017).

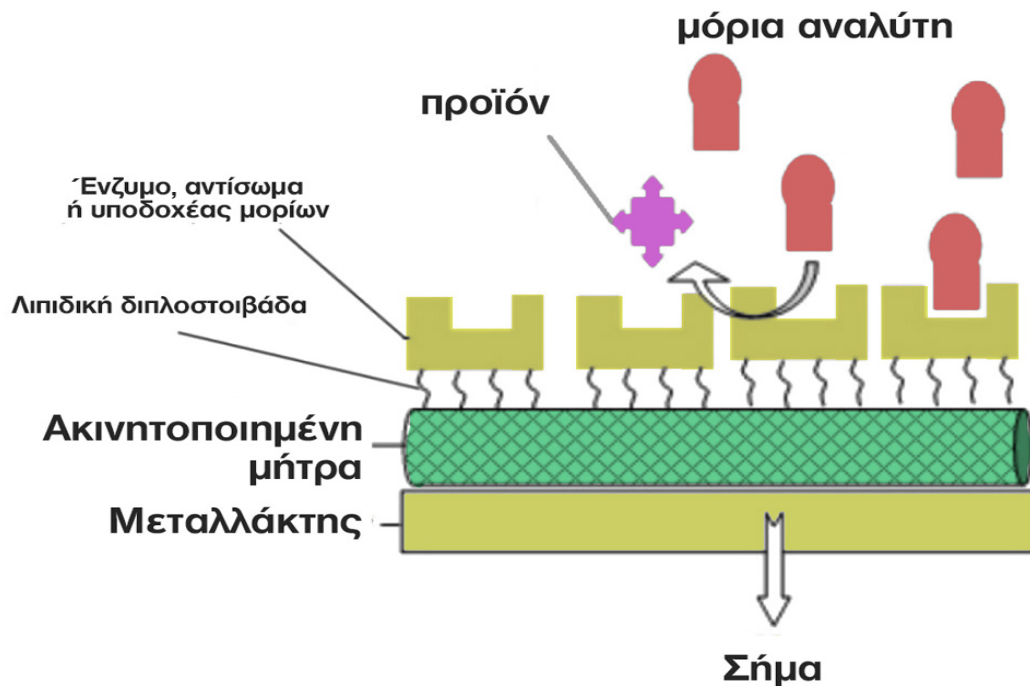
Η τάση που επικρατεί μεταξύ των ερευνητών για τη λιπιδική μεμβράνη, είναι ότι η μετατροπή της χημικής πληροφορίας που προκύπτει από μία εκλεκτική αντίδραση δέσμευσης, σε νευρική ώση, πρέπει να επηρεάζεται από μεταβολές στη δομή της μεμβράνης και από τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων στη μεσεπιφάνεια μεμβράνης/διαλύματος (Nikolelis et al., 2008). Στην πραγματικότητα, οι μεμβράνες έχουν αποδειχθεί πιο πολύπλοκες με λειτουργίες αυστηρά ρυθμιζόμενες, που εξαρτώνται από τις μεταβολές ενός μετασταθούς σκελετού και από το υψηλό δυναμικό της διπλοστοιβάδας λιπιδίων (Siontorou et al., 2017).

4.2 Ανάπτυξη βιοαισθητήρων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών

Το πεδίο ανάπτυξης των βιοαισθητήρων αυξήθηκε πάρα πολύ μετά την πρώτη επίδειξη της έννοιας του βιοαισθητήρα από τον Leland Clark Jr. το 1962. Οι βιοαισθητήρες εκμεταλλεύονται την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο συστατικών προκειμένου να παράσχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ένωση στόχο. Τα τμήματα πάνω στα οποία στηρίζονται οι αρχές ανάπτυξης των βιοαισθητήρων είναι το βιολογικό τμήμα (αισθητήριο τμήμα) και ένας φυσικοχημικός μεταλλάκτης (Nikoleli et al., 2018a). Το στοιχείο αναγνώρισης είναι ένας "υποδοχέας" (ένζυμο, αντίσωμα, φυσικός υποδοχέας, κύτταρο, κ.λπ.) που διατηρείται σε άμεση επαφή με το τμήμα μετατροπής (transduction). Ο αναλυτής στόχος αλληλεπιδρά με το στοιχείο αναγνώρισης με τρόπο παρόμοιο με τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στα φυσικά συστήματα και οι προκύπτουσες βιοχημικές πληροφορίες μετασχηματίζονται σε ηλεκτρική, οπτική, πιεζοηλεκτρική, κ.λπ. έξοδο από το μεταλλάκτη (Siontorou and Batzias, 2010; Nikoleli et al., 2018a). Η χρήση των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών ως μεταλλάκτες εκλεκτικών βιοχημικών αλληλεπιδράσεων, μέσω της κατασκευής συστημάτων βιοαισθητήρων, στηρίζεται στην εκλεκτική αντίδραση μεταξύ ενός αναλύτη και του ενσωματωμένου στην μεμβράνη υποδοχέα σχηματίζοντας σύμπλοκο. Στην περιοχή γύρω από το σύμπλοκο, το ηλεκτροστατικό πεδίο της μεμβράνης μεταβάλλεται και οι μεταβολές αυτές, παρακολουθούνται ηλεκτροχημικά ως μεταβολές του διαμεμβρανικού ιοντικού ρεύματος ή με οπτικές μεθόδους (Siontorou et al., 2000).

Το αισθητήριο τμήμα πρέπει να είναι βιοσυμβατό με δομή παρόμοια με αυτήν των βιομεμβρανών. Επάνω σε αυτό ακινητοποιούνται εκλεκτικά στοιχεία δέσμευσης με σημαντική διατήρηση της δεσμευτικής τους ικανότητας. Έτσι η τροποποιημένη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη καθίσταται εκλεκτική με το συμπληρωματικό σωματίδιο του στοιχείου δέσμευσης, το οποίο της παρέχει τη ζητούμενη εκλεκτικότητα. Η λιπιδική μεμβράνη προσφέρει ένα φυσικό περιβάλλον για την ακινητοποίηση και τον έλεγχο του υποδοχέα. Ταυτόχρονα, η φυσική της μεμβράνης αφ' εαυτής προσφέρει ένα μέσο για τη μεταγωγή και ενίσχυση του σήματος. Η βιοχημική αλληλεπίδραση επηρεάζει σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίου-πρωτεΐνης και λιπιδίου-λιπιδίου, διακόπτοντας έτσι τη συνέχεια της συναρμολόγησης που οδηγεί σε ανιχνεύσιμες

μεταβολές της διαπερατότητας των διαμεμβρανικών ιόντων (Nikoleli et al., 2018b; Siontorou et al., 2017). Δηλαδή, η αλληλεπίδραση μεταξύ βιολογικού στοιχείου και αναλύτη, μεταβάλλει το βιοχημικό σύστημα στην περιοχή της μεμβράνης, αναγκάζοντας έτσι να γίνουν μεταβολές του διπολικού δυναμικού και / ή της πυκνότητας του επιφανειακού φορτίου και / ή του διαμεμβρανικού δυναμικού και / ή της μοριακής συσσώρευσης και ρευστότητας, τα οποία οδηγούν σε σημαντική αύξηση του ρεύματος ιόντων μεταξύ των δύο πλευρών της διπλοστοιβάδας.



Σχήμα 4.2. Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα που βασίζεται σε λιπιδική μεμβράνη.

Καθώς η βιοφυσική της τεχνητής διπλής στιβάδας υποστηρίζει την ηλεκτροχημική ανίχνευση, ο σχηματισμός του συμπλόκου αναλύτη-βιοστοιχείου μεταβάλλει τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης, τα οποία εύκολα καταγράφονται ηλεκτροχημικά. Η ηλεκτροχημική λειτουργία της μεμβράνης βασίζεται στη διακύμανση του ανόργανου ρεύματος ιόντων διαμέσου της δομής της, ως συνάρτηση διαταραχής της μεμβράνης, που προκαλείται από τη συμπλοκοποίηση των υποδοχέων. Για αυτή τη διαδικασία, μία δεξαμενή ιόντων με τα κατάλληλα ηλεκτρόδια δείκτη πρέπει να υπάρχει σε κάθε όψη της μεμβράνης (Arya, Krull and Thomson, 1985). Η φυσική ή ηλεκτροστατική δομή της μεμβράνης ενδέχεται να μεταβληθεί από το σχηματισμό του συμπλόκου υποδοχέα-υποκαταστάτη ή από το προϊόν μιας χημικής αντίδρασης και να προκληθεί το άνοιγμα ιοντικών διαύλων, μέσω των οποίων ένας μεγάλος αριθμός ιόντων μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη ακολουθώντας μια βαθμίδα ηλεκτροχημικού δυναμικού (Arya, Krull and Thomson, 1985). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των συστημάτων τεχνητής διπλοστοιβάδας, εκτός από την υποστήριξη του βιοστοιχείου, είναι η δυνατότητα της λιπιδικής μεμβράνης να παρέχει ενδογενή ενίσχυση σήματος (Nikolelis, et al., 1995; Hirano-Iwata, Niwano and Sugawara, 2008).

Ο μηχανισμός παραγωγής του σήματος που χρησιμοποιεί βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται σε λιπιδική μεμβράνη, εξαρτάται από τον τύπο κατασκευής της λιπιδικής μεμβράνης και κατά πόσο η μεμβράνη είναι ελεύθερα αιωρούμενη, υποστηριζόμενη από φίλτρο ή μέταλλο ή υποστηριζόμενη από ένα πολυμερές (Nikoleli et al., 2018b). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικές αναφορές με την παραγωγή του σήματος σε πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες που διερευνήθηκαν με φασματοφωτομετρία Raman, IR και πειράματα DSC (Nikolelis et al., 2006; Nikolelis et al., 2008) καθώς και σε υποστηριζόμενες λιπιδικές μεμβράνες σε μεταλλική επιφάνεια (Hianik et al., 1995). Για τις ελεύθερα αιωρούμενες ή υποστηριζόμενες με φίλτρο διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες η δημιουργία του σήματος αναφέρεται εκτενώς στη βιβλιογραφία (Nikolelis et al., 1995; Andreou and Nikolelis, 1998). Ο μηχανισμός βασίζεται στην αντίδραση δέσμευσης του υποκατάστατη από τον ακινητοποιημένο υποδοχέα, που βρίσκεται στην επιφάνεια της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης ή την ίδια τη μεμβράνη. Η αντίδραση συμπλοκοποίησης είναι εξαιρετικά εκλεκτική και συνίσταται σε μια διαδικασία αναγνώρισης του τύπου κλειδιού-κλειδαριάς. Η εισαγωγή μιας υδρόφιλης/πολικής δραστικής ομάδας στην ακυλική (υδρόφοβη) περιοχή της διπλοστοιβάδας, μεταβάλλει τη δομή της λιπιδικής μεμβράνης και μπορεί να δημιουργήσει ένα αναλυτικό σήμα ή να συντελέσει στην ενίσχυση του, καθώς αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα. Επίσης, αυξημένη ιοντική διαπερατότητα παρατηρείται και σε μεμβράνες που έχουν μεγάλο αριθμό δομικών ατελειών και δρουν ως πόροι για την παθητική μεταφορά ιόντων. Σημαντική ανακάλυψη των προσπαθειών της ομάδας Nikolelis κ.ά αποτελεί η διάκριση δομικά όμοιων ενώσεων με βιοσυσσωρευτές διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης (Nikolelis and Siontorou, 1996; Siontorou, Nikolelis and Krull, 2000).

Οι βιοαισθητήρες με βάση τα νανοϋλικά αντιπροσωπεύουν την ενσωμάτωση της επιστήμης των υλικών, της μοριακής μηχανικής, της χημείας και της βιοτεχνολογίας. Τα νανοϋλικά μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ευαισθησία και την εξειδίκευση της ανίχνευσης των βιομορίων και έχουν μεγάλες δυνατότητες κατασκευής συσκευών για τη μοριακή αναγνώριση, την παρακολούθηση των τροφίμων και του περιβάλλοντος, την κλινική ανάλυση και τη διάγνωση των παθογόνων παραγόντων (Nikoleli et al., 2018c). Πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις περιλαμβάνουν την κατασκευή σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης που υποστηρίζεται σε νανοηλεκτρόδια γραφενίου με ενσωματωμένο «υποδοχέα» (ένζυμο, αντίσωμα ή φυσικό ή τεχνητό υποδοχέα) σταθερό για αποθήκευση στον αέρα, που μπορεί να είναι φορητός για εφαρμογές πεδίου. Τα νανοϋλικά του γραφενίου λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, δηλαδή της καλής ικανότητας ανίχνευσης και των εξαιρετικών μηχανικών, θερμικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, έχουν λάβει τεράστια προσοχή στον τομέα της βασικής έρευνας και των τεχνολογικών εφαρμογών (Nikoleli et al., 2018c). Μεγάλη ανάπτυξη παρουσιάζουν επίσης και οι βιοαισθητήρες που κατασκευάζονται από νανοϋλικά ZnO. Πρόσφατα παραδείγματα ανάπτυξης νανοβιοαισθητήρων περιγράφονται στη βιβλιογραφία με την ενσωμάτωση ενζύμων και αντισωμάτων. Ένα αξιόπιστο σύστημα περιλαμβάνει σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες τυλιγμένες γύρω από ένα σύρμα χαλκού που περιέχει νανόφυλλα γραφενίου (Nikoleli et al., 2012; Bratakou et al., 2015) ή μικροηλεκτρόδια ZnO (Psychogiorgos et al., 2013). Αυτοί οι νανοαισθητήρες εμφανίζουν όρια

ανίχνευσης στην περιοχή νανομορίων και έχουν εφαρμοστεί στην ταχεία διαδικασία ανίχνευση περιβαλλοντικών ρύπων και τοξινών σε πραγματικά δείγματα, όπως εντομοκτόνα (*Bratakou et al., 2015*), ναφθαλινοξικό οξύ (*Bratakou et al., 2016*), τοξίνη χολέρας (*Karapetis et al., 2016*) και σαξιτοξίνη (*Bratakou et al., 2017*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μια ποικιλία πλατφορμών ανίχνευσης με βάση τη λιπιδική μεμβράνη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μετά από αποθήκευση στον αέρα ακόμη και για περίοδο δύο μηνών.

Οι αισθητήρες αυτοί μπορούν να κατασκευαστούν με δυνατότητα αναπαραγωγής, με απλότητα και χαμηλό κόστος για γρήγορους χρόνους απόκρισης, λειτουργική σταθερότητα και πραγματικές αναλύσεις δειγμάτων χωρίς ιδιαίτερη φροντίδα. Η πιο σημαντική πτυχή των σημερινών προσπαθειών είναι η παροχή μιας εμπορικής φορητής συσκευής που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για *in situ* αναλυτικές εφαρμογές. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στον τομέα της τεχνολογίας λιπιδικών μεμβρανών θα επιτρέψει τη μικρογραφία και θα οδηγήσει στη μαζική παραγωγή των αισθητήρων. Η παραγωγή των μικρότερων πρότυπων θα επιτρέψει στους αισθητήρες να ανταποκρίνονται ταχύτερα, με υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας και με χαμηλότερο κόστος παραγωγής. Η ανάπτυξη αισθητήρων με τη χρήση των σημερινών τεχνολογιών θα προσφέρει, βελτιωμένη ευαισθησία για ανίχνευση με μεγάλη εξειδίκευση σε μοριακό επίπεδο, με αύξηση της τάξης μεγέθους σε σχέση με τις διαθέσιμες σήμερα τεχνικές με μεγάλο αριθμό εφαρμογών στην περιβαλλοντική παρακολούθηση.

Ωστόσο, ένα ορισμένο μειονέκτημα βιοαισθητήρων λιπιδικής μεμβράνης είναι η έλλειψη κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων και προσομοιώσεων. Η μοντελοποίηση της πολύπλοκης και συνεχώς μεταβαλλόμενης φύσης της διπλοστοιβάδας, συμπεριλαμβανομένων των πολύπλοκων μοριακών αλληλεπιδράσεων και φαινομένων μεταφοράς ιόντων, αποτελούν σοβαρή ερευνητική πρόκληση (*Siontorou, and Batzias, 2010*). Η χρήση προσομοιώσεων υπολογιστών μπορεί να γίνει απαραίτητη στο εγγύς μέλλον (*Siontorou et al., 2017*) για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης των αισθητήρων και τη μείωση των χρόνων απόκρισης, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται συστήματα δι- και τρι-ενζυματικών ή πολλαπλών συστοιχιών. Οι τρέχουσες τάσεις στη μηχανική νανοϋλικών αναμένεται να υποστηρίξουν την ανάπτυξη πιο ανθεκτικών συσκευών για περισσότερους αναλυτές ή ακόμα και για πολλαπλούς ανιχνευτές.

4.3 Συνθετικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες

Όταν πραγματοποιούνται ανοσολογικές αντιδράσεις, έχει αποδειχθεί, ότι η εγκάρσια ηλεκτρική αντίσταση των διαχωρισμένων λιπιδικών μεμβρανών δύο υδατικών φάσεων μειώνεται σημαντικά. Όταν η προσθήκη αντισωμάτων και αντιγονικών πρωτεϊνών γίνεται ξεχωριστά, δεν καταγράφεται αξιοσημείωτο αποτέλεσμα σε αντίθεση με τη διαδοχική έγχυση των ανοσολογικών συμπληρωματικών πρωτεϊνών, που ακολουθείται από ξαφνική μείωση της σύνθετης αντίστασης της λιπιδικής φάσης. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται, όταν η προσθήκη ενός ενεργοποιημένου ενζύμου ακολουθείται από την έγχυση του αντίστοιχου υποστρώματος στην ίδια υδατική φάση (*Toro-Goyco, Rodriguez and de*

Castillo, 1966). Τα αποτελέσματα αυτά των ανοσολογικών αντιδράσεων που σχετίζονται με φυσικές κυτταρικές μεμβράνες, έδωσαν κίνητρο τους ερευνητές για μελέτη τεχνητών λιπιδικών μεμβρανών είτε υπό μορφή κυψελών, είτε ως μεμβράνες που υποστηρίζονται επί στερεών υποστρωμάτων για την ανάπτυξη ανοσοενισχυτών. Παράλληλα αναπτύχθηκαν ανοσοανιχνευτές (Nikolelis et al., 1995) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση ροής με σταθεροποιημένες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες και δυνατότητα αναγέννησης του δραστικού αντιδραστήριου μετά τη χρήση. Το λιπιδικό μόριο αποτελείται από την πολική ομάδα επικεφαλής και μία υδρόφοβη ουρά με περιορισμένο αριθμό δραστικών ομάδων, που διευκολύνουν την ιοντική ροή και σταθερότητα της μεμβράνης (Brennan, et al. 1993a). Οι συνθετικές διστρωματικές μεμβράνες αποδείχθηκε ότι είναι άριστες μήτρες ξενιστών για τη διατήρηση της δραστικότητας πολλών βιοχημικά εκλεκτικών ειδών, όπως ένζυμα, αντισώματα και μοριακοί υποδοχείς (Nikolelis and Mitrokotsa 2002).

Η λειτουργία μιας συνθετικής διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης εξαρτάται από τον τρόπο παρασκευής (βλ. παραγ. 4.3.1) και διατήρησής της σε θερμοδυναμικές συνθήκες. Μια λιπιδική μεμβράνη ορίζεται από τη σύνθεσή της, τη μοριακή δυναμική και τη συμπεριφορά φάσης (Siontorou et al., 2017). Κάθε μεμβράνη οργανώνεται σε δύο στοιβάδες από αμφιπαθητικά μόρια λιπιδίων με πιο συνηθισμένα τα γλυκεροφωσfolιπίδια, σφιγγολιπίδια και στερόλες, αν και έχει προταθεί επίσης μια ποικιλία υλικών που μοιάζουν με λιπίδια όπως π.χ. προϊόντα οξειδωσης των στερολών, πολυαμίδια, υδρόφιλα πολυμερή κ.ά. τα οποία επηρεάζουν ή τροποποιούν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης όπως είναι το πάχος, τη ρευστότητα, τη διηλεκτρική σταθερά και διάφορες αλληλεπιδράσεις των πολικών κεφαλών. Η χοληστερόλη (στερόλη) για παράδειγμα, προκαλεί συρρίκνωση της διπλοστοιβάδας αυξάνοντας τη μηχανική της σταθερότητα, ενώ μειώνει τη ρευστότητα στο εσωτερικό της υποβοηθώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκυλικών αλυσίδων. Ο σχηματισμός των μεμβρανών υποστηρίζεται από την αλληλεπίδραση δύο δυνάμεων: τη υδροδυναμική δύναμη που προσπαθεί να συμπιέσει τα δύο φύλλα στον οριζόντιο άξονα και το διαλύτη που βρίσκεται αποθηκευμένος στην άκρη του ανοίγματος στον κάθετο άξονα (Siontorou et al., 2017). Ωστόσο η ακαμψία που αποκτά η μεμβράνη επηρεάζει αρνητικά το μέγεθος της ιοντικής της διαπερατότητας, σε αντίθεση με άλλες ενώσεις όπως π.χ. το 10-υδροξυστεατικό οξύ που αυξάνει την ιοντική διαπερατότητα λόγω της εισαγωγής πολικών περιοχών στο υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης (Nikolelis and Krull, 1992b).

Τα συστήματα μεμβρανών που αναπτύχθηκαν συνήθως χρησιμοποιούν μια προσέγγιση με φυσικά και συνθετικά μόρια λιπιδίων από τη βάση προς την κορυφή (Osaki and Takeuchi, 2017). Τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών π.χ. φωσfolιπίδια και γλυκερόλες (Πίνακας 4.1) ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες οργανώνονται αυθόρμητα σε διπλοστοιβάδες (Brennan, et al. 1993a). Τα δυναμικά των λιπιδίων προσδιορίζονται από τους πλευρικούς και περιστροφικούς συντελεστές διάχυσης, που καθορίζουν τη θέση και τον προσανατολισμό μετατόπισης των λιπιδίων σε οποιοδήποτε φύλλο (leaflet). Η μετατόπιση λιπιδίων από το ένα φύλλο στο άλλο μπορεί να είναι μια διαμεσολαβούμενη πρωτεΐνη ανεξάρτητη ενεργειακά ή και εξαρτώμενη ενεργειακά, η οποία λαμβάνει χώρα ταχέως για χρονική

περίοδο pico έως milli δευτερολέπτων. Επίσης είναι δυνατό να προκληθούν αλλαγές στη δομή της διπλοστοιβάδας από τη μετακίνηση των λιπιδίων (*Siontorou et al., 2017*).

Πίνακας 4.1. Λιπιδικά μείγματα για την παρασκευή διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών (*Brennan, et al. 1993a*).

Λιπίδιο	Συνέκδοχα λιπιδίων	Στερόλη	Διαλύτης
Χαρακτηρισμένα φωσφολιπίδια	-	-	κ-δεκάνιο
	-	-	κ-εξάνιο
	Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού	Χοληστερόλη	κ-δεκάνιο
	Μονοπαλμιτικός εστέρας γλυκερόλης	-	κ-δεκάνιο
	Διελαιϊκός εστέρας γλυκερόλης	-	κ-εξάνιο
	Σφιγγομυελίνη	-	
	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	Χοληστερόλη	α-τοκοφερόλη/ χλωροφόρμιο/ μεθανόλη, κ-εξάνιο/αιθανόλη
Μεικτά λιπίδια	Εκχύλισμα λευκής ουσίας εγκεφάλου ποντικών με χλωροφόρμιο/μεθανόλη	Χοληστερόλη	α-τοκοφερόλη/ χλωροφόρμιο/ μεθανόλη
	Λιπίδια ερυθροκυττάρων προβάτου υψηλής περιεκτικότητας σε ιόντα Καλίου	Χοληστερόλη	κ-δεκάνιο
	Φωσφολιπίδια σόγιας (ασολεκτίνη)	Χοληστερόλη	κ-δεκάνιο

Μία αντιπροσωπευτική μορφή μεμβράνης είναι ένα επίπεδο σύστημα με τις μεμβράνες να διακρίνονται σε αιωρούμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες, υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες και νανοδίσκους (*Osaki and Takeuchi, 2017*). Οι ελεύθερα αιωρούμενες διπλοστοιβάδες αποδείχτηκαν επιτυχείς εξομοιωτές της φυσικής μεμβράνης, αλλά η ευθραυστότητά τους δεν επέτρεψε οποιαδήποτε περαιτέρω προσπάθεια στα ανθεκτικά μηχανικά συστήματα ανίχνευσης. Η ευθραυστότητα που παρουσιάζουν, προκύπτει από τη «ρευστότητα» της μεμβράνης, μια δυναμική ιδιότητα που αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της λειτουργικότητάς της (*Siontorou, and Batzias, 2010*).

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση των διαύλων μηχανικής ευαισθησίας. Η αποσαφήνιση των ρεολογικών ιδιοτήτων των λιπιδικών μεμβρανών που επιχειρήθηκε από το Βανί κ.ά., έδειξε ότι σε αντίθεση με την ομοιόμορφη τάση (tension) της διπλοστοιβάδας που εκτιμάται από το νόμο του Laplace, η τάση των δύο στοιβάδων δεν είναι ομοιόμορφη σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης (*Bavi et al.,*

2014). Οι δύο καταστάσεις αστάθειας, ρήξη και κάμψη, που παρατηρήθηκαν σε μοντέλα μεμβρανών, αποδίδονται αντίστοιχα σε τοπικές διαταραχές της οργάνωσης των λιπιδίων και σε αύξηση της κάμψης της μεμβράνης ή των πτυχών που δημιουργούνται λόγω ασυμμετρίας των φύλλων ή ακόμη και τροποποίηση της τάσης. Οι μετακινήσεις πρωτεϊνών στηρίζονται στην ικανότητα της μεμβράνης να γίνεται ασταθής. Αυτό σημαίνει ότι η ελεύθερη ενέργεια της μεμβράνης αυξάνεται σε σχέση με ορισμένες θερμοδυναμικές παραμέτρους, διατηρώντας ταυτόχρονα άλλες παραμέτρους σταθερές, ώστε ο συνολικός ρυθμός μεταβολής να παραμένει χαμηλός (Siontorou et al., 2017). Η αστάθεια της μεμβράνης, όπως και να εμφανιστεί, είτε ως ρήξη είτε ως κάμψη είναι πολύ δύσκολο να οριστεί με θερμοδυναμικούς όρους, εκτός εάν οι αλλαγές είναι δραματικές και δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ μιας ασταθούς μη λειτουργικής μεμβράνης και μιας σταθερής λειτουργικής μεμβράνης που αλλάζει απλά κατάσταση

4.3.1 Τεχνικές σχηματισμού συνθετικών διστρωματικών μεμβρανών

Η παρασκευή μιας συνθετικής διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης γίνεται με διάλυση του λιπιδικού μείγματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης σε ένα οργανικό διαλύτη, που έχει την τάση να σχηματίζει ανάστροφα μικύλλια. Τα φωσφολιπιδικά μόρια μέσα σε υδατικό διάλυμα αυτο-οργανώνονται στη μορφή διστρωματικής μεμβράνης, λόγω της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης που επικρατεί στις ουρές των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, με τις πολικές κεφαλές να κατευθύνονται εκατέρωθεν της μεμβράνης στο υδρόφιλο τμήμα και τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες προς το εσωτερικό υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης. Το μοριακό βάρος των φωσφολιπιδίων είναι περίπου 1 kDa και σχηματίζουν διπλοστοιβάδα πάχους 5 nm. Μία τέτοια μεμβράνη είναι ικανή να καταστέλλει τη διείσδυση υδατοδιαλυτών μορίων και παρουσιάζει αντίσταση μεμβράνης άνω του $1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ και διαπερατότητα στα ιόντα Na^+ της τάξεως των 10-12 cm/s (Osaki and Takeuchi, 2017). Η υψηλή αντίσταση της μεμβράνης επιτρέπει την ανίχνευση μιας μικρής αύξησης της αγωγιμότητας που προκαλείται από το άνοιγμα ενός μονού διαύλου ιόντων στην πρωτεΐνη της μεμβράνης. Η διάταξη αυτή εξασφαλίζει ηλεκτροστατική σταθερότητα των μεμβρανών και παρέχει διαλυμένα μονοσθενή ανόργανα ιόντα (K^+ , Li^+ , Na^+ , Cl^-) σε συγκεντρώσεις 10^{-3} έως 1 M, τα οποία είναι απαραίτητα για τις ηλεκτροχημικές μελέτες. Αντίθετα, τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} συμπλέκονται με τις πολικές κεφαλές ή δημιουργούν συσσωματώματα στην επιφάνεια της μεμβράνης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σταθερότητα και αγωγιμότητα της μεμβράνης (Νικολέλη, 2015). Γενικώς η αγωγιμότητα των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών καθορίζεται από το μέγεθος του ενεργειακού φράγματος που υπάρχει - προκειμένου τα ιόντα να μπορούν να διέλθουν από το εσωτερικό της μεμβράνης - και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους σύσταση (Krull, 1987). Με την εισαγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπως τα αισθητήρια στοιχεία, οι διπλοστοιβάδες σχηματίζουν ευέλικτα συστήματα χημικής ανίχνευσης που είναι συμβατά με τα ηλεκτρονικά.

Οι συμβατικές τεχνικές σχηματισμού διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών που έχουν περιγραφεί (Hirano-Iwata, Niwano, and Sugawara, 2008; Zagnoni, 2012; Osaki and

Takeuchi, 2017) και σχετίζονται με την ανάπτυξη μικροσυσκευών-βιοαισθητήρων είναι: α) η τεχνική της ψύκτρας β) η τεχνική χωρίς διαλύτη και γ) η τεχνική βύθισης της άκρης.

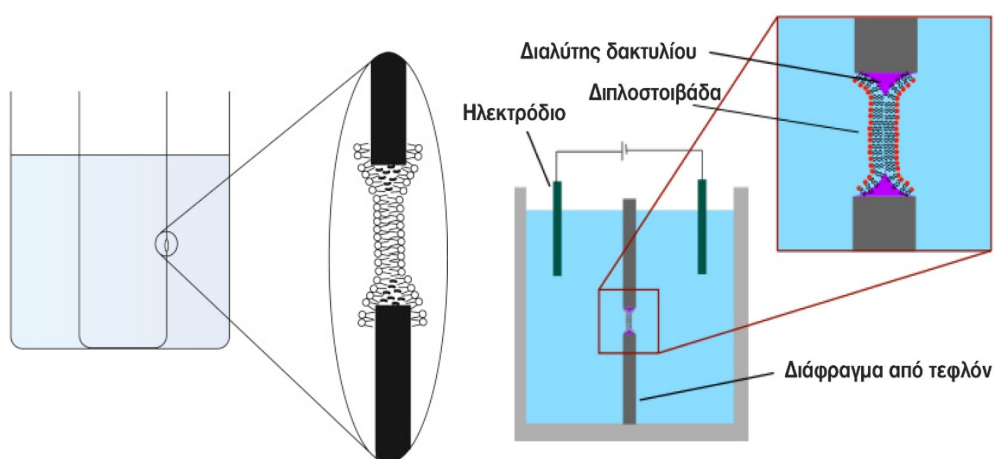
Η **τεχνική της ψύκτρας** χρησιμοποιεί απλά μια ψύκτρα που μεταφέρει στην οπή ενός διαφράγματος πάχους 50-100 μm ένα λιπίδιο διασκορπισμένο σε οργανικό διαλύτη. Το διάφραγμα είναι από μη αγώγιμο υλικό (PTFE ή Teflon) που χωρίζει δύο ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Η οπή (άνοιγμα) έχει διάμετρο περίπου 1 mm² και ο διαλύτης είναι τυπικά ένα υδρογονανθρακικό λιπίδιο, όπως δεκάνιο ή δεκαεξάνιο. Αρχικά, λόγω της υδροφοβικότητας της επιφάνειας του ανοίγματος, το λιπίδιο που έχει απλωθεί πάνω στο άνοιγμα σχηματίζει ένα υμένιο αρκετών μm (παχύ), το οποίο λόγω φαινομένων συμβολής δίνει φάσμα με πολλά χρώματα και ραβδώσεις. Στο σημείο αυτό αρχίζει η αυτο-συναρμολόγηση μονοστοιβάδων στην επιφάνεια του λιπιδίου. Το κέντρο της στοιβάδας του λιπιδίου αυθόρμητα γίνεται πολύ λεπτό προκαλώντας την επαφή των μονοστοιβάδων μεταξύ τους και σχηματίζοντας έτσι τη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη (Mueller et al., 1963; Nikolelis, Hianik, and Krull, 1999). Αυτές οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες γίνονται αδιαφανείς και ονομάζονται "**μελανές μεμβράνες**" (black membranes), επειδή λόγω του πάχους τους (~50 Å) εμφανίζονται μαύρες κάτω από το ανακλώμενο φως. Μια **αιωρούμενη** (suspended) λιπιδική διπλοστοιβάδα γνωστή ως **μελανή λιπιδική μεμβράνη, είναι μια διστρωματική μεμβράνη που σχηματίζεται σε ένα μικρό άνοιγμα μιας λεπτής μονωτικής πλάκας που χωρίζει δύο υδατικούς θαλάμους**. Η εγγενής αστάθεια είναι ένας σημαντικός περιορισμός στη χρήση των μελανών μεμβρανών για μακροπρόθεσμη παρακολούθηση της δραστηριότητας διαύλων ιόντων σε συσκευές βιοαισθητήρα και συστοιχίες.

Οι άκρες της οπής μπορεί να είναι προ-χρωματισμένες από τον οργανικό διαλύτη, εξ ου και η ονομασία της ως **τεχνική χρωματισμού**. Η μεμβράνη δημιουργείται με τη «βαφή» του φωσφολιπιδίου από το διαλύτη στην οπή του βυθισμένου στα υδατικά διαλύματα διαφράγματος. Μια παχύτερη δακτυλιοειδής περιοχή, ο λεγόμενος δακτύλιος Plateau-Gibbs, αφήνεται γύρω από την άκρη της οπής και βοηθά στη σταθεροποίηση της διπλοστοιβάδας και στη διατήρηση της ηλεκτρικής μόνωσης μεταξύ των δύο υδατικών διαλυμάτων. Μέσα και έξω από το κύπελλο μπορούν να τοποθετηθούν ηλεκτρόδια για ηλεκτρικές μετρήσεις και επίσης μπορεί να τροποποιηθεί η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος σε κάθε πλευρά της μεμβράνης (Osaki and Takeuchi, 2017). Έτσι, το σύστημα διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών είναι ικανό να μετρά τις ηλεκτρικές ιδιότητες των μεμβρανών που μπορούν να σχηματιστούν σε αυτή τη συσκευή.

Στην **τεχνική χωρίς διαλύτη** σχηματίζονται διπλοστοιβάδες λιπιδίων χρησιμοποιώντας διάφορες εκδόσεις της **τεχνικής Langmuir-Blodgett**. Η μέθοδος παρασκευής που προτείνεται από τους Montal και Mueller χρησιμοποιεί μια συγκρίσιμη συσκευή (σκαφίδιο Langmuir-Blodgett)* με εκείνη που παρουσιάζεται στην τεχνική της ψύκτρας. Η συσκευή με βοήθεια κινητού διαφράγματος από Teflon το οποίο φέρει άνοιγμα διαμέτρου 50-100 μm, διαχωρίζει τη συσκευή σε δύο θαλάμους (διαμερίσματα) οι οποίοι πληρώνονται με ηλεκτρολυτικό διάλυμα, ώστε το άνοιγμα να παραμένει πάνω από την υδατική επιφάνεια. Τα λιπίδια διασπείρονται με οργανικό διαλύτη σε κάθε υδατικό θάλαμο στη διεπαφή αέρα-νερού και τα επίπεδα νερού ανυψώνονται σταδιακά πάνω

από το διάφραγμα (σχ. 4.3). Οι μονοστοιβάδες που σχηματίζονται στους δύο θαλάμους μεταφέρονται στην επιφάνεια του διαχωριστή, όπου συναντώνται και με απόθεση της μιας μονοστοιβάδας πάνω στην άλλη, δημιουργείται στην οπή η διστρωματική μεμβράνη (Montal and Mueller, 1972; Nikolelis, Hianik, and Krull, 1999). Η σχηματιζόμενη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη είναι απαλλαγμένη στο εσωτερικό της (υδρόφοβο τμήμα) από υπολείμματα οργανικού διαλύτη και λόγω του τρόπου παρασκευής των οι μεμβράνες χωρίς διαλύτες είναι γνωστές ως διπλωμένες (folded) μεμβράνες, καθώς δημιουργούνται από δύο μονοστοιβάδες (Hirano-Iwata, Niwano, and Sugawara, 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται συμμετρικές μεμβράνες. Το μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ο έλεγχος του περιεχομένου κάθε λιπιδικής μονοστοιβάδας, που δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού μιας ασύμμετρης μεμβράνης, με την εξαγωγή στο άλλο θάλαμο μιας δεύτερης λιπιδικής σύνθεσης (Gutsmann et al., 2015).

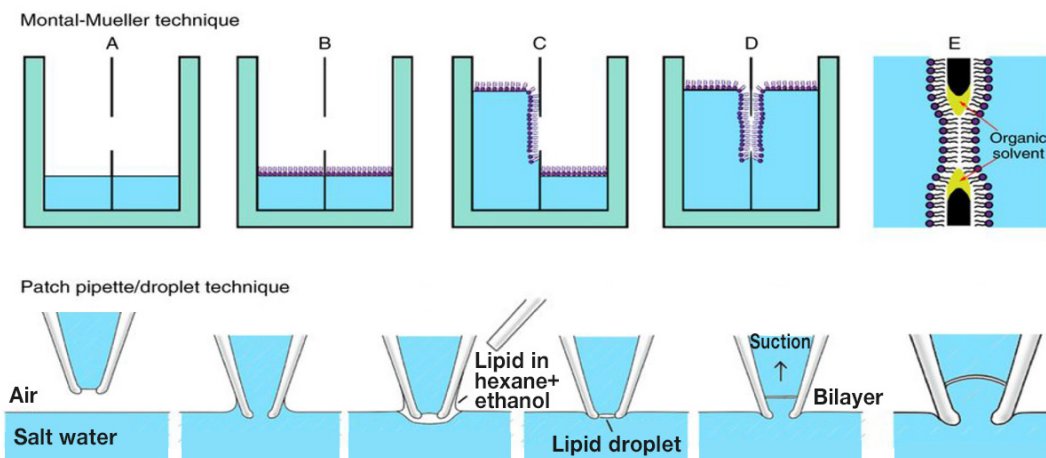
Η τρίτη προσέγγιση ονομάζεται **τεχνική βύθισης της άκρης** (tip-dip) όπου μια λιπιδική διπλοστοιβάδα παρασκευάζεται στην άκρη ενός γυάλινου τριχοειδούς (σιφώνιο ~1 μm) από μια μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων στη διεπαφή αέρα/νερού. Ουσιαστικά η οπή του διαφράγματος αντικαθίσταται από γυάλινο σιφώνιο. Σε ένα λουτρό που περιέχει στην επιφάνειά του διάλυμα φωσφολιπιδίου βυθίζεται η άκρη του τριχοειδούς. Το τριχοειδές ανυψώνεται και διερχόμενο από τη λιπιδική στοιβάδα σχηματίζεται στη άκρη του μια μονοστοιβάδα (σχ. 4.3). Στη συνέχεια, το τριχοειδές βυθίζεται πάλι στη λιπιδική στοιβάδα και διερχόμενο σχηματίζεται μια δεύτερη μονοστοιβάδα που συνδέεται με την πρώτη (Coronado and Latorre, 1983; Hirano-Iwata, Niwano, and Sugawara, 2008). Επειδή οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες σχηματίζονται χωρίς μη πτητικό διαλύτη, η μέθοδος βύθισης κορυφής παρέχει διπλούς λιπιδικούς διπλούς χωρίς διαλύτες. Αν και η μέθοδος αυτή έχει χαμηλό θόρυβο, ο χρόνος ζωής αυτών των διπλοστοιβάδων είναι συνήθως αρκετά λεπτά, αλλά πολύ μικρότερος από τις αρκετές ώρες (ή ημέρες) λιπιδικών διπλοστοιβάδων που περιέχουν διαλύτες που σχηματίζονται με τις μεθόδους βαφής και μονοστρωματικής αναδίπλωσης.



Σχήμα 4.3. Σχηματική απεικόνιση μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας που εκτείνεται στην οπή του διαφράγματος Teflon που παρεμβάλλεται μεταξύ δύο υδατικών διαλυμάτων. Η διπλοστοιβάδα σχηματίζεται κατά μήκος αυτής της οπής, διαχωρίζοντας τους δύο θαλάμους και μπορεί να είναι χρωματισμένη ή μη. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της διπλής στοιβάδας μπορούν να μετρηθούν τοποθετώντας ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς σε κάθε πλευρά του θαλάμου.

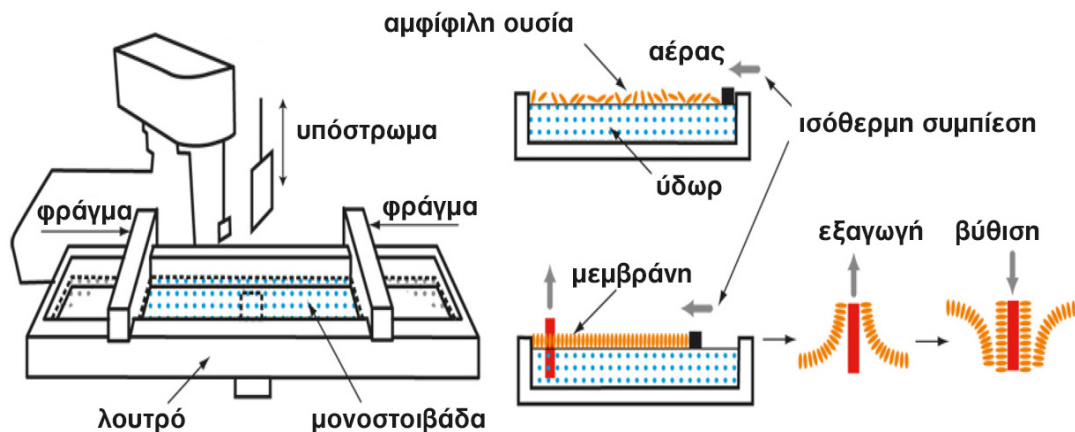
Μια τροποποίηση της αρχικής τεχνικής Montal και Mueller, παρουσιάστηκε από τους Νικολέλη και Krull (*Nikolelis and Krul, 1992b*) με χρήση της ίδιας συσκευής, αλλά η προσθήκη του λιπιδικού διαλύματος να γίνεται μόνο στον ένα θάλαμο. Η διστρωματική μεμβράνη που σχηματίζεται προκύπτει με αναδίπλωση της ίδιας μονοστοιβάδας, μεταβάλλοντας τη στάθμη του ηλεκτρολύτη με τη βοήθεια σύριγγας (τεχνική αναδίπλωσης μονοστοιβάδας).

*Η συσκευή Langmuir σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε στην ομώνυμη **τεχνική Langmuir - Blodgett** για το σχηματισμό μονο- και πολυμοριακών μεμβρανών. Η κύρια ιδέα της τεχνικής είναι ο σχηματισμός μονοστοιβάδας μιας αμφίφιλης ουσίας στην επιφάνεια του νερού και στη συνέχεια η μεταφορά της σε στερεό υπόστρωμα. Στην υδατική φάση τα μόρια της αμφίφιλης ουσίας είναι διατεταγμένα στη διεπαφή αέρα-νερού. Για να σχηματιστεί η επιφανειακή μονοστοιβάδα, τα μόρια αυτά συμπιέζονται χρησιμοποιώντας ένα ειδικό φράγμα (σχ.4.4). Η διαδοχική ισοθερμική συμπίεση μεταβάλλει τη δομή της μονομοριακής μεμβράνης, η οποία διέρχεται μέσα από μία σειρά διαστάσεων καταστάσεων που αρχικά αναφέρονται ως αέριο, ακολούθως ως υγροί κρύσταλλοι και τελικά λαμβάνει μορφή στερεών κρυστάλλων (ζελατινοειδής φάση).



Σχήμα 4.4. Οι δύο μέθοδοι κατασκευής διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών: άνω η τεχνική Montal-Mueller παράγει ένα επίθεμα μεμβράνης επάνω στην οπή της ταινίας Teflon σε μια σειρά βημάτων (A-E), κάτω η τεχνική σιφωνίου (1-6 βήματα) δημιουργεί μια μεμβράνη πάνω από την άκρη μιας πιπέτας που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού.

Για τη μεταφορά της μεμβράνης στο στερεό υποστήριγμα, ένα επίπεδο υπόστρωμα (γυαλί, χαλαζίας ή μέταλλο) βυθίζεται στο διάλυμα και στη συνέχεια εκχλιζείται με την επιφανειακή μεμβράνη προσροφημένη πάνω σε αυτό. Η διαδικασία μεταφοράς μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές για να ληφθούν διάφορες πολυμοριακές στοιβάδες.



Σχήμα 4.5. Σχηματικό διάγραμμα κατασκευής των μεμβρανών Langmuir-Blodgett.

4.3.2 Σχηματισμός λιποσωμάτων

Ο σχηματισμός υποστηριζόμενων λιπιδικών διαστρωματικών μεμβρανών εκτός της τεχνικής Langmuir-Blodgett, μπορεί να γίνει με σύντηξη λιποσωμάτων. Επίσης είναι δυνατό οι δύο μέθοδοι να συνδυαστούν για την παρασκευή υποστηριζόμενων μεμβρανών (Kalb, 1995). Η τεχνική σύντηξης λιποσώματος είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για ακινητοποίηση δεσμευμένων σε μεμβράνη υποδοχέων. Πρωτεΐνες όπως η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), η βακτηριοροδοψίνη (BR), ο υποδοχέας νικοτινικής ακετυλοχολίνης (nAChR) και ο διάλυλος γραμισιδίνης διπλοστοιβάδας έχουν ενσωματωθεί επιτυχώς με αυτή τη μέθοδο (Nikolelis et al., 1995; Puu et al., 1995; Andreou and Nikolelis, 1998).

Φύση και ιδιότητες των λιποσωμάτων: Τα λιποσώματα (liposomes) ή λιπιδικά κυστίδια (vesicles) είναι σφαιρικά δομές στις οποίες ένας υδατικός όγκος περικλείεται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Είναι κενά στο εσωτερικό τους σε αντίθεση με τα μικύλλια και χαρακτηρίζονται από μια μεμβράνη δύο στοιβάδων, που δημιουργεί ένα εξωτερικό υδατικό χώρο κι ένα εσωτερικό υδατικό χώρο. Συνήθως παρασκευάζονται από φωσφολιπίδια, τα οποία σε ένα υδατικό διάλυμα σχηματίζουν ενεργειακά ευνοϊκές δομές ως αποτέλεσμα υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Gustafson, 2004). Οι μηχανισμοί με τους οποίους σχηματίζονται τα λιποσώματα είναι ελάχιστα κατανοητοί. Τα λιποσώματα που παράγονται από τα ίδια λιπίδια μπορεί να έχουν διαφορετικές ιδιότητες, π.χ. μέγεθος, σταθερότητα και αριθμό διπλοστοιβάδων, ανάλογα με την επιλογή της μεθόδου παρασκευής.

Τα θερμοδυναμικά μοντέλα έχουν δείξει ότι τα λιποσώματα γενικά δεν είναι σταθερές δομές, λόγω της ενέργειας κάμψης που απαιτείται για την καμπυλότητα των στοιβάδων λιπιδίων. Η αστάθεια είναι αυτή που τα καθιστά χρήσιμα και για την κατασκευή επίπεδων υποστηριζόμενων μεμβρανών και ως φορέων φαρμάκων (Gustafson, 2004). Ανάλογα με το μέγεθος και τον αριθμό των διπλοστοιβάδων, τα λιποσώματα ταξινομούνται ως **μεγάλα πολυστρωματικά κυστίδια** (large multilamellar vesicles, MLV's)

ή **μεγάλα και μικρά μονοστρωματικά κυστίδια** (large and small unilamellar vesicles, LUV's and SUV's) (Lasic, 1998). Τα λιποσώματα μπορούν να τροποποιηθούν με τον επιθυμητό τρόπο διαμέσου της επιλογής των συστατικών της μεμβράνης και αυτή είναι η ιδιότητα, που τα έκανε ελκυστικά ως συστήματα μοντέλων για την κυτταρική μεμβράνη. Είναι επίσης δυνατό να στοχεύσουμε συγκεκριμένα κύτταρα, προσαρτώντας ένα κατάλληλο μόριο στην επιφάνεια του λιποσώματος, που συνδέεται ειδικά με μια θέση υποδοχέα (Lasic, 1998).

Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα μοντέλων για βιοφυσικές μελέτες αλληλεπιδράσεων λιπιδίου-λιπιδίου και πρωτεΐνης-λιπιδίου, Διακρίνονται σε **συμμετρικά** και **ασύμμετρα** μοντέλα μεμβρανών (St. Clair et al., 2017). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα λιποσώματα τεχνητής μεμβράνης έχουν συμμετρία λιπιδίων, δηλαδή η λιπιδική σύνθεση και στις δύο πλευρές είναι πανομοιότυπη ή σχεδόν πανομοιότυπη.

Παρασκευές λιποσωμάτων: Τα λιποσώματα δεν μπορούν να σχηματιστούν αυθόρμητα, επειδή οι δομές αυτές γενικώς δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερές. Η παραγωγή λιποσωμάτων απαιτεί ενέργεια. Μετά το σχηματισμό τους τα λιποσώματα μπορούν να συσσωματώνονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερες δομές. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την παρασκευή λιποσωμάτων. Οι μεταξύ αυτών κύριες διαφορές προέρχονται από το πώς τα συστατικά της μεμβράνης διασκορπίζονται πριν από το σχηματισμό, δηλαδή αν προστεθεί το νερό σε έλαιο ή το έλαιο στο νερό, καθώς και διάφορες τεχνικές δημιουργίας τεχνητών μεμβρανών με διαλυτοποίηση του απορρυπαντικού (detergent). Η λύση προκύπτει αν προστεθεί ενέργεια με διάφορους τρόπους, όπως η εξώθηση, η χειροκίνητη ανάδευση και η υπερήχηση (Lasic, 1998).

Τα **συμμετρικού μοντέλου λιποσώματα** μεμβρανών μπορούν να κατασκευαστούν από μια ποικιλία φωσφολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων, με ή χωρίς στερόλες και σε μια ποικιλία μεγεθών. Τα πολυστρωματικά συμμετρικά λιποσώματα παρασκευάζονται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος σε στερεό λιπίδιο και ακολουθεί ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα ή με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων (Nikolelis et al., 2008). Τα πολυεπίπεδα πολυστρωματικά λιπίδια έχουν πολύ μεταβλητό μέγεθος, με 8-15 συγκεντρικές διπλοστοιβάδες, που περικλείονται σε ένα λιπόσωμα με διάμετρο που κυμαίνεται από 0,5 έως μερικά μικρά. Τα μικρά μονοστρωματικά λιποσώματα (SUV), δηλαδή με μονή διπλοστοιβάδα, έχουν διάμετρο μικρότερη από 50 nm και παρασκευάζονται με υπερήχηση των αποξηραμένων λιπιδίων σε ένα υδατικό μέσο ή με αραιώση από αιθανόλη (Dua, Rana and Bhandari, 2012). Μεγάλα μονοστρωματικά λιποσώματα συνήθως με διάμετρο 100-200 nm, είναι σχετικά απαλλαγμένα από την τάση καμπυλότητας των SUV και παρασκευάζονται υποβάλλοντας τα MLVs σε πολλαπλούς κύκλους ψύξης-απόψυξης που ακολουθούνται από εξώθηση μέσω φίλτρων μεμβράνης με πόρους επιθυμητού μεγέθους, οπότε λαβάνονται λιποσώματα με προσεκτικά ελεγχόμενη διάμετρο (Hope et al., 1993). Υπάρχουν και τα γιγάντια μονοστρωματικά κυστίδια (giant unilamellar vesicles GUV) τα οποία προσεγγίζουν το μέγεθος των ζώντων ευκαρυωτικών κυττάρων και μπορεί να παραχθούν με ηλεκτροδιαμόρφωση, ήπια

ενυδάτωση, και με διάφορες τεχνικές ελαίου σε νερό (St. Clair, 2017). Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για μελέτες μικροσκοπίας του φωτός.

Η **παρασκευή ασύμμετρων μεγάλων μονοστρωματικών κυστιδίων** (LUVs) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, επειδή το μέγεθός τους είναι καλά καθορισμένο και οι ιδιότητες της διπλοστοιβάδας δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την υψηλή καμπυλότητα που απαντάται στα μικρά μονοστρωματικά κυστίδια (SUVs) ή από αλληλεπιδράσεις με ένα υπόστρωμα που βρίσκεται στα υποστηριζόμενα λιπίδια. Η δημιουργία ασύμμετρων μονοστρωματικών κυστιδίων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις διαφορετικές μεθόδους: (α) εφαρμογή διαφορικού pH σε κυστίδια που περιέχουν ανιονικά λιπίδια, (β) εξωτερική προσθήκη ενζύμων που τροποποιούν επιλεκτικά τις ομάδες κεφαλής λιπιδίων των εξωτερικών φύλλων (leaflet), και (γ) εξωτερική προσθήκη μεταφερόμενων λιπιδικών μορίων που καταλύουν την ενδοκυστιδική ανταλλαγή των εξωτερικών λιπιδικών φύλλων (Doctorova et al., 2018).

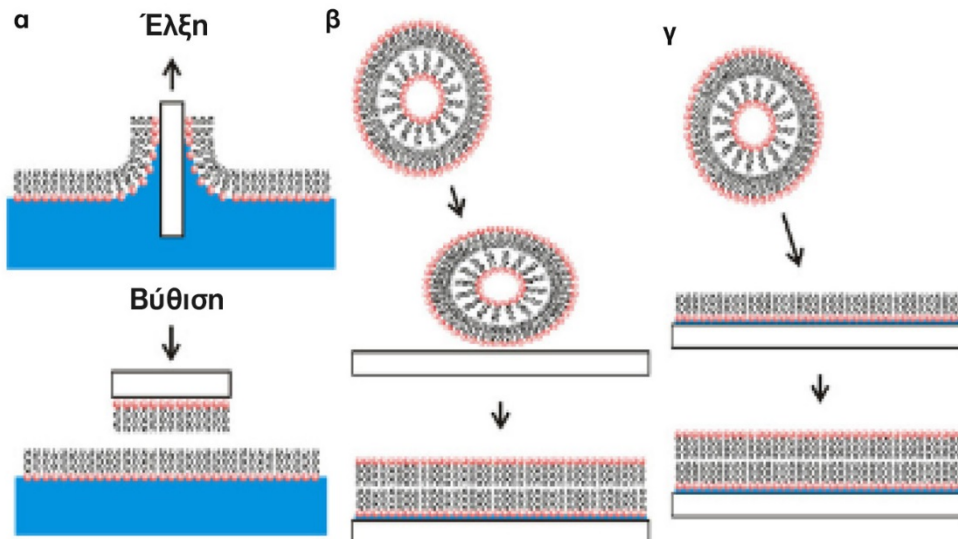
Αν και τα **ασύμμετρα γιγάντια μονοστρωματικά κυστίδια** (GUVs) δεν επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση καμπυλότητας και υποστρώματος, το μέγεθός τους είναι πιο δύσκολο να ελεγχθεί επακριβώς. Η κύρια μέθοδος παρασκευής αυτών με μέγεθος μικρόμετρου περιλαμβάνει τη διέλευση ενός σταγονιδίου ανεστραμμένου γαλακτώματος διαμέσου μιας διεπαφής κεκαλυμμένου λιπιδίου/ και ελαίου-νερού με τον περιορισμό, ότι τα κυστίδια περιέχουν υπολειμματικό οργανικό διαλύτη που θα μπορούσε να επηρεάσει τις ιδιότητες της διπλοστοιβάδας.

4.4 Υποστηριζόμενες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες

Η κατασκευή λιπιδικών μεμβρανών σε διάφορα υποστηρίγματα παρέχει καλύτερη μηχανική σταθερότητα. Εν τούτοις η **αυτοσυναρμολόγηση** παραμένει η πλέον προτιμώμενη μέθοδος κατασκευής, αν και ο ακριβής προσανατολισμός ενσωματωμένων χαρακτηριστικών δεν μπορεί να ελεγχθεί ή να αναπαραχθεί με ακρίβεια. Ένα υπόστρωμα, για να υποστηρίξει μια μεμβράνη υψηλής ποιότητας δηλαδή με ελάχιστα ή καθόλου ελαττώματα και υψηλή κινητικότητα των λιπιδίων, θα πρέπει η επιφάνειά του να είναι υδρόφιλη, ομαλή και καθαρή. Οι ποικιλίες υποστρωμάτων που είναι ικανές να υποστηρίξουν τις διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων είναι κάπως περιορισμένες (πηκτές, μαρμαρυγία, κεραμικά, μέταλλα ή πυρίτιο). Οι μεμβράνες αυτές προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε έναν πειραματιστή, συμπεριλαμβανομένων της ευκολίας παρασκευής, της σταθερότητας, της μορφοποίησης και της διαθεσιμότητας μιας ευρείας ποικιλίας επιφανειακά ευαίσθητων τεχνικών για τον χαρακτηρισμό τους (Chan and Boxer, 2007).

Υπάρχουν τρεις γενικές μέθοδοι σχηματισμού **υποστηριζόμενων διστρωματικών μεμβρανών** (supported membrane) για εφαρμογές βιοισθητήρων σε επίπεδα υποστηρίγματα (Castellana and Cremer, 2006): Η πρώτη περιλαμβάνει τη μεταφορά ενός κατώτερου φύλλου λιπιδίων από τη διεπαφή αέρα-νερού με την τεχνική Langmuir-Blodgett και ακολουθείται η μεταφορά ενός άνω φύλλου με τη διαδικασία Langmuir-Schaefer, η οποία περιλαμβάνει οριζόντια εμβάπτιση του υποστρώματος για τη

δημιουργία της δεύτερης στοιβάδας (σχ. 4.6α). Η *δεύτερη* μέθοδος σχηματισμού υποστηριζόμενης διπλοστοιβάδας περιλαμβάνει την προσρόφηση και τη σύντηξη λιποσωμάτων από ένα υδατικό εναιώρημα στην επιφάνεια του υποστρώματος (σχ. 4.6β). Η *τρίτη* μέθοδος συνδυάζει τις δύο προηγούμενες, πρώτα με τη μεταφορά μιας μονοστοιβάδας μέσω της τεχνικής Langmuir-Blodgett που ακολουθείται από σύντηξη λιποσωμάτων για να σχηματιστεί η ανώτερη στοιβάδα (σχ. 4.6γ)



Σχήμα 4.6. Κοινές τεχνικές για τον σχηματισμό υποστηριζόμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων: (α) Η τεχνική Langmuir-Blodgett διεξάγεται πρώτα με έλξη ενός υδρόφιλου υποστρώματος διαμέσου μιας λιπιδικής μονοστοιβάδας και διαδοχικά ώθηση της οριζόντιας μονοστοιβάδας μέσω μιας άλλης λιπιδικής μονοστοιβάδας, (β) Τα λιποσώματα στο διάλυμα προσροφούν και αυθόρμητα συντήκονται στην επιφάνεια για να σχηματίσουν μια στερεά υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα, (γ) Ένας συνδυασμός των διαδικασιών σύντηξης Langmuir-Blodgett και λιποσώματος.

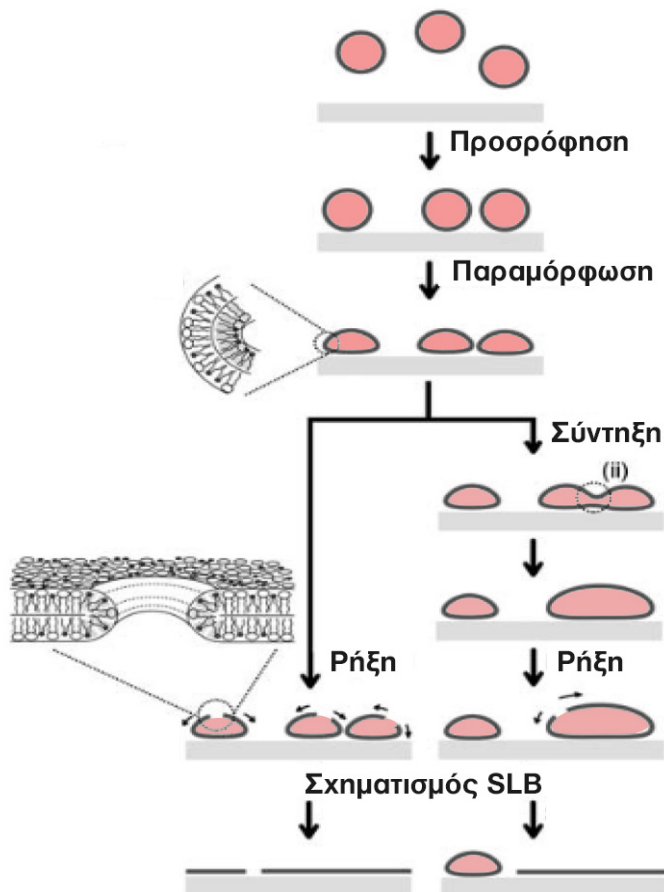
Κάθε μια από τις τρεις μεθόδους απόθεσης έχει τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Η τεχνολογία που βασίζεται στη μέθοδο Langmuir-Blodgett έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη πλατφορμών με ακριβή προσανατολισμό, αλλά και τοποθέτηση τμημάτων των μεμβρανών προς ανασύσταση της επιφάνειας ή της βιοχημείας των διαμεμβρανών. Η μεταφορά των αμφίφιλων μορίων από τη διεπαφή αέρα-νερού σε ένα στερεό υπόστρωμα χρονολογείται από τη δεκαετία του 1920. Οι Tamm και McConnell ήταν οι πρώτοι που εφάρμοσαν την τεχνική αυτή για να σχηματίσουν υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων με διαδοχική μεταφορά μονοστοιβάδας σε υποστρώματα από χαλαζία, γυαλί και οξειδωμένο πυρίτιο (*Tamm and McConnell, 1985*). Η μέθοδος είναι χρήσιμη για τον σχηματισμό ασύμμετρων διπλοστοιβάδων αν και υπάρχει δυσκολία να ενσωματωθούν οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην λιπιδική διπλοστοιβάδα, επειδή πριν από τη μεταφορά τους, τμήματα των πρωτεϊνών εντός της μονοστοιβάδας εκτίθενται στον αέρα και μπορεί να μετουσιωθούν. Υπό βελτιστοποιημένες αναλογίες μεταφοράς τόσο η κατακόρυφη όσο και η οριζόντια διαδικασία ανύψωσης και απόσυρσης των ταινιών Langmuir για τη μεταφορά τους σε ένα στερεό υπόστρωμα έχει μειώσει το πρόβλημα μετουσίωσης των

πρωτεϊνών (Siontorou et al., 2017). Έτσι με παρόμοιες διαδικασίες εκτύπωσης 3D έχουν παρασκευαστεί συμπιεσμένες λιπιδικές μονοστοιβάδες που μεταφέρθηκαν και εναποτέθηκαν πάνω σε μεταλλικά υποστηρίγματα, παράγοντας στήλες από μονοστοιβάδες, με το πλεονέκτημα προσαρμογής σε οποιαδήποτε σχεδιαστική και τεχνική ανάγκη. Επειδή ο αναλυτής γνωρίζει το διάγραμμα φάσεων της μεμβράνης, μπορεί να ελέγξει τη δομή και τις συναφείς φυσικοχημικές ιδιότητες (Orrit, 2009; siontorou et al., 2017) όπως π.χ. τον ακριβή έλεγχο του πάχους και της μοριακής οργάνωσης της στοιβάδας, τη διαφορετική λιπιδική σύνθεση, την ομοιογενή εναπόθεση της μονοστοιβάδας σε εκτεταμένο μήκος, τις δομές πολλαπλών στοιβάδων καθώς και ποικιλία επιλογών αγκύστρωσης σε οποιοδήποτε υποστήριγμα.

Η προσρόφηση και η σύντηξη μικρών μονόπλευρων λιποσωμάτων (small unilaminar vesicles, SUVs) είναι ένα από τα ευκολότερα και πιο ευπροσάρμοστα μέσα για το σχηματισμό στερεών υποστηριζόμενων διπλοστοιβάδων. Τα SUVs μπορεί να παρασκευαστούν με μια πληθώρα μεθόδων. Η απλούστερη περιλαμβάνει την εξώθηση πολυστρωματικών λιποσωμάτων μέσα από πορώδεις πολυανθρακικές μεμβράνες σε υψηλή πίεση (Castellana and Cremer, 2006). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση και τη σύντηξη των SUVs σε στερεά υποστρώματα περιλαμβάνουν: τη σύνθεση λιποσωμάτων, το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο, την τραχύτητα της επιφάνειας, την καθαρότητα της επιφάνειας, το pH του διαλύματος, την ιοντική ισχύ και την ωσμωτική πίεση των λιποσωμάτων (Reimhult, Hook and Kasemo, 2003). Η διαδικασία αρχίζει με την προσρόφηση λιποσωμάτων από το χύδην διάλυμα επί του υποστρώματος (σχ.4.6). Στα αρχικά στάδια τα SUVs μπορούν να αλληλοσυνδέονται, ενώ στη συνέχεια διασπώνται και διασυνδέονται με το υπόστρωμα, σχηματίζοντας επίπεδες υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες με μια διαδικασία που εξαρτάται από τη χημεία των μεμονωμένων λιπιδίων (Hamai et al., 2006).

Η παρουσία δισθενών κατιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία προσρόφησης. Επίσης η σύντηξη SUVs στο υπόστρωμα μπορεί να ενισχυθεί με θέρμανση και με προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης. Αν και ο ακριβής μηχανισμός του σχηματισμού διπλοστοιβάδας από την προσρόφηση και τη σύντηξη SUV δεν είναι πλήρως κατανοητός, η μαθηματική μοντελοποίηση του συστήματος έχει δείξει καλή συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα (Castellana and Cremer, 2006). Η συνδυαστική τεχνική με τη μεταφορά μονοστοιβάδας κατά Langmuir-Blodgett και την ακολουθούμενη σύντηξη των SUVs στην προκαθορισμένη μονοστοιβάδα του φωσφολιπιδίου είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για το σχηματισμό ασύμμετρων διπλοστοιβάδων και για την ενσωμάτωση πρωτεϊνών μεταφοράς σε στερεές υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες.

Η πρόσδεση διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών σε στερεά υποστρώματα, όπως θειολιπίδια, σιλανολιπίδια, χρυσό κ.ά. επιτρέπει την κατασκευή συγκροτημάτων κατάλληλων για την παρακολούθηση της δραστηριότητας της διαμεμβράνης. Εναλλακτικά, οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες μπορούν να σταθεροποιηθούν με μια πρωτεϊνική στοιβάδα, η οποία χρησιμοποιείται είτε ως στοιβάδα πρόσδεσης για να στηρίξει τη λιπιδική μεμβράνη στην μεταλλική επιφάνεια είτε ως πλέγμα που φιλοξενεί τις πρωτεΐνες στο εσωτερικό της λιπιδικής μεμβράνης όπως φαίνεται στο σχήμα 4.7 (Siontorou et al., 2017).

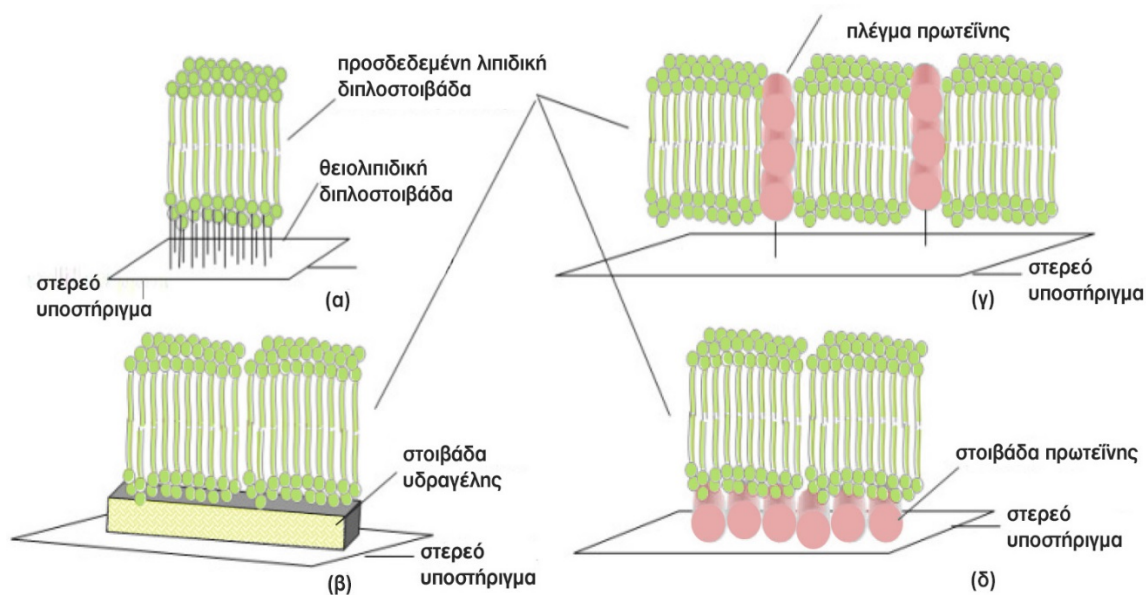


Σχήμα 4.7. Σχηματική παράσταση της μεθόδου σύντηξης λιπιδίων. Τα προσροφημένα κυστίδια παραμορφώνονται και διασπώνται ή συγχωνεύονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα κυστίδια, τα οποία με τη σειρά τους διαρύνονται για να σχηματίσουν μια συνεχή υποστηριζόμενη λιπιδική μεμβράνη.

Η συναρμολόγηση μεμβρανών σε πιο **μαλακά υποστηρίγματα** όπως αλουμίνα ή γυαλί υπερδιήθησης ή πολυανθρακικά φίλτρα έχει αποδειχθεί, ότι αυξάνει το βαθμό αιωρήματος της μεμβράνης σχηματίζοντας ένα δίκτυο διασυνδεδεμένων μεμβρανών οι οποίες καταλαμβάνουν τους πόρους και υποστηρίζονται από το μη πορώδες τμήμα του υποστρώματος. Άλλα υλικά που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως υποστηρικτικά για διστρωματικές μεμβράνες είναι υδρογέλες, ειδική χιτοζάνη, ή διάφορα πολυμερή π.χ. πολυαιθυλενοϊμίνη, πολυακρυλαμίδιο και πολυσακχαρίτες (*Siontorou et al., 2017*). Αυτή η προσέγγιση υποστηρίζει τις μεμβράνες με έναν πιο φυσικό τρόπο, αλλά περιορίζει την επιφανειακή χημεία και τα ενδοφασικά φαινόμενα τόσο από φυσική απόφραξη της επιφάνειας όσο και από περιορισμένη ιοντική δεξαμενή.

Η υποστηριζόμενη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη είναι μια επίπεδη δομή που επικάθεται σε ένα στερεό υποστήριγμα, σε αντίθεση με το λιπόσωμα (κυστίδιο) ή την κυτταρική μεμβράνη, όπου η λιπιδική διπλοστοιβάδα τυλίγεται σε κλειστό κέλυφος. Εξ αιτίας αυτής της κατασκευής μόνο η επάνω όψη της στοιβάδας εκτίθεται σε ελεύθερο διάλυμα. Η διάταξη αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα της **σταθερότητας** (stability), δηλαδή δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές υπό την επίδραση εξωτερικών

παραγόντων στη σύνθεση, το σχήμα και την οργάνωση ή εσωτερικών μετασχηματισμών π.χ. κατά τη διάρκεια του πειράματος. Από θερμοδυναμική άποψη η μεμβράνη είναι σταθερή, όταν αυξάνεται η ενέργεια του συστήματος από την ελάχιστη μεταβολή ορισμένων εξωτερικών παραμέτρων όπως πίεση, θερμοκρασία, δυναμικό, επιφανειακή τάση κ.λπ. (Dimitrov and Jain, 1984). Ο χρόνος μετάβασης της μεμβράνης από τη σταθερή στην ασταθή κατάσταση είναι το ζητούμενο στοιχείο για την κατάστροφη του πειράματος, με όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρόνο σταθερής κατάστασης. Οι υποστηριζόμενες μεμβράνες είναι πιο ανθεκτικές και σταθερές από τις αιωρούμενες (μελανές) λιπιδικές μεμβράνες. Παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άθικτες, ακόμη κι όταν υπόκεινται σε δονήσεις ή υψηλές ταχύτητες ροής και σε αντίθεση με τις αιωρούμενες μεμβράνες, η παρουσία οπών δεν καταστρέφει ολόκληρη τη διπλοστοιβάδα. Το σημαντικότερο πρόβλημα που εμποδίζει η χρήση των ελεύθερα αιωρούμενων διστρωματικών μεμβρανών ως πρακτικών βιοαισθητήρων είναι η εγγενής ευθραυστότητα. Οι μεμβράνες αυτές καταρρέουν σε απόκριση ακόμη και αδύναμων μηχανικών ή ηλεκτροσόκ (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002). Λόγω της σταθερότητας που παρουσιάζουν οι υποστηριζόμενες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες, τα πειράματα που εκτελούνται έχουν διάρκεια εβδομάδων ή και μηνών, ενώ τα πειράματα με αιωρούμενες μεμβράνες συνήθως περιορίζονται σε λίγες ώρες (Purrucker et al., 2001), εκτός κι αν χρησιμοποιηθούν υποστηρίγματα υδρογέλης ή μέταλλα που αυξάνουν το χρόνο σε μιας ή το πολύ δύο ημερών.



Σχήμα 4.8. Τεχνικές συναρμολόγησης υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών (δ.λ.μ.):

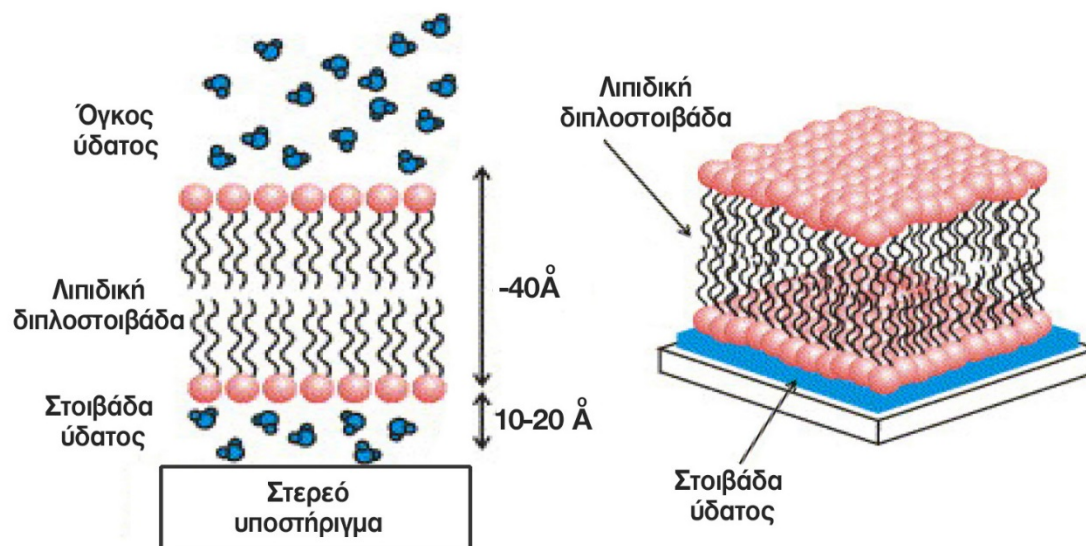
- | | | |
|------------|------------------------------|-----------------------|
| (α) δ.λ.μ. | → θειολιπιδική στοιβάδα | → στερεό υποστήριγμα |
| (β) δ.λ.μ. | → στοιβάδα υδραγέλης | → στερεό υποστήριγμα |
| (γ) δ.λ.μ. | → πλέγμα (lattice) πρωτεΐνης | → στερεό υποστήριγμα |
| (δ) δ.λ.μ. | → στοιβάδα πρωτεΐνης | → στερεό υποστήριγμα. |

Οι υποστηριζόμενες λιπιδικές μεμβράνες είναι **επιδεικτικές στην ανάλυση ενός αριθμού στοιχείων** που τις χαρακτηρίζουν λόγω της επίπεδης σκληρής επιφάνειας τους και αυτό αποτελεί βασικό πλεονέκτημα. Η ανίχνευση θα ήταν αδύνατο να γίνει ή θα προσέφεραν χαμηλότερη ανάλυση, εάν εκτελούνταν σε ένα δείγμα που επιπλέει ελεύθερα. Διάφορες τεχνικές ανίχνευσης έχουν χρησιμοποιηθεί όπως η *μικροσκοπία ατομικής δύναμης*, η *μικροανάλυση κρυστάλλων χαλαζία*, η *συμβολομετρία διπλής πόλωσης* καθώς και πολλές άλλες σύγχρονες τεχνικές *μικροσκοπίας φθορισμού*. Οι ερευνητές μελέτησαν μεγάλο αριθμός στοιχείων που χαρακτηρίζουν τις υποστηριζόμενες μεμβράνες, όπως ο διαχωρισμός λιπιδικών φάσεων, η συναρμολόγηση πρωτεϊνών, η ανίχνευση των μηχανικών ιδιοτήτων των μονών διπλοστοιβάδων (*Engel and Muller, 2000; Lin et al., 2006; Mager, Almquist, and Melosh, 2008; Steltenkamp et al., 2006*), η κινητική δέσμευσης στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας, η διάσπαση των λιπιδικών διπλοστοιβάδων κατά τη διάρκεια αλληλεπιδράσεων κ.ά.

Ένα άλλο πλεονέκτημα των υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών είναι η **ικανότητα σχεδιασμού της επιφάνειας**, ώστε να παράγονται πολλαπλές απομονωμένες περιοχές στο ίδιο υπόστρωμα. Αυτό επιτυγχάνεται με μηχανικό ξύσιμο, για να αποφευχθεί η ανάμειξη μεταξύ παρακείμενων περιοχών, ενώ παράλληλα επιτρέπεται η ελεύθερη διάχυση μέσα σε οποιαδήποτε περιοχή.

Βασικό μειονέκτημα των υποστηριζόμενων λιπιδικών μεμβρανών είναι η πιθανότητα **ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων με το υπόστρωμα**. Οι υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες γενικώς δεν έρχονται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του υποστρώματος. Διαχωρίζονται με ένα πολύ λεπτό στρώμα 10-20 Å παγιδευμένου νερού μεταξύ του υποστρώματος και της διπλοστοιβάδας (*Tamm and McConnell, 1985*) με το μέγεθος και τη φύση του κενού να εξαρτώνται από το υλικό του και τα λιπιδικά είδη υποστρώματος (*Mager, Almquist and Melosh, 2008*).

Οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις υποστρώματος δημιουργούν πολύ μεγαλύτερο πρόβλημα, όταν ενσωματώνονται ολοκληρωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης, ιδιαίτερα εκείνες με μεγάλες περιοχές που προσκολλώνται έξω από τον πυρήνα της διπλοστοιβάδας. Επειδή το χάσμα μεταξύ της διπλοστοιβάδας και του υποστρώματος είναι τόσο λεπτό, συχνά οι πρωτεΐνες αυτές μετουσιώνονται στην επιφάνεια του υποστρώματος και συνεπώς χάνουν όλη τη λειτουργικότητά τους (*Castellana and Cremer, 2006*). Η ενσωμάτωση πρωτεϊνών μεμβράνης συχνά οδηγεί σε απώλεια πλευρικής κινητικότητας και λειτουργίας (*Chan and Boxer, 2007*). Για να εμποδιστεί το πρόβλημα αυτό χρησιμοποιούνται δεσμευμένες με πολυμερές διπλοστοιβάδες, όπου το υποστήριγμα είναι ένα χαλαρό δίκτυο ενυδατωμένων πολυμερών ή υδρογέλης που δρα ως αραιωτικό και θεωρητικά αποτρέπει τις αλληλεπιδράσεις μετουσίωσης του υποστρώματος. Η συναρμολόγηση διπλοστοιβάδων σε μαλακότερα υποστήριγματα, όπως είναι τα πολυμερή προστατευτικά (cushions) αποτελεί βασική στρατηγική. Η ομάδα Tamm χρησιμοποιεί μεταφορές Langmuir/ή και σύντηξη κυστιδίων για τη δημιουργία διπλοστοιβάδων που υποστηρίζονται από πολυμερή με διαφορετικά λιπιδικά μείγματα στα δύο φύλλα (*Kiessling, Crane, and Tamm, 2006*).



Σχήμα 4.9. Σχηματικό διάγραμμα μιας στερεάς υποστηριζόμενης διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίου. Η μεμβράνη διαχωρίζεται από το υπόστρωμα με νερό πάχους 10-20 Å

Μια άλλη στρατηγική για τη διατήρηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας είναι η χρήση μακρών αλυσίδων για την απομάκρυνση της μεμβράνης από το στερεό υπόστρωμα. Αυτές οι δεσμευμένες διπλοστοιβάδες μπορούν να σχηματιστούν σε μια ποικιλία επιφανειών (π.χ. πυρίτιο ή χρυσός) με τροποποίηση του μορίου αγκύρωσης χρησιμοποιώντας χημεία επιφανειακής σύζευξης (σιλάνιο ή θειόλη, αντίστοιχα) (Atanasov *et al.*, 2006). Όταν χρησιμοποιείται μεταλλικό υποστήριγμα, μπορούν να πραγματοποιηθούν ηλεκτρικές μετρήσεις για την παρακολούθηση της δραστηριότητας των διαύλων ιόντων που ενσωματώνονται στη διπλή στρώση.

4.4.1 Μεμβράνες υποστηριζόμενες σε μεταλλική επιφάνεια (metal supported membranes)

Μεταξύ των υλικών που χρησιμοποιούνται ως υποστηρίγματα (πηκτές, μαρμαρυγία, κεραμικά, πυρίτιο) ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μεταλλικές επιφάνειες. Αυτοσυναρμολογούμενη διστρωματική λιπιδική μεμβράνη στην επιφάνεια ακροτομημένου ηλεκτροδίου μετάλλου αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Tien και Salamon για χρήσεις σε βιολογικές μήτρες (Tien and Salamon, 1989). Η μέθοδος εμφάνισης είναι ο απλούστερος τρόπος να κατασκευαστεί μια διστρωματική μεμβράνη στο άκρο φρεσκοκομμένου μεταλλικού σύρματος (Ag, Pt, Ni, κ.ά) επικαλυμμένου με Teflon. Το άκρο του σύρματος με διάμετρο 0,1-0,5 mm βυθίζεται σε διάλυμα λιπιδίων και μια μικρή σταγόνα του διαλύματος προσκολλάται στην άκρη του σύρματος. Στη συνέχεια κι ενώ το σύρμα είναι ακόμα βυθισμένο, αποκόπτεται η άκρη με ένα μικροσκοπικό κόφτη και το σύρμα μεταφέρεται σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα (συνήθως 0,1 M KCl αναμεμειγμένο με συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα), οπότε η σταγόνα λιπιδίων λεπταίνει αυθόρμητα σχηματίζοντας μια αυτοσυναρμολογημένη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Nikoleli *et al.*, 2018a;

Nikoleli et al., 2018c). Η διαδικασία σχηματισμού πιθανώς λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια (α) αρχικά σχηματίζεται η πρώτη μονοστιβάδα η οποία προσαρτάται στο υποστήριγμα μέσω κολλοειδών αλληλεπιδράσεων, πιέζοντας και παγιδεύοντας μια μικρή ποσότητα νερού μεταξύ μετάλλου και πολικής περιοχής του λιπιδικής στοιβάδας (β) η δεύτερη μονοστιβάδα σχηματίζεται από διασκορπισμένα μόρια λιπιδίων πάνω στην πρώτη, όταν το σύρμα είναι πλήρως βυθισμένο στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα (*Siontorou et al., 2017*). Η διάμετρος (0,25 έως και 1,0 mm) και η σύνθεση των χρησιμοποιούμενων συρμάτων βρέθηκαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στον χρόνο που απαιτείται για τη σταθεροποίηση της συσκευής και το μέγεθος του θορύβου από τη ροή ιόντων. Σημαντικό είναι να υπάρχει αναπαραγωγιμότητα της ακροτόμησης του ηλεκτροδίου έτσι ώστε να υπάρχει αναπαραγωγιμότητα και στη δημιουργία των υποστηριζόμενων διστρωματικών μεμβρανών (*Nikolelis et al. 1996a; Siontorou et al. 1998*).

4.4.2 Λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρα (filter supported membranes)

Μια άλλη μορφή υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών μπορεί να γίνει με τη βοήθεια διαφόρων φίλτρων. Οι Thompson, Lennox and McClelland το 1982 διερεύνησαν τις ηλεκτρικές ιδιότητες λιπιδικών μεμβρανών που υποστηρίζονται σε φίλτρα χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό ηλεκτρόμετρο σε συνδυασμό με δύο μονές συνδέσεις ηλεκτροδίων αναφοράς Ag/AgCl και μια σταθερή τροφοδοσία ισχύος. Το σύνολο των ηλεκτρικών συσκευών περιβλήθηκε σε ένα κλωβό Faraday και διεξήχθησαν ηλεκτρονικές μικρογραφίες σάρωσης των φίλτρων με μικροσκόπιο εκπομπής πεδίου (*Thompson, Lennox and McClelland, 1982*). Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ποικίλα μεγέθη πόρων και ήταν μείγμα εστέρα κυτταρίνης, πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), PTFE ενισχυμένο με πολυπροπυλένιο και πολυανθρακικά. Το περίβλημα της μεμβράνης (membrane housing) διαχωρίστηκε σε δύο υδατικά διαμερίσματα μέσω ενός Perspex (πάχους 1 mm) που φέρει κυκλικό στόμιο με διαμέτρου 4 mm, το οποίο καλύπτεται από το φίλτρο. Το φίλτρο προσαρτήθηκε στο Perspex με CHCl₃ και κάθε διαμέρισμα που περιέχει 5-10 mL διάλυμα φωσφατυδιλοχολίνης (0,33-4,0 % β/όο) σε κανονικό δεκάνιο, τέθηκε σε ταχεία ανάδευση. Το διάλυμα ηλεκτρολύτη (5 mL NaCl ή KCl 0,1 M) προστέθηκε σε 10 δευτερόλεπτα σε κάθε πλευρά του φίλτρου καλύπτοντας το άνοιγμα (οπή) σε ύψος 0,5 cm από την κορυφή της μεμβράνης. Τα χαρακτηριστικά "αραίωσης" της μεμβράνης παρακολουθούνταν συνεχώς μέχρι να επιτευχθεί σταθερό ρεύμα στη γραμμή βάσης (*Thompson, Lennox and McClelland, 1982*).

Μια άλλη προσέγγιση δημιουργίας υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδίων σε φίλτρα από υαλώδεις ίνες (glass fiber filters) έχει περιγραφεί από τους Nikolelis κ.ά., με τη λιπιδική μεμβράνη να σχηματίζεται πάνω σε δίσκο από μικροσκοπικές ίνες υαλώδους φίλτρου με μέγεθος πόρων 0,7 μm (*Nikolelis et al., 1995; Andreou and Nikolelis, 1998*). Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείτο από δύο θαλάμους πλεξιγκλάς (plexiglas) που διαχωρίζονται με ένα χώρισμα Saran Wrap ~10 μm πάχος. Ο δίσκος μικροϊνών τοποθετείται γύρω από ένα στόμιο διαμέτρου 0,32 mm κατεργασμένο στο κέντρο του

πλαστικού διαχωριστικού. Το όλο σύστημα, δηλαδή το ηλεκτροχημικό κύτταρο και ο ηλεκτρονικός εξοπλισμός απομονώθηκαν σε γειωμένο κλωβό Faraday. Η διαδικασία για το σχηματισμό των σταθεροποιημένων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών περιλαμβάνει την προσθήκη του διαλύματος λιπιδίων στάγδην στην επιφάνεια του ηλεκτρολύτη ενός θαλάμου, απομάκρυνση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος με τη βοήθεια σύριγγας από το θάλαμο αυτό και επανάληψη της προσθήκης μετά από λίγα δευτερόλεπτα. Αυτές οι μικρομεμβράνες σχηματίζουν ένα δίκτυο πάνω στο φίλτρο, αλλά ηλεκτροχημικά και φυσικοχημικά το σύστημα συμπεριφέρεται ως μια επίπεδη μεμβράνη. Ο σχηματισμός τους επαληθεύτηκε από τα μεγέθη του ρεύματος ιόντων, τα οποία μειώθηκαν από μA σε λίγα pA και επιβεβαιώθηκαν από τον ηλεκτροχημικό χαρακτηρισμό χρησιμοποιώντας γραμμισιδίνη D (Nikolelis et al., 1995; Andreou and Nikolelis, 1998). Οι μεμβράνες αυτές αποδείχθηκε ότι είναι αρκετά ανθεκτικές και εφαρμόστηκαν στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων π.χ. για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Andreou and Nikolelis 1998).

4.4.3 Λιπιδικές πολυμερισμένες μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρο

Αν και η έννοια της ακινητοποίησης μπορεί, κατ' αρχήν, να συσχετισθεί με την ενσωμάτωση ενός ιοντοφόρου ή φορέα φορτίου, ο όρος συνήθως περιορίζεται σε βιολογικά είδη όπως ένζυμα, κύτταρα και βακτήρια, τα οποία συμμετέχουν σε πολύ συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις με συγκεκριμένους αναλύτες, που οδηγούν σε πιο ευαίσθητα είδη. Με τον όρο *ακινητοποιημένο ένζυμο* εννοείται ένα ένζυμο που είναι προσκολλημένο ή προσδεμένο σε ένα αδιάλυτο μέσο στήριξης που ονομάζεται φορέας, χωρίς απώλεια της ενεργότητάς του ή που το ένζυμο μπορεί να περικλείεται μέσα στο φορέα ή ακόμη και συσσωματώματα από τα ίδια τα μόρια του ενζύμου να συνδέονται μεταξύ τους με μια διαδικτυωμένη (cross-linked) σύνδεση. Ο ρόλος του ενζύμου είναι να παράγει ένα είδος ικανό να δώσει ένα ποτενσιομετρικό σήμα.

Μια σειρά τεχνικών ακινητοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί και περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Davies et al., 1992). Αυτές είναι φυσικές τεχνικές, στις οποίες το ένζυμο παγιδεύεται και η κινητικότητα περιορίζεται από περιορισμούς διάχυσης και επίσης χημική δέσμευση στην οποία το ένζυμο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα πολυμερικό υπόστρωμα, όπου μερικές φορές η απλή φυσική προσρόφηση στην επιφάνεια της συσκευής είναι επαρκής. Άλλες τεχνικές είναι: (α) ο εγκλεισμός (β) η μικροενθυλάκωση (γ) η ομοιοπολική σύνδεση (δ) η διαδικτύωση (ε) ο ηλεκτροπολυμερισμός και (στ) αυτοσυγκρατούμενες μονοστοιβάδες.

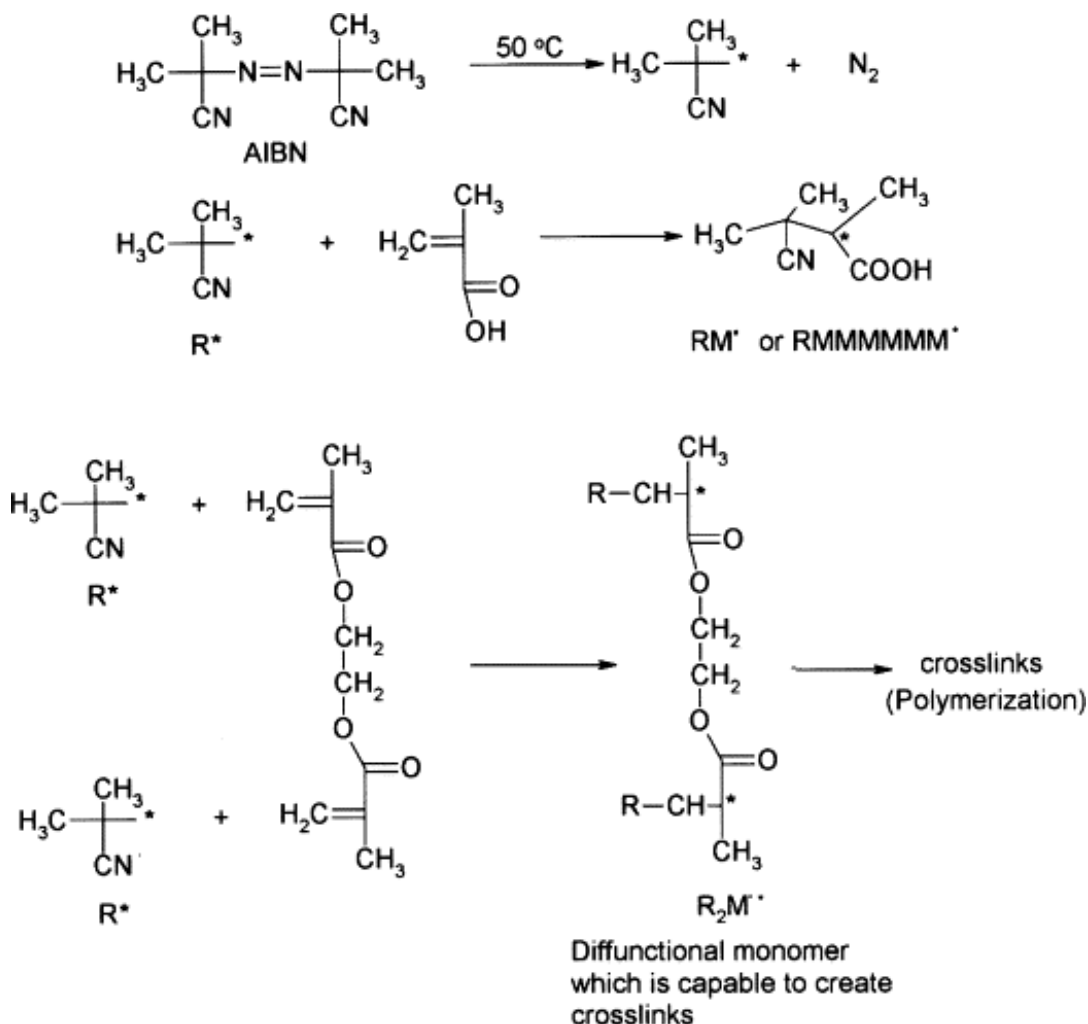
Ο **πολυμερισμός λιπιδίων** έχει ερευνηθεί ως στρατηγική για την ενίσχυση της σταθερότητας των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών. Στις αιωρούμενες επίπεδες λιπιδικές διπλοστοιβάδες, τα λιπίδια συνδέονται αποκλειστικά μέσω ασθενών ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα η ρήξη να συμβαίνει μέσα σε λίγες ώρες μετά το σχηματισμό της μεμβράνης. Η εγγενής αστάθεια, είναι ένας σημαντικός περιορισμός στη χρήση τους για μακροπρόθεσμη παρακολούθηση της δραστηριότητας τους σε συσκευές και συστοιχίες βιοαισθητήρα. Ένας αριθμός προσεγγίσεων που έχουν

χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση των λιπιδικών μεμβρανών περιγράφεται από Heitz κ.ά (*Heitz et al., 2010*) και περιλαμβάνει α) μικροσκοπικά ανοίγματα και μεμβράνες υδρογέλης οι οποίες πολυμερίζονται με UV ακτινοβολία β) μείγμα μονο-διακετυλενικών και μη πολυμεριζόμενων λιπιδίων γ) στοιβάδες γέλης αγαρόζης για ενθυλάκωση της διπλοστοιβάδας επεκτείνοντας τη διάρκεια ζωής της σε 3 εβδομάδες δ) ενθυλάκωση λιπιδικών μεμβρανών σε υδρογέλη διμεθακρυλικού πολυ (αιθυλενογλυκόλης) η οποία αγκυρωμένη σταθερά στο γυάλινο άνοιγμα αύξησε το χρόνο ζωής της μεμβράνης έως και 12 ημέρες ε) λιπιδικές αιωρούμενες μεμβράνες που παρασκευάστηκαν από δις-διενοϋλ-φωσφατιδυλοχολίνη και ο πολυμερισμός διασταυρούμενης σύνδεσης αύξησε τη διάρκεια ζωής τους από λίγες ώρες έως τρεις εβδομάδες.

Για την επιλογή ή το σχεδιασμό πολυμερικών μεμβρανών για εφαρμογές βιοαισθητήρων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τρεις ομάδες ιδιοτήτων (*Davies et al., 1992*). Η πρώτη ομάδα αφορά τη συμπεριφορά μεταφοράς του πολυμερούς και περιλαμβάνει τη διαπερατότητα, την εκλεκτικότητα και το διαμεμβρανικό δυναμικό. Αυτά είναι σημαντικά σε διαφορετική έκταση για διάφορους τύπους αισθητήρων (π.χ. ποτενσιομετρικοί αμπερομετρικοί, οπτικές ίνες). Η δεύτερη ομάδα ιδιοτήτων σχετίζεται με τον ρόλο της μεμβράνης ως μήτρα ακινητοποίησης. Αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός στους βιοαισθητήρες και μπορεί να χαρακτηριστεί με την ακινητοποίηση των ενζύμων σε διστρωματικές μεμβράνες. Η τρίτη ομάδα ιδιοτήτων σχετίζεται με τη συμπεριφορά της επιφάνειας και διεπαφής. Οι ιδιότητες αυτές είναι οι πιο δύσκολες να ελεγχθούν με πολλούς τρόπους χωρίς να διακυβεύονται άλλες λειτουργίες του πολυμερισμένης μεμβράνης. Παρόλα αυτά, τα φαινόμενα επιφάνειας και διεπιφάνειας είναι εξαιρετικά σημαντικά στη συνολική απόδοση ενός δεδομένου αισθητήρα, τόσο λόγω της συμβολής τους στα φαινόμενα μεταφοράς όσο και του ρόλου τους στον έλεγχο της βιοσυμβατότητας.

Με βάση την ακινητοποίηση ενζύμων έχουν γίνει επιστάμενες μελέτες και για την ακινητοποίηση λιπιδίων, με προεκτάσεις την ανάπτυξη σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών και επομένως βιοαισθητήρων που στηρίζονται σε αυτές. Η διαδικασία για την παρασκευή πολυμερισμένων σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών (*Nikolelis et al., 2006; Nikolelis et al., 2008*) περιλαμβάνει είτε τη θέρμανση του μείγματος λιπιδίων σε 60 ° C είτε ακτινοβολία υπεριώδους ακτινοβολίας Η ακτινοβολία προτιμάται πολύ καθώς επιτρέπει την ενσωμάτωση βιολογικών χαρακτηριστικών στο λιπιδικό μίγμα πριν από τον πολυμερισμό. Η ενσωμάτωση του βιολογικού στοιχείου μέσα σε μια διαμορφωμένη μεμβράνη επιτρέπει να εμφανιστούν υψηλού βαθμού μεταβολές στη διαμόρφωση της προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η προσρόφηση. Αντίθετα μια προ-διαμορφωμένη μεμβράνη επιτρέπει μόνο επιφανειακές τροποποιήσεις (*Nikoleli et al., 2018b*). Στην έρευνα που διεξήχθη από τους Νικολέλη και Μητροκότσα (*Nikolelis and Mitrokotsa, 2002*) έγινε συνδυασμός των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών που υποστηρίχθηκαν από υαλώδες φίλτρο μικροϊνών (*Nikolelis and Siontorou, 1995*) με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές που περιείχε λιπίδιο και παρείχε τη βάση για την παρασκευή σταθεροποιημένων λιπιδίων. Η παρατηρούμενη σταθερότητα των λιπιδικών μεμβρανών για αποθήκευση στον αέρα, ήταν πιθανώς αποτέλεσμα της χρήσης υποστρωμάτων με μειωμένες διαμέτρους ανοίγματος (*Nikolelis and Siontorou, 1995*) και δομής πολυμερισμού αυτών των μεμβρανών.

Για τη διαδικασία πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία (Nikolelis et al., 2006; Nikolelis et al., 2008): 0,8 mL ενός μείγματος που περιείχε 4% β/ο φωσφατιδυλοχολίνη αυγού σε n-εξάνιο αναμείχθηκαν με 0,07 mL μεθακρυλικού οξέος, 0,8 mL αιθυλενογλυκοδιμεθακρυλικού εστέρα, 8 mg 2,2'-αζωδισ - (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) και 1,0 mL ακετονιτρίλιου. Το μείγμα διαβιβάστηκε με άζωτο για ~1 min και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερήχους για 30 min. Για την παρασκευή των σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών 0,15 mL του μείγματος αυτού απλώθηκαν σε ένα μικροφίλτρο (δίσκος μικροφίλτρου GF/F με διάμετρο ~0,9 cm και ονομαστικό μέγεθος πόρου 0,7 μm) και ακολούθησε ακτινοβόληση του φίλτρου με το μείγμα χρησιμοποιώντας λυχνία δευτερίου UV. Για την παρακολούθηση της κινητικής της διεργασίας πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε Φασματομετρία Raman και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC). Ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε εντός 4 ωρών και οι παραγόμενες μεμβράνες ήταν σταθερές σε αποθήκευση στον αέρα για επαναλαμβανόμενες χρήσεις.



Σχήμα 4.10. Μηχανισμός πολυμερισμού (σχηματισμός σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης). Το μεθακρυλικό οξύ είναι το μονομερές προς πολυμερισμό, η διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη είναι ο διαδυσκτιωτής (crosslinker) και το 2,2'-αζωδισσοβούτυρονιτρίλιο (Azobisisobutyronitrile, AIBN) είναι ο εκκινητής (initiator).

Ο πολυμερισμός ακολουθεί το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών (σχ.4.9) και γίνεται σε τρία στάδια: Στο πρώτο στάδιο (έναρξη) ο εκκινητής AIBN, υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, σχηματίζει ελεύθερες ρίζες. Ακολουθεί αντίδραση των ελευθέρων ριζών με διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη η οποία είναι το δραστικό μονομερές και σχηματίζεται μια δραστική πρωταρχική ρίζα. Στο δεύτερο στάδιο (διάδοση πολυμερισμού) τα μόρια του μονομερούς προστίθενται με πολύ μεγάλη ταχύτητα στις πρωταρχικές ρίζες και σχηματίζονται πολλαπλές διακλαδώσεις. Στο τρίτο στάδιο (τερματισμός) ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα πολυμερές πλήρως διακλαδισμένο εντός του οποίου είναι εγκλωβισμένα τα λιπίδια. Το ακετονιτρίλιο προστίθεται στην παρασκευή του πολυμερούς, ως οργανικός διαλύτης, ενώ τα λιπίδια δεν συμμετέχουν στις αντιδράσεις πολυμερισμού, αλλά εγκλωβίζονται μέσα στο πολυμερές και σταθεροποιούνται με ισχυρούς ηλεκτροστατικούς δεσμούς.

4.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών

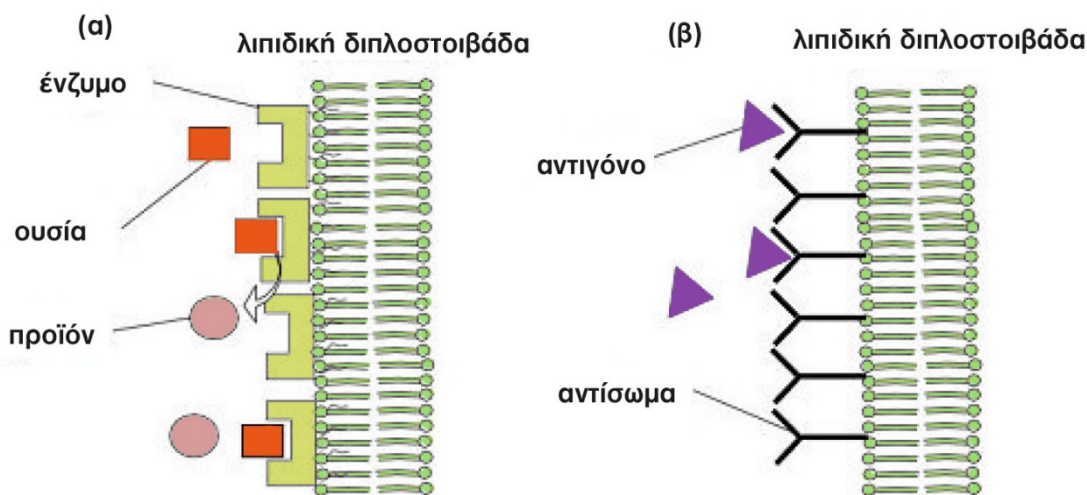
Οι φυσικές κυτταρικές μεμβράνες μοιάζουν σε πολλά χαρακτηριστικά με τις σύνθετες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες. Μια σύνθετη μεμβράνη πρέπει να αποτελείται από δύο επίπεδες λιπιδικές μονοστοιβάδες και να διαχωρίζει δύο υδατικές φάσεις ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Η διστρωματικότητα μιας μεμβράνης αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη χρήση της σε μικροσυσκευές και βιοαισθητήρες, η οποία αποδεικνύεται με τη δράση του αντιβιοτικού γραμισιδίνη (A, B ή C), όταν προστίθεται σε επίπεδα συγκέντρωσης περίπου 0,1 μM. Το πεπτίδιο αυτό μεταφέρει κατιόντα διαμέσου της μεμβράνης σχηματίζοντας διαύλους ιόντων (κανάλια) με αποτέλεσμα αύξηση της αγωγιμότητας. Οι σχηματιζόμενοι διάυλοι διαπερνούν τη λιπιδική στιβάδα και αυξάνουν την ιοντική της διαπερατότητα μόνο στην περίπτωση που η μεμβράνη είναι διστρωματική, καθ' ότι το μήκος τους είναι τέτοιο, που τους επιτρέπει να διασχίζουν μόνο διπλοστοιβάδες (*Nikolelis et al., 1996b; Siontorou et al., 1998*).

Η διπλοστοιβάδα ελέγχει την κινητικότητα των ιόντων μεταξύ των δύο υδατικών φάσεων, δηλαδή την τρέχουσα ροή (διαμεμβρανικό ρεύμα), ενώ παράγει διπολικό δυναμικό κάθετα προς το επίπεδο της μεμβράνης (*Warshaviak, Muellner and Chachisvilis, 2011*), παρά το υψηλό ενεργειακό φράγμα του εσωτερικού της μεμβράνης στη μετακίνηση μικρών ιόντων K^+ , Na^+ από το υδατικό διάλυμα, λόγω της χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς της υδρόφοβης περιοχής (*Dimitrov and Jain, 1984*). Τα ιόντα κινούνται προς την πολική περιοχή, όπου και συσσωρεύονται στην επιφάνεια της μεμβράνης δημιουργώντας ένα επιφανειακό φορτίο. Η αναπτυσσόμενη διαφορά δυναμικού από την παρουσία αυτών των ηλεκτρικών φορτίων δημιουργεί ένα ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο και εκτείνεται στην υδατική φάση (*Krull and Thompson, 1985*).

Γενικά κάθε ηλεκτροχημική αλλαγή στη διεπαφή μεταξύ της επιφάνειας της μεμβράνης και του διαλύματος μεταβάλλει το διπολικό δυναμικό, το επιφανειακό φορτίο ή τη συσσώρευση λιπιδίων (ή οποιοσδήποτε συνδυασμό των παραπάνω), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πόρων ή διαύλων, δηλαδή μικρά ελαττώματα μέσω του υδρόφοβου τμήματος, που επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων στην άλλη πλευρά της μεμβράνης.

Συνεπώς για να αυξηθεί το επιφανειακό φορτίο και το επιφανειακό δυναμικό, πρέπει να εφαρμοστεί ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, που θα επιτρέψει την ιοντική διαπερατότητα, δηλαδή τη συγκέντρωση κατιόντων στη μεμβρανική επιφάνεια και την απομάκρυνση των ανιόντων (Krull and Thompson, 1985). Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή τάσης 5-50 mV, όπου ένας μικρός αριθμός ιόντων διαπερνά τη μεμβράνη και δημιουργεί ένα μικρό αλλά μετρήσιμο ιοντικό ρεύμα $10^{-9} - 10^{-12} \text{ A/cm}^2$. Η ικανότητα της μεμβράνης να αποθηκεύει φορτία, οφείλεται στην ηλεκτροστατική έλξη των δύο μεσεπιφανειών και στην πόλωση που αναπτύσσεται στην περιοχή των αλκυλικών αλυσίδων. Η κίνηση των ιόντων λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια: (α) κατανομή του ιόντος στην πολική περιοχή (β) μεταφορά μέσα στην υδρόφοβη περιοχή με το μηχανισμό hopping, δηλαδή μετάβαση του ιόντος από πολική σε πολική ομάδα της αλκυλικής αλυσίδας και (γ) αποβολή στο υδατικό διάλυμα (Νικολέλη, 2015).

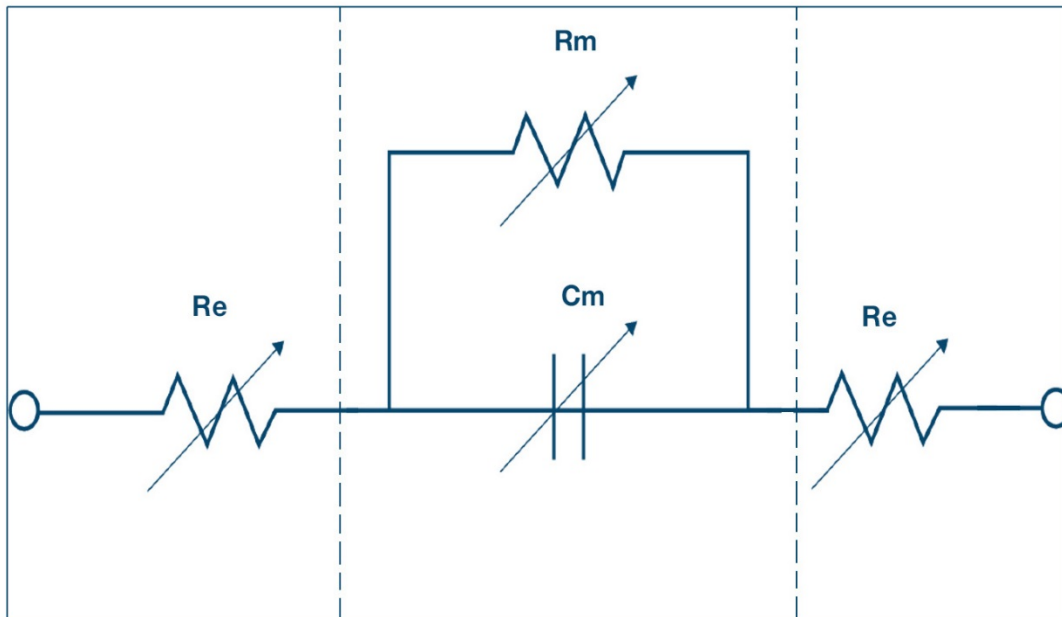
Τα μόρια των πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στη διέλευση των ιόντων, καθώς εμπλέκονται με αυτά και τα μεταφέρουν μέσα από την υδρόφοβη περιοχή δημιουργώντας ιοντικούς διαύλους (Yeagle, 2012). Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι παρά την απουσία πρωτεϊνικών διαύλων ή φορέων, υπάρχουν κάποιοι μηχανισμοί που μειώνουν το ενεργειακό φράγμα και επιτρέπουν μερική αγωγιμότητα (Yeagle, 2012). Η διπλοστοιβάδα είναι ο φυσικός ξενιστής για όλα τα είδη πρωτεϊνικών μονάδων, δηλαδή ένζυμα, αντισώματα και υποδοχείς και διατηρείται καλύτερα εντός ενός λιπιδικού βιομημητικού κατασκευάσματος. Η ακινητοποίηση αυτών των απλών βιομορίων, ή ακόμα πιο πολύπλοκων βιοχημικών συστημάτων, μπορεί να ακολουθήσει την απλή προσρόφηση ή πιο ακριβές και δυσκίνητες διαδικασίες χημικής δέσμευσης. Οι βιοχημικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στην επιφάνεια της μεμβράνης παράγουν τέτοιες ηλεκτροχημικές αλλαγές, όπου οποιοδήποτε σύστημα συγγένειας π.χ. ένζυμο υποστρώματος, αντιγόνο-αντίσωμα κ.ά. μπορεί να ανασυσταθεί μέσα σε αυτές τις λιπιδικές μεμβράνες για να δώσει μια διάταξη βιοαισθητήρα (Siontorou et al., 2017).



Σχήμα 4.11. Σχηματική παράσταση ορισμένων βιοχημικών συστημάτων για τη δημιουργία βιοαισθητήρων που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες με υποδοχείς (α) ένζυμα και (β) αντισώματα προσροφημένα στην επιφάνεια της μεμβράνης με στόχο ουσία/αναλύτη και αντίσωμα αντίστοιχα.

Η χρήση των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών ως μεταλλάκτες εκλεκτικών βιοχημικών αλληλεπιδράσεων, για την κατασκευή συστημάτων βιοαισθητήρων, βασίζεται στην ενσωμάτωση του υποδοχέα στη μεμβράνη, ο οποίος επιδρά εκλεκτικά με τον αναλύτη σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Η αλληλεπίδραση του αναλύτη με τον υποδοχέα, οδηγεί στην παραγωγή αναλυτικού σήματος, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναλύτη ή των προϊόντων (Yeagle, 2012; Siontorou et al, 1998; Nikolelis et al, 1999; Siontorou et al., 2000). Ο μηχανισμός παραγωγής του αναλυτικού σήματος, δηλαδή η επίδραση του συμπλόκου στο διαμεμβρανικό ρεύμα, επηρεάζεται από μεταβολές του επιφανειακού δυναμικού, του διπολικού δυναμικού και της μοριακής οργάνωσης και ρευστότητας. Το επιφανειακό δυναμικό είναι βασικός παράγοντας στην παραγωγή αναλυτικού σήματος και εξαρτάται από τα φορτισμένα στοιχεία της μεμβράνης (Boggs 1987; Nikolelis et al. 1991) και την αλληλεπίδραση υποδοχέα-διεγέρτη ή προϊόντων-διεγέρτη. Η δημιουργία πόρων και η ιοντική μεταφορά εξαρτώνται από το διπολικό δυναμικό, τη ρευστότητα και τη διαθεσιμότητα διάκενων στο εσωτερικό της μεμβράνης, οι οποίες με τη σειρά τους εξαρτώνται από το βαθμό των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (De Castillo et al., 1966; Boggs, 1987; Nikolelis et al., 1992; Nikolelis and Krull 1992b). Το ηλεκτροστατικό πεδίο της μεμβράνης μεταβάλλεται στην περιοχή γύρω από το σύμπλοκο και οι μεταβολές αυτές παρακολουθούνται ηλεκτροχημικά ως μεταβολές του διαμεμβρανικού ιοντικού ρεύματος ή με οπτικές μεθόδους (Siontorou et al., 2000).

Από ηλεκτρική άποψη, η επίπεδη λιπιδική διπλοστοιβάδα θεωρείται ένας πυκνωτής και μια αντίσταση σε παράλληλη διαμόρφωση. Η χωρητικότητα και η αντίσταση είναι οι πιο συχνά μετρούμενες ηλεκτρικές ιδιότητες μιας επίπεδης διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης. Μία πρόσθετη ηλεκτρική ιδιότητα είναι η τάση διάσπασης της μεμβράνης. Είναι μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας, όταν εξετάζεται η ηλεκτροδιάτρηση των πόρων (Polak, Mulej and Kramar, 2012). Η **χωρητικότητα** ορίζεται ως το μέτρο της ποσότητας του φορτίου Q , που πρέπει να μεταφερθεί από το ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα στο άλλο, ώστε να διαμορφωθεί διαφορά δυναμικού V στα άκρα της μεμβράνης: $C_m = Q/V$ (Heimburg, 2012). Η χωρητικότητα είναι ενδιαφέρουσα διότι, μεταξύ άλλων, σχετίζεται με τη δομή της μεμβράνης και αν αναλυθεί κατάλληλα μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το πάχος της μεμβράνης, τη διηλεκτρική σταθερά και τις σχετικές ηλεκτρικές διπλοστοιβάδες. Το σύστημα *ηλεκτρολύτης-μεμβράνη-ηλεκτρολύτης* προσομοιάζει με ένα ηλεκτρικό κύκλωμα πυκνωτή χωρητικότητας $C_m = \tau J_0 / V$, που εκφορτίζεται μέσω της αντίστασης R_m της μεμβράνης η οποία συνδέεται παραλλήλως με δύο άλλες εν σειρά αντιστάσεις R_e που αντιστοιχούν στις δύο πλευρές της μεμβράνης και παριστάνουν την αντίσταση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος (J_0 είναι το εξαγόμενο ρεύμα στην τιμή μηδέν και V η εφαρμοζόμενη τάση) (Nikolelis and Krull, 1992b).



Σχήμα 4.12. Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα διστρωματικής λιπιδικής στοιβάδας. R_m =αντίσταση της μεμβράνης, R_e =αντίσταση φέροντος ηλεκτρολύτη, C_m =ολική χωρητικότητα της μεμβράνης

Οι ηλεκτρικές ιδιότητες των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών συνήθως μετριοούνται με δύο τύπους μεθόδων: με σφικκτήρα-τάσης (voltage-clamp) και σφικκτήρα-ρεύματος (Kramar et al., 2010). Στην πρώτη μέθοδο, εφαρμόζεται ένα σήμα τάσης στη λιπιδική μεμβράνη και μετριέται το ρεύμα που ρέει μέσω της διπλοστοιβάδας. Στη δεύτερη μέθοδο, ένα σήμα ρεύματος εφαρμόζεται στη διπλοστοιβάδα και μετριέται η τάση κατά μήκος της μεμβράνης. Οι δύο μέθοδοι χρησιμοποιούν διαφορετικούς διαμορφωμένους παλμούς σημάτων, γραμμικά σήματα ανύψωσης και σήματα ημιτονοειδή ή τριγωνικά. Για παράδειγμα η χωρητικότητα μιας διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης τις περισσότερες φορές μετριέται χρησιμοποιώντας μια μέθοδο εκφόρτισης, μια μέθοδο μετατροπής χωρητικότητας σε περίοδο (δηλ.σειρά ορθογώνιων παλμών) ή ένα μετρητή LCR (Kramar et al., 2010; Polak, Mulej and Kramar, 2012). Ο μετρητής LCR είναι ένας τύπος ηλεκτρονικού εξοπλισμού δοκιμών που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αυτεπαγωγής (L), της χωρητικότητας (C) και της αντίστασης (R) ενός ηλεκτρονικού εξαρτήματος. Η απλούστερη μέτρηση της ηλεκτρικής χωρητικότητας είναι η εφαρμογή ενός βήματος τάσης των 25 mV μέσω των ηλεκτροδίων αναφοράς και κατά μήκος της μεμβράνης (Nikolelis and Krull, 1992b).

Μια λιπιδική μεμβράνη μπορεί να υπάρχει σε φάση γέλης ή υγρή φάση. Η φάση ορίζεται από την κινητικότητα των μορίων των λιπιδίων, η οποία αλλάζει με τη θερμοκρασία (Polak, Mulej and Kramar, 2012). Η κινητικότητα των μορίων των λιπιδίων είναι υψηλότερη στην υγρή φάση απ' ό τι στη φάση γέλης (πηκτής), και ως εκ τούτου, μια διστρωματική λιπιδική μεμβράνη σε υγρή φάση είναι σε υψηλότερη θερμοκρασία και σε φάση γέλης σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Με τη μετάβαση της φάσης μεταβάλλεται επίσης το πάχος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, και επειδή η χωρητικότητα της λιπιδικής

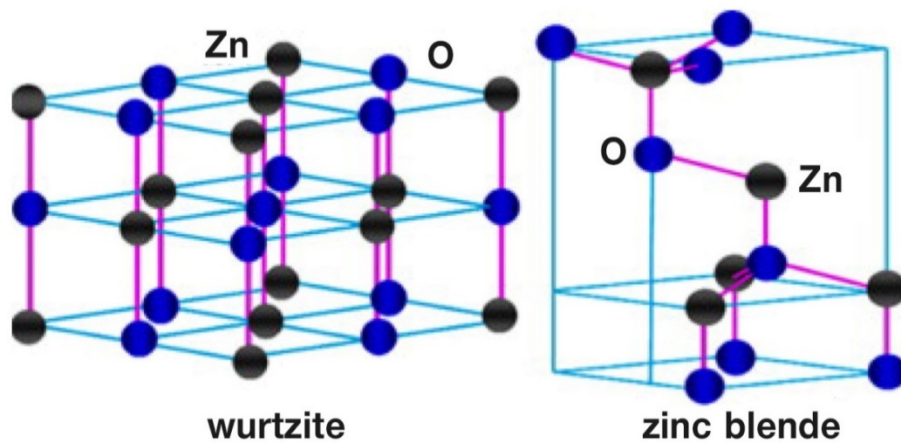
μεμβράνης είναι αντιστρόφως ανάλογη με το πάχος της, παρατηρούνται επίσης μεταβολές της χωρητικότητας της διπλοστοιβάδας

Η **αντίσταση** υπολογίζεται σύμφωνα με το νόμο του Ohm, ως ο λόγος της τάσης που εφαρμόζεται (ή μετρείται) στην λιπιδική μεμβράνη και του ρεύματος που ρέει διαμέσου αυτής. Η ειδική αντίσταση των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών χωρίς διαλύτη και των μελανών λιπιδικών μεμβρανών είναι παρόμοια ($\sim 10^8 \Omega / \text{cm}^2$) και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των δύο δομών. Η αντίσταση της μεμβράνης μπορεί να υπολογιστεί από το αντίστροφο της κλίσης των καταγραφών ρεύματος-τάσης που λαμβάνονται κατά την εφαρμογή μιας γραμμικής κεκλιμένης τάσης ως προς το χρόνο. Ο ρυθμός σάρωσης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην υπάρχει ουσιαστική συμβολή του χωρητικού ρεύματος. Η αντίσταση μπορεί επίσης να υπολογιστεί από τις τιμές σταθερής κατάστασης του ρεύματος, όταν εφαρμόζονται βήματα τάσης περίπου 20 mV στην περιοχή 0 έως 300 mV. Η τυπική τιμή αντίστασης της λιπιδικής μεμβράνης είναι της τάξεως των $10^7 \Omega / \text{cm}^2$ (Nikolelis and Krull, 1992b). Ενώ οι περισσότερες ιδιότητες των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών είναι παρόμοιες με τις ιδιότητες των φυσικών μεμβρανών, η αντίσταση των συνθετικών μεμβρανών είναι πολύ μεγαλύτερη κατά περίπου 1000 φορές. Αυτό είναι αποτέλεσμα της παρουσίας ουσιών μέσα στην κυτταρική μεμβράνη, όπως τα πεπτιδία και οι πρωτεΐνες, που προκαλούν μετατόπιση ιόντων με αποτέλεσμα μεταβολή των ιδιοτήτων αγωγιμότητας. Όταν οι ουσίες αυτές εισέλθουν στις συνθετικές μεμβράνες, μπορούν να μειώσουν την αντίσταση τους στην τιμή των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών.

Η παρατηρούμενη **σταθερότητα** στις πολυμερισμένες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες οφείλεται στη δομή των συγκεκριμένων μεμβρανών. Το λιπίδιο εγκλωβίζεται στο πολυμερές και συγκρατείται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Οι δυνάμεις αυτές συγκρατούν το λιπίδιο για πολλαπλή χρήση και μετά από παραμονή στον ατμοσφαιρικό αέρα, ενώ ταυτόχρονα του προσδίδουν παρόμοια απόκριση με αυτήν των ελεύθερα αιωρούμενων διστρωματικών μεμβρανών (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002). Αυτό συμβαίνει, διότι τα λιπίδια συνδέονται με ηλεκτροστατικούς δεσμούς και έτσι είναι δυνατό να γίνει μεταβολή στη φυσική δομή και κατάσταση των λιπιδικών μεμβρανών η οποία παρέχει μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση ουσιών (Nikoleli et al., 2010).

4.6 Λιπιδικές μεμβράνες σε διάφορα υποστρώματα ZnO

Το ZnO είναι ένα πολικό υλικό ημιαγωγού με δύο κρυσταλλογραφικά επίπεδα wurtzite και zinc-blende που έχουν αντίθετη πολικότητα και διαφορετικές ενέργειες χαλάρωσης επιφανείας, οι οποίες οδηγούν σε υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σχηματίζοντας διαφορετικής δομές π.χ. κατά μήκος του άξονα C με σχηματισμό κατακόρυφων δομών τύπου νανοδίσκων (Ashrafi and Jagadish, 2007). Ωστόσο, σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος, το ZnO κρυσταλλώνεται κανονικά σε μια δομή wurtzite με ένα εξαγωνικό πλέγμα που έχει δύο διασυνδεδετικά υποπλέγματα Zn^{2+} και O^{2-} με το ιόν του ψευδαργύρου να περιβάλλεται από τετραεδρικά ιόντα οξυγόνου και αντίστροφα (σχ. 4. 12)



Σχήμα 4.13. Σχηματική αναπαράσταση των κρυσταλλικών δομών ZnO. Εξαγωνική συμμετρία (wurtzite) και κυβική συμμετρία (Zinc blende).

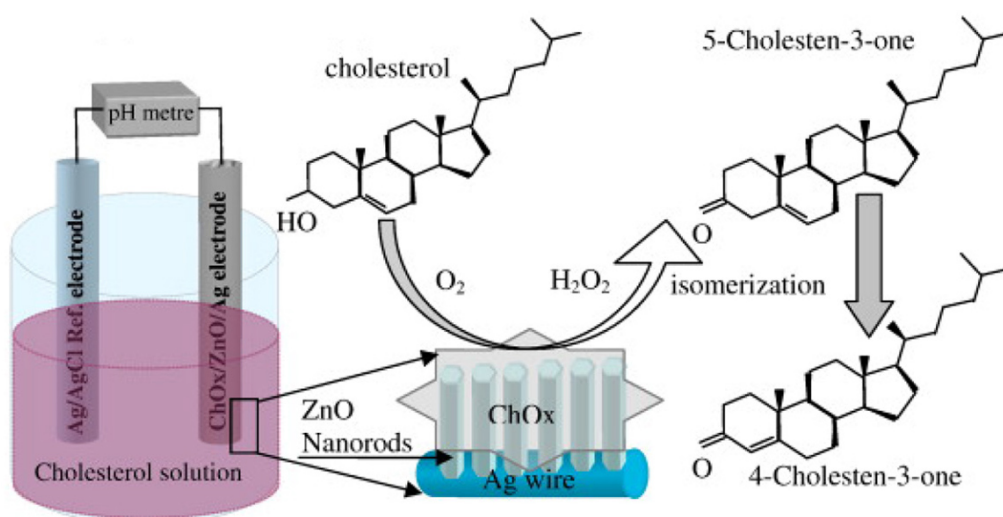
Η υψηλή καταλυτική αποτελεσματικότητα, η βιοσυμβατότητα και η χημική σταθερότητα σε φυσιολογικά περιβάλλοντα, καθώς και η μη τοξικότητα, καθιστούν τον ZnO ένα εξαιρετικό υλικό ανάπτυξης βιοαισθητήρων (Arya et al., 2012; Izyskaya et al., 2017). Η προσάρτηση συγκεκριμένων βιομορίων στις επιφάνειες ZnO είναι εξαιρετικά σημαντική για την πραγματοποίηση ενός βιοαισθητήρα βασισμένου στη μοριακή αναγνώριση. Εξίσου σημαντική είναι η δημιουργία μιας εξαιρετικά σταθερής και καλά ελεγχόμενης οργανικής διεπαφής π.χ. ένζυμα, για τη μεταφορά αποτελεσματικής μεταφοράς προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή και αναπαραγόμενη ευαισθησία. Οι στρατηγικές ακινητοποίησης των ενζύμων που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη βιολογική αναγνώριση των μορίων είναι σημαντικές για τη διατήρηση της βιολογικής τους δραστηριότητας. Το υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο του ZnO (~9,572) καθιστά δυνατή την απομόνωση των περισσότερων απαιτούμενων ενζύμων για την παρακολούθηση των αναλυτών σε διάφορα βιολογικά υγρά μέσω ηλεκτροχημικής έλξης (Izyskaya et al., 2017). Η ευκολία κατασκευής των βιοαισθητήρων με διαδικασίες χαμηλού κόστους αποδίδουν ένα ευρύ φάσμα νανοδομών, καθιστώντας τις μήτρες ZnO μία πολλά υποσχόμενη πλατφόρμα για χαμηλού κόστους βιοαισθητήρες (Arya et al., 2012).

Οι ερευνητές έχουν μελετήσει πλήθος νανοδομών ZnO για εφαρμογές βιοαισθητήρα που συντίθενται με διάφορες φυσικές και χημικές μεθόδους. Οι νανοδομές αυτές περιλαμβάνουν νανωσύρματα (nanowires), νανοδίσκους (nanodisks), νανοσωλήνες (nanotubes), νανοζώνες (nanobelts), νανοράβδοι (nanorods), νανοτοιχοί (nanowalls) καθώς και αρκετοί άλλοι τύποι διαφορετικών σχημάτων. Νανοπορώδη και νανοδομημένες μεμβράνες ZnO έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές βιοαισθητήρων (Izyskaya et al., 2017). Αυτή η ποικιλία νανοδομών ZnO έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των διαφόρων δομών που παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες. Για παράδειγμα ο Ali κ.ά. παρασκεύασαν συστοιχίες νανοσωλήνων από μονοκρυσταλλικό οξειδίου ψευδαργύρου (ZnO-NTs) με κοπή των νανοσωματιδίων ZnO κατά μήκος του άξονα c επί χρυσού υποστρώματος χρησιμοποιώντας μια διαδικασία υδατικής χημικής ανάπτυξης χαμηλής θερμοκρασίας (Ali et al., 2011). Οι συστοιχίες νανοσωλήνων έχουν ένα μεγαλύτερο εμβαδόν επιφάνειας (διατηρώντας το μέγεθος του αισθητήρα μικρό) και παρέχουν

μεγαλύτερη αποτελεσματική επιφάνεια με υψηλότερο λόγο επιφάνειας προς όγκο, σε σύγκριση με τις συστοιχίες νανοτοιχών (Izlymskaya et al., 2017).

Με βάση την ιδιότητα αυτή των νανοσωλήνων κατασκευάστηκε ένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας γλυκόζης, που βασίζεται σε ένζυμο, μέσω ακινητοποίησης της οξειδάσης της γλυκόζης με τη μέθοδο φυσικής προσρόφησης και σε συνδυασμό με επικάλυψη Nafion (Ali et al., 2011). Η ηλεκτροχημική απόκριση του αισθητήρα ευρέθη ότι είναι γραμμική σε μια σχετικά ευρεία λογαριθμική συγκέντρωση. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας έδειξε υψηλή ευαισθησία 69,12 mV / δεκάδα, ταχεία απόκριση (<από 4 s), καλή εκλεκτικότητα και αναπαραγωγικότητα για ανίχνευση της γλυκόζης.

Πολλές αναφορές υπάρχουν στη βιβλιογραφία (Tripathy and Kim, 2018) για χρήση νανοδομών ZnO, που έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρες στην ανίχνευση αρκετών αναλυτών, όπως ουρικού οξέος (Tzamtzis, et al., 2012; Ahmad et al., 2015), γλυκόζης (Kim et al., 2014), φαινολικών ενώσεων (Gu et al., 2009), DNA, L-γαλακτικού οξέος, ιόντων K^+ , Na^+ , Mg^{2+} κ.ά. Επίσης, το ZnO έχει χρησιμοποιηθεί ως ενζυματικός βιοαισθητήρας για ένζυμα οξειδοαναγωγής όπως η οξειδάση της χοληστερόλης (Israr et al., 2010), κορτιζόλη, το κυτόχρωμα c, η υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας (horseradish) και επιπλέον ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση H_2O_2 .



Σχήμα 4.14. Σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης της χοληστερόλης με τη χρήση βιοαισθητήρα (βιοηλεκτρόδιο) που αποτελείται από νανοσωλήνες ZnO, οξειδάση της χοληστερόλης (ChOx) και σύρμα Ag, με την πιθανή ηλεκτροχημική αντίδραση κοντά στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

Ο Al-Harda κ.ά με βάσει νανοσωματίδια ZnO κατασκεύασαν ένα μη ενζυματικό ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα H_2O_2 που βασίζεται σε νανοσωλήνες ZnO (Al-Harda et al., 2016). Οι νανοσωλήνες παρασκευάστηκαν μέσω της υδροθερμικής διαδικασίας και η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε πάνω σε ένα αγώγιμο υαλώδες υπόστρωμα. Ο βιοαισθητήρας αξιολογήθηκε με τη χρήση μετρήσεων ρεύματος-τάσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις H_2O_2 , που κυμαίνονται από 10 μM έως 700 μM με όριο ανίχνευσης 42 μM για το χαμηλό εύρος συγκεντρώσεων H_2O_2 και όριο ανίχνευσης 143,5 μM για το υψηλότερο εύρος συγκεντρώσεων H_2O_2 .

Πρόσφατα ένας άλλος μη ενζυματικός βιοαισθητήρας για H_2O_2 κατασκευάστηκε από νανοάνθη ZnO με πρόσμιξη κοβαλτίου (*Wang et al., 2018*). Μέσω μιας εύκολης υγρής χημικής οδού κατασκευάστηκε το ηλεκτρόδιο σύνθετης μεμβράνης $n-CoZnE$ και χαρακτηρίστηκε ηλεκτροχημικά. Λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας, της υψηλής αγωγιμότητας και της σταθερότητας της εγγενούς ιεραρχικής δομής, το ηλεκτρόδιο $n-CoZnE$ παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα όπως απλή διαδικασία παρασκευής, υψηλή ευαισθησία, γρήγορη απόκριση καθώς και καλή μηχανική και χημική σταθερότητα. Ο βιοαισθητήρας παρουσιάζει καλή αναλυτική απόδοση και τα υλικά παρασκευής του αποδεικνύονται κατάλληλα αισθητήρια για τους βιοαισθητήρες επόμενης γενιάς

Με τη χρήση πολυμερισμένων λιπιδικών μεμβρανών και συστοιχία νανοσωλήνων ZnO ο Tzamzis κ.ά κατασκεύασαν ένα νέο ποτενσιομετρικό αισθητήρα ουρικού οξέος με πολύ καλή απόδοση (*Tzamzis et al., 2012*). Τα νανοσωματίδια ZnO αναπτύχθηκαν σε ένα εύκαμπτο πλαστικό ηλεκτρόδιο επικαλυμμένο με χρυσό, με επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου ουρικής (uricase) στην λιπιδική μεμβράνη πριν από τον πολυμερισμό της. Για την παρασκευή της λιπιδικής μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε μείγμα δύο λιπιδίων του διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνης (DPPC) και του βρωμικού κετυλ-τριμεθυλοαμμωνίου (CTAB). Η μεμβράνη καθώς είναι θετικά φορτισμένη αυξάνει τη συγκέντρωση ουρικού οξέος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα η κλίση να διπλασιαστεί (από 32 mV/δεκάδα σε περίπου 61 mV/δεκάδα) δηλαδή αυξάνεται η ευαισθησία του αισθητήρα λόγω της ενσωμάτωσης του θετικά κατιονικού φορτισμένου λιπιδίου στο μείγμα της λιπιδικής μεμβράνης. Επιπλέον, η χρήση της λιπιδικής μεμβράνης διατηρεί τη δραστικότητα του ενζύμου για μεγαλύτερη χρονική περίοδο. Ο βιοαισθητήρας εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας σύστημα ανάλυσης έγχυσης ροής (FIA) είτε σε συνεχή είτε σε διακοπτόμενη ροή μεταξύ των ενέσεων. Η απόδοση του βιοαισθητήρα ουρικής / ZnO διερευνήθηκε σε ρυθμιστικά διαλύματα για τον προσδιορισμό του επιπέδου ουρικού οξέος και έδειξε καλά χαρακτηριστικά εκλεκτικότητας, γρήγορης απόκρισης, αναπαραγωγικότητας, γραμμικότητας, θερμικής σταθερότητας και αμελητέων ξένων παρεμβολών. Δεδομένου ότι ο αισθητήρας είναι χαμηλού κόστους με σημαντική αναπαραγωγικότητα μπορεί να προσφέρει μια εύκολη χρήση σε επιτόπιες κλινικές διαγνώσεις.

Η ίδια ομάδα εργασίας κατασκεύασε έναν πολύ ευαίσθητο βιοαισθητήρα ασβεστίου σε νανοσωλήνες ZnO βασισμένου σε λιπιδικές μεμβράνες (*Mitrou et al., 2014*). Το λιπιδικό φιλμ συντέθηκε από διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) και διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοκυκλικό οξύ (DPPA). Ένα μεγάλο εύρος δυναμικής λογαριθμικής ανίχνευσης (1×10^{-6} έως 1×10^{-3} M) για συγκεντρώσεις διαλύματος ασβεστίου με καμπύλη κλίσης ευαισθησίας περίπου 28 mV/δεκάδα απεικονίζει τη χρησιμότητα του βιοαισθητήρα. Επιπλέον, ο χρόνος απόκρισης εξόδου ήταν μικρότερος από 5s σε θερμοκρασία δωματίου και η αναπαραγωγικότητα του ηλεκτροδίου μικρότερη από 5%. Ο αισθητήρας εφαρμόζεται για ταχεία ανίχνευση ιόντων ασβεστίου σε μεταλλικά νερά με βασικά πλεονεκτήματα, ότι είναι φορητός έχει χαμηλό κόστος, μπορεί να αναγεννηθεί χωρίς αποτελέσματα μνήμης, δείχνει αξιοσημείωτη αναπαραγωγικότητα και είναι κατάλληλος για ανειδίκευτους χρήστες.

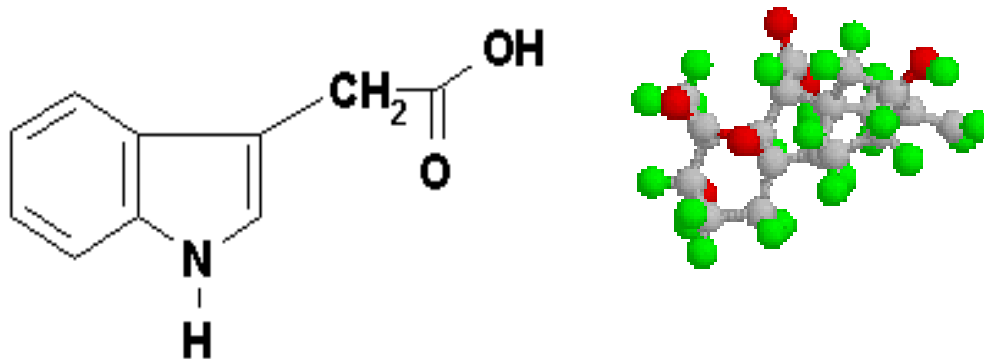
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5⁰

5 ΦΥΤΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ - ΑΥΞΙΝΕΣ

5.1 Εισαγωγή

Οι φυτικές ορμόνες ρυθμίζουν όλα τα στάδια ανάπτυξης από την εμβρυογένεση έως τη γήρανση. Μεταξύ των φυτικών ορμονών περιλαμβάνονται και οι αυξίνες.

Οι αυξίνες είναι οι ορμόνες που ελέγχουν την αύξηση, διεγείρουν την καμβιακή δραστηριότητα για σχηματισμό δευτερογενών αγγειακών ιστών και υποκινούν τη διαφοροποίηση των διαφόρων φυτικών οργάνων. Η κύρια φυσική αυξίνη που συναντάται στα φυτά είναι το ινδολο-3-οξικό οξύ (indolo-3-acetic acid, IAA).

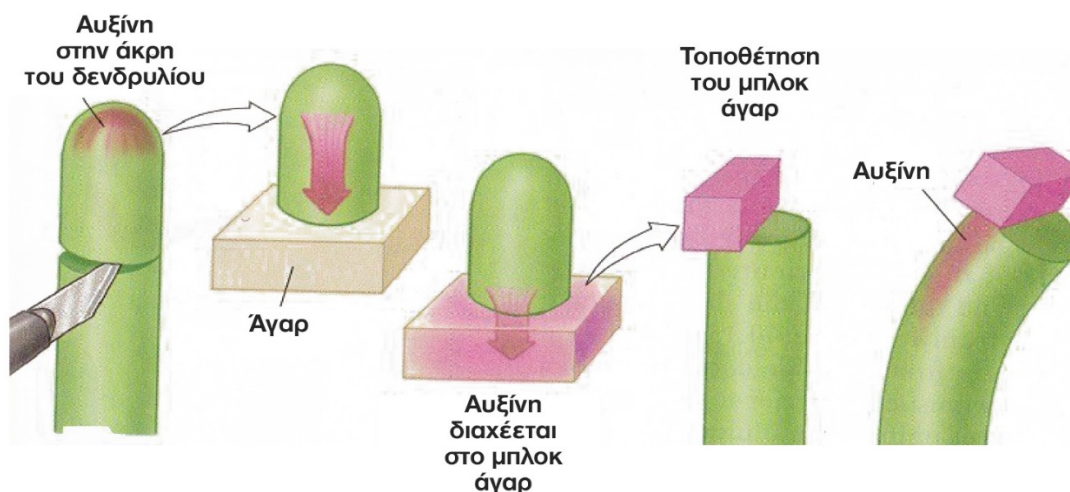


Σχήμα 5.1. Συντακτικός και στερεοχημικός τύπος της αυξίνης ινδολο-3-οξικό οξύ.

5.2 Φύση των αυξινών

Ο όρος αυξίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη “αυξείν» (αυχειν) που σημαίνει ανάπτυξη. Γενικά, ως αυξίνες χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που έχουν την ιδιότητα να συμβάλουν στην επιμήκυνση των κυττάρων στους μίσχους των φυτών και επίσης, αν μοιάζουν στη φυσιολογική τους δραστηριότητα με το ινδολο-3-οξικό οξύ που είναι η πρώτη απομονωθείσα αυξίνη. Οι αυξίνες συνήθως επηρεάζουν και άλλες διεργασίες εκτός από την επιμήκυνση των κυττάρων των στελεχών του φυτού, αλλά αυτό θεωρείται το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό για όλες τις αυξίνες (Raven, Evert and Eichhorn, 1992). Η αυξίνη (ήτοι το IAA) υπάρχει σε όλα τα μέρη ενός φυτού, αν και σε πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση σε κάθε θέση είναι μια κρίσιμη αναπτυξιακή πληροφορία, επομένως υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση μέσω του μεταβολισμού και της μεταφοράς. Το αποτέλεσμα είναι ότι η αυξίνη δημιουργεί «πρότυπα» των μέγιστων

συγκεντρώσεων και των ελαχίστων στο σώμα του φυτού, τα οποία με τη σειρά τους καθοδηγούν την περαιτέρω ανάπτυξη των αντίστοιχων κυττάρων και τελικά του φυτού στο σύνολό του. Ιστορικά η γνώση της δομής και της δραστηριότητας της πρώτης ταυτοποιημένης ομάδας φυτικών ορμονών, οι αυξίνες, προέκυψε στις αρχές του 20ου αιώνα από την απομόνωση μιας από τις κυρίαρχες ενδογενείς αυξίνες, το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και τη μέτρηση της καμπυλότητας και επιμήκυνσης των βλαστών και ριζών των δενδρυλλίων σε απλά βιολογικά πειράματα (Tivendale and Cohen, 2015). Συγκεκριμένα ο 1926 ο Fritz Went απομόνωσε μια φυτική ουσία με την τοποθέτηση ένα μπλοκ από άγαρ κάτω από άκρες ενός κολεόπυλλου βρώμης για μια χρονική περίοδο ολίγων ωρών. Μετά την τοποθέτηση του άγαρ, οι μίσχοι συνέχισαν την ανάπτυξη τους (σχ. 5.2).



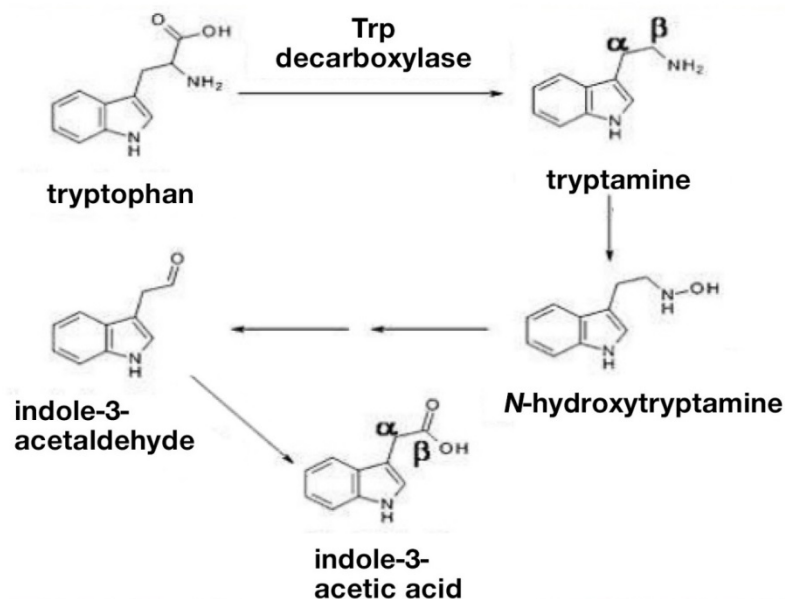
Σχήμα 5.2. Η *in vitro* βιοδοκιμή απόδειξε την παρουσία του IAA ως τη κύρια φυσική ορμόνη των φυτών. Τμήμα (μπλοκ) άγαρ που περιέχει συγκέντρωση αυξίνης επηρεάζει την αναπτυξιακή κατεύθυνση ενός κολεόπυλλου βρώμης, με τις καμπυλώσεις των στελεχών να είναι ανάλογες με την ποσότητα της αυξητικής ουσίας στο άγαρ (δοκιμή καμπυλότητας *avena*).

Η αυξίνη ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα από κυτταρικές αποκρίσεις οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για τη μορφογένεση και την ανάπτυξη των φυτών. Η ορμόνη αυτή εμπλέκεται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες όπως την εμβρυογένεση την οργανογένεση, το σχηματισμό του καρπού, τη διαφοροποίηση του αγγειακού ιστού, το σχηματισμό του επικοτυλιακού άγκιστρου και την κυριαρχία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού. (Kepinski and Leyser, 2005). Οι αυξίνες είναι επίσης κρίσιμοι ρυθμιστές της δημιουργίας επαγωγικής τυχαίας ρίζας, δηλαδή σχηματισμό ριζών από μη ριζικούς ιστούς που πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις (Steffens and Rasmussen, 2016). Το IAA είναι μία από τις κύριες ενδογενείς αυξίνες, αλλά είναι σχετικά ασταθής, σε αντίθεση με το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA) και το 1-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) που είναι εξωγενείς αυξίνες, αλλά είναι περισσότερο σταθερές και κινούνται πιο αποτελεσματικά με πολικές μεταφορές. Οι αυξίνες NNA και IBA χρησιμοποιούνται συνήθως για να παρακινήσουν το ρίζωμα της τυχαίας ρίζας κατά την κλωνική διάδοση από μοσχεύματα ή βλαστούς καλλιέργειας ιστών (Pereira, Eleuterio and Canhoto, 2015).

5.3 Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της αυξίνης

Το IAA παρομοιάζει χημικώς με το αμινοξύ τρυπτοφάνη το οποίο είναι γενικά αποδεκτό, ότι είναι το μόριο από το οποίο προέρχεται το IAA (*Salisbury and Ross, 1992*). Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί για να εξηγηθεί αυτή η μετατροπή:

α) Η τρυπτοφάνη υποβάλλεται σε αποκαρβοξυλίωση με αποτέλεσμα το σχηματισμό τρυπταμίνης. Η τρυπταμίνη στη συνέχεια μετασχηματίζεται σε N-υδροξυτρυπταμίνη η οποία οξειδώνεται και απομακρύνεται για να παραχθεί ινδολο-3-ακεταλδεΐδη. Αυτό το μόριο περαιτέρω οξειδώνεται προς παραγωγή του ινδολοξικού οξέος.



Σχήμα 5.3. Σχηματική παράσταση παραγωγής ινδολο-3-οξικού οξέος από τρυπτοφάνη.

β) Η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε ινδολο-πυριτικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης μετάθεσης (transamination). Το ινδολο-πυριτικό οξύ μετά με αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπεται σε ινδολο-ακεταλδεΐδη. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την οξείδωση της ινδολο-ακεταλδεΐδης με αποτέλεσμα το ινδολο-3-οξικό οξύ (ινδολοξικό οξύ).

γ) Ο τρίτος αυτός μηχανισμός εξελίχθηκε πρόσφατα με το IAA να μπορεί να παραχθεί μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου από την τρυπτοφάνη. Αυτός ο μηχανισμός είναι ελάχιστα κατανοητός, αλλά έχει αποδειχθεί χρησιμοποιώντας μεταλλάξεις τρυπτοφάνης [trp (-)]. Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι, σε μερικά φυτά, αυτός ο μηχανισμός είναι στην πραγματικότητα ο προτιμώμενος μηχανισμός βιοσύνθεσης IAA. Ένας άλλος μηχανισμός ελέγχου περιλαμβάνει την παραγωγή συζυγών μορίων τα οποία μοιάζουν με την ορμόνη αλλά είναι ανενεργά. Ο σχηματισμός συζυγών μορίων μπορεί να είναι ένας μηχανισμός αποθήκευσης και μεταφοράς της δραστικής αυξίνης IAA μέσω ενζύμων υδρολάσης. Τα ένζυμα υδρολάσης που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση του IAA είναι πιο δραστικά σε νέους ιστούς όπως βλαστούς μίσχων, φυλλώδη φύλλα και φρούτα.

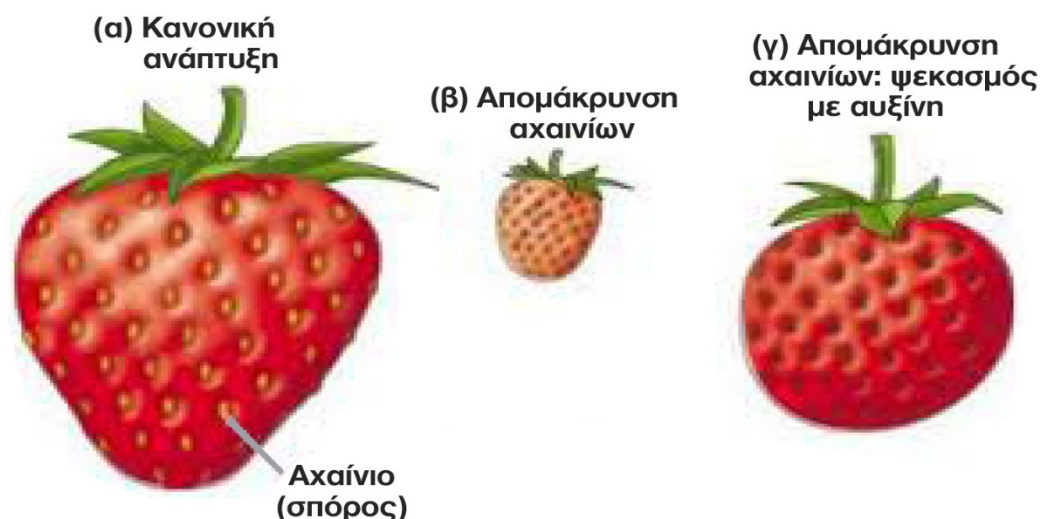
Η αποικοδόμηση της αυξίνης περιλαμβάνει επίσης δύο προτεινόμενους μηχανισμούς: α) Η οξείδωση του IAA με οξυγόνο που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της καρβοξυλομάδας και της 3-μεθυλενοξινδόλης ως το κύριο προϊόν διάσπασης. Η οξειδάση

IAA είναι το ένζυμο που καταλύει αυτή τη δραστηριότητα, ενώ αφήνει ανεπηρέαστα τα συζυγή προϊόντα και τις συνθετικές αυξίνες. β) Ο άνθρακας 2 (C-2) του ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορεί να οξειδωθεί καταλήγοντας σε οξινδολο-3-οξικό οξύ, και ο C-3 μπορεί επίσης να οξειδωθεί επιπροσθέτως του C-2 καταλήγοντας σε διοϊνδολο-3-οξικό οξύ.

5.4 Λειτουργίες της αυξίνης

Οι σπουδαιότερες αποκρίσεις που προκαλεί η αυξίνη είναι οι ακόλουθες: (Raven, Evert and Eichhorn, 1992; Salisbury and Ross, 1992).

- Αύξηση των κυττάρων (διεγείρει την αύξηση του όγκου των κυττάρων και την αύξηση του στελέχους).
- Διεγείρει την έναρξη της ρίζας στα μοσχεύματα στελεχών και την ανάπτυξη των πλευρικών ριζών στην καλλιέργεια ιστών.
- Κυριαρχεί στην κορυφή, εμποδίζοντας την αύξηση των πλάγιων οφθαλμών.
- Μεσολαβεί στην τροπιστική απόκριση της κάμψης του φυτού ως απάντηση στη βαρύτητα και το φως.
- Καθυστερεί τη γήρανση των φύλλων.
- Μπορεί να αναστείλει ή να προωθήσει (μέσω διέγερσης με αιθυλένιο) την απόπτωση των φύλλων και των καρπών.
- Μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό καρπών (καρπόδεση και αύξηση καρπών) καθώς και ανάπτυξη σε μερικά φυτά.
- Διαφοροποιεί τους αγωγούς ιστών που οδεύουν προς τον ηθμό και το ξυλώδες μέρος.

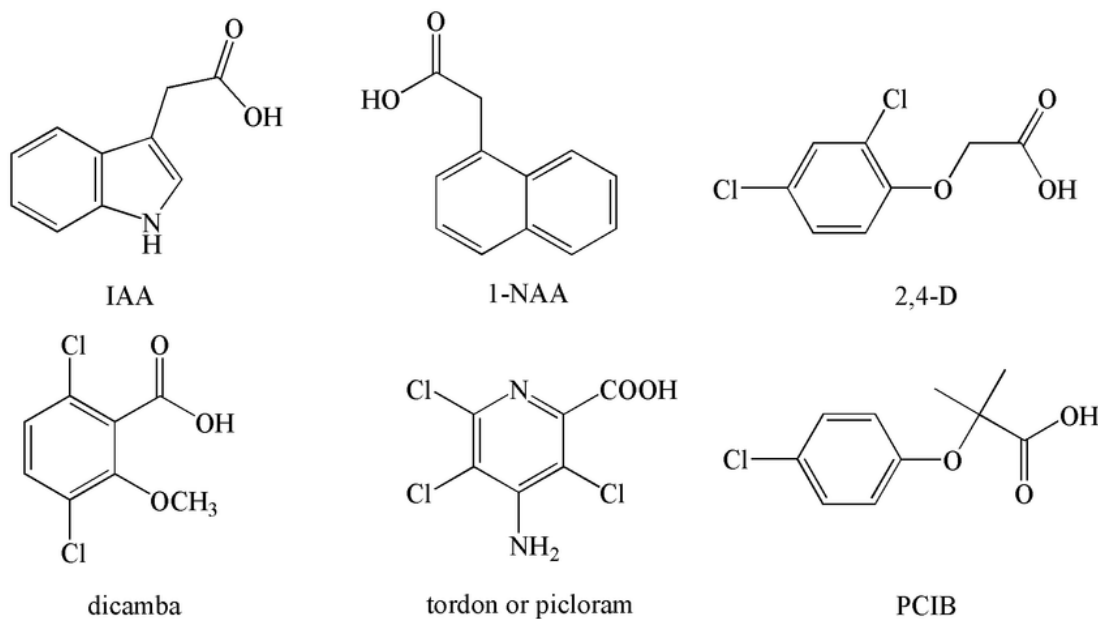


Σχήμα 5.4. Επίδραση της αυξίνης στην ανάπτυξη της φράουλας. Τα αχαινία παράγουν αυξίνη για την ανάπτυξη του καρπού. Όταν αφαιρεθούν η φράουλα δεν αναπτύσσεται. (Το αχαίνιο είναι ένας μικρός και ξηρός αδιάρρηκτος καρπός που περικλείει μόνο ένα σπέρμα).

(<http://www.phytohormones.info/auxins.htm>)

Οι αυξίνες που έχουν παρασκευαστεί συνθετικά και έχουν παρόμοιες δράσεις με αυτές της φυσικής αυξίνης είναι:

- 3-indole-butyric acid (IBA), προκαλεί το σχηματισμό τυχαίων ριζών σε μοσχεύματα και βελτιώνει την καρπόδεση. Εμπορικό όνομα Radicin κ.ά.
- naphthyl acetic acid (NAA) το οποίο προκαλεί αραίωμα των καρπών. Διεγείρει το σχηματισμό ανθέων και καρπών, ενώ εμποδίζει την καρπόπτωση πριν τη συγκομιδή. Εμπορικό όνομα Arponon.
- β-naphthoxy-acetic acid (β-NOA), το οποίο βελτιώνει την καρπόδεση. Εμπορικό όνομα Ορτομόνη (Ortomoni) κ.ά.
- 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), το οποίο αυξάνει την καρπόδεση, εμποδίζει την καρπόπτωση, καθυστερεί τη γήρανση και αυξάνει τη ριζοβολία και το σχηματισμό ανθέων.
- (2,4,5-T trichlorophenoxy)-acetic acid (2,4,5-T), το οποίο βελτιώνει τη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Εμπορικό όνομα Fruitone-A.
- (2,4,5-T trichlorophenoxy)-propionic acid (2,4,5-T), το οποίο παρεμποδίζει την καρπόπτωση και προάγει την ωρίμανση των καρπών. Εμπορικό όνομα Fruitone-T.
- 2-(3-chlorophenoxy)-propionamide (3-CPA), το οποίο προκαλεί αραίωμα καρπών και βελτιώνει την απόδοση. Εμπορικό όνομα Fruitone.
- p-chlorophenoxy acetic acid (4-CPA), χρησιμοποιείται για βελτίωση της καρπόδεσης. Εμπειρικό όνομα PCPA-Marks, Χαρακίνη, Χαραμπές.
- N-1-naphthyl-acetamide (NAAm), το οποίο προκαλεί αραίωμα των καρπών και αυξάνει τη ριζοβολία των μοσχευμάτων.
- β-N-m-totyl-phthalamic acid το οποίο έχει αυξινική δράση.



Σχήμα 5.5. Χημικές δομές μερικών συνθετικών αυξινών και δομή του IAA.

5.5 Τεχνικές ποσοτικού προσδιορισμού αυξινών

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της αυξίνης στα φυτά και η παρουσία ενώσεων που παρεμποδίζουν την ανίχνευση, έχουν καταστήσει την ποσοτική ανάλυση των αυξινών μια πρόκληση για την αναλυτική χημεία.

5.5.1 Βιοδοκιμές

Η πρώτη ενδογενής ποσοτικοποίηση της αυξίνης διεξήχθη με απλές βιοαναλύσεις στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Οι βιοδοκιμές βασίστηκαν στη διάχυση της αυξίνης του δείγματος, που συνελήφθη σε ένα μπλοκ άγαρ, από κολεόπτριλα των σπόρων *Avena sativa* L. Ο βαθμός της καμπυλότητας των κολεόπτριλων σχετιζόταν με τη συγκέντρωση της αυξίνης στο αρχικό δείγμα. Μια μέθοδος εκχύλισης, που περιγράφεται ως απλή μέθοδος διάχυσης, βασίστηκε στη διάχυση της αυξίνης από τον φυτικό ιστό στα μπλοκ άγαρ και αποδείχθηκε κατάλληλη για τον προσδιορισμό της παραγωγής και της κίνησης της αυξίνης από μικρά δείγματα. Ακολούθησε σειρά μεθόδων εκχύλισης από το φυτικό ιστό με σταδιακή βελτιστοποίηση του συνδυασμού διαλυτών εκχύλισης. Χρησιμοποιήθηκαν χλωροφόρμιο και υδροχλωρικό οξύ, αιθέρας και οξικό οξύ, αιθανόλη, αιθέρας και υδροχλωρικό οξύ, χλωροφόρμιο και αιθανόλη. Η εκχύλιση με αιθανόλη, χλωροφόρμιο και νερό έδωσε στη συνέχεια τις καλύτερες εκτιμήσεις περιεκτικότητας σε αυξίνη με μόλις μια περίοδο εκχύλισης 15 λεπτών. Ωστόσο, οι μέθοδοι βιοπροσδιορισμού σταδιακά κατέστησαν απαρχαιωμένες, λόγω της χαμηλής ειδικότητάς τους στην αυξίνη, των ασαφών αποτελεσμάτων και των μακρών χρόνων που απαιτούνται για τη βιολογική δοκιμή παρασκευής (*Stuepp et al., 2017*).

5.5.2 Ανοσοδοκιμασίες

Η εμφάνιση της ανοσοκυτταροχημείας οδήγησε σε τεχνικές ανοσοδοκιμασίας για την ποσοτικοποίηση των αυξινών οι οποίες βασίζονται στην παραγωγή πρωτεϊνών (αντισωμάτων) που αναγνωρίζουν και συνδέονται με ειδικές ενώσεις δηλαδή αντιγόνα. Τα αντισώματα αυξάνονται, για παράδειγμα, με τη σύζευξη του IAA με αλβουμίνη βόειου ορού, ακολουθεί έγχυση του συζευγμένου IAA σε κουνέλια, συλλογή δείγματος αίματος από τα ζώα και έλεγχος των αντιορών ως προς τη συγγένεια και την εξειδίκευση τους με ενώσεις της αυξίνης (*Gussakovskaya and Blintsov, 2007*). Η αποτελεσματικότητα των ανοσοδοκιμασιών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτικών ορμονών βελτιώθηκε σημαντικά με τις τεχνικές ραδιοανοσοπροσδιορισμού (radioimmunoassay, RIA) και ενζυματικού ανοσοπροσδιορισμού (enzyme immunoassay, EIA). Η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) είναι μια ευαίσθητη μέθοδος που επιτρέπει τη μέτρηση των φυσιολογικών επιπέδων (10^{-9} g = 1ng) του IAA στους ιστούς των φυτών και στηρίζεται στον ανταγωνισμό στις θέσεις δέσμευσης αντισωμάτων μεταξύ ενός αντιγόνου π.χ. δείγμα IAA και ενός ραδιοεπισημασμένου αναλόγου π.χ. IAA με άτομα υδρογόνου που έχουν αντικατασταθεί από τρίτιο (*Pengelly and Meins, 1997*). Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι επιτρέπουν επίσης

τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης αυξίνης, ως μια τροποποιημένη RIA, όπου το ραδιενεργό επισημασμένο IAA αντικαθίσταται από μια αυξίνη συνδεδεμένη με ένα ένζυμο, γενικά μια αλκαλική φωσφατάση. Οι απαιτήσεις της RIA για ραδιενεργά επισημασμένες ορμόνες και μετρητή σπινθηρισμού καθιστούν αυτή την τεχνική μη πρακτική σε ορισμένα εργαστήρια (Hedden, 1993). Η ανοσολογική δοκιμασία ενζύμου (EIA) αποτελείται από μια σειρά αντιδράσεων μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων που οδηγούν στη δέσμευση ενός επισημασμένου με ένζυμο αντισώματος σε μια στερεή φάση. Η ενζυμο-συνδεδεμένη μέθοδος ανοσοαπορρόφησης ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay,) βελτίωσε την αξιοπιστία ποσοτικοποίησης της ενδογενούς αυξίνης και σε σχέση με τη RIA παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και απαιτεί πιο φθηνό εξοπλισμό (Hedden, 1993).

5.5.3 Χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας

Οι φυσικοχημικές τεχνικές, όπως η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), επέτρεψαν την ποσοτικοποίηση των ορμονών και των μεταβολιτών τους με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια, ευαισθησία και ταχύτητα (Barkawi, 2008; Tivendale and Cohen, 2015). Οι χρωματογραφικές μέθοδοι μπορούν να παρέχουν εξαιρετικό διαχωρισμό ορμονών και όταν συνδυάζονται με φασματομετρία μάζας, επιτρέπουν το χαρακτηρισμό ενώσεων από πολλαπλές ορμονικές κατηγορίες στο ίδιο δείγμα (Bai and Liu, 2010).

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί όλο και περισσότερο για να αποκλειστούν διάφορες παρεμποδίσσεις από άλλες ενώσεις, ενώ παράλληλα αυξάνουν την ακρίβεια ποσοτικοποίησης της αυξίνης. Η HPLC ήταν μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης στην ανάλυση αυξίνης (Aral et al., 2013). Ο συνδυασμός GC ή LC με MS υπήρξε μια σημαντική πρόοδος στην ανάλυση του IAA και άλλων αυξινών (Li et al., 1992; Matsuda et al., 2005; Cao et al., 2016), με LC-MS/MS να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για την ανάλυση των αυξινών απευθείας χωρίς προηγούμενο καθαρισμό ή με ελάχιστο καθαρισμό. Μειονέκτημα των μεθόδων αυτών για την ποσοτικοποίηση της ορμόνης αποτελεί το υψηλό κόστος των αναλυτικών οργάνων το οποίο αποτελεί εμπόδιο που περιορίζει την ευρεία χρήση τους στην έρευνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

6 ΤΟΞΙΝΕΣ

6.1 Εισαγωγή

Μια τοξίνη, είναι μια δηλητηριώδης ουσία που παράγεται μέσα σε έμβια κύτταρα ή οργανισμούς, που δημιουργούνται συνήθως με τεχνητές διαδικασίες. Τα δηλητήρια είναι τοξίνες που εγχύονται (π.χ. από ένα δάγκωμα αράχνης, τσίμπημα μέλισσας κ.ά.) ή εισπνέονται ή πέπτονται σε επαρκείς ποσότητες, για να προκαλέσουν πρόβλημα στον οργανισμό. Ο όρος «τοξίνη» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον οργανικό χημικό Ludwig Brieger (1849-1919) (*Brade et al., 1999*). Οι τοξίνες μπορούν να είναι μικρά μόρια, πεπτίδια ή πρωτεΐνες, που προκαλούν ασθένειες σε επαφή ή απορρόφηση από σωματικούς ιστούς που αλληλεπιδρούν με βιολογικά μακρομόρια, όπως ένζυμα ή κυτταρικοί υποδοχείς. Ως προς την τοξικότητά τους, οι τοξίνες ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό η οποία κυμαίνεται από μικρές (όπως το τσίμπημα μελισσών) μέχρι θανάσιμες (όπως η τοξίνη αλλαντίασης).

6.2 Ορολογία

Οι τοξίνες συχνά διακρίνονται από τους άλλους χημικούς παράγοντες μέσω της μεθόδου παραγωγής τους. Αυτό απλά σημαίνει, ότι είναι ένα βιολογικά παραγόμενο δηλητήριο. Στο παρελθόν υπήρξε μια συνεχιζόμενη ορολογική διαμάχη μεταξύ του NATO και του Συμφώνου της Βαρσοβίας για το αν θα ονομαζόταν τοξίνη ένας βιολογικός ή χημικός παράγοντας, με το NATO να επιλέγει το βιολογικό παράγοντα και το Σύμφωνο της Βαρσοβίας, όπως και οι περισσότερες άλλες χώρες του κόσμου, το χημικό παράγοντα. Σύμφωνα με μια ανασκόπηση της Διεθνούς Επιτροπής του Ερυθρού Σταυρού της Σύμβασης για τα βιολογικά όπλα, **«οι τοξίνες είναι δηλητηριώδη προϊόντα οργανισμών σε αντίθεση με τους βιολογικούς παράγοντες που είναι άψυχοι και δεν μπορούν να αναπαραχθούν»** και «από την υπογραφή της σύστασης του οργανισμού δεν υπήρξαν διαφωνίες μεταξύ των μερών σχετικά με τον ορισμό των βιολογικών παραγόντων ή τοξινών» (*Goldblat, 1997*). Σύμφωνα με τον Κώδικα των Ηνωμένων Πολιτειών ο όρος «τοξίνη» σημαίνει **«το τοξικό υλικό ή το προϊόν φυτών, ζώων, μικροοργανισμών (συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, ιών, μυκήτων, ρικέτσιων ή πρωτόζωων) ή μολυσματικών ουσιών ή ένα ανασυνδυασμένο ή συνθετικό μόριο, ανεξαρτήτως προέλευσης και μεθόδου παραγωγής»**.

Μια άλλη ορολογία των τοξινών τις συνδέει με τη θέση του σώματος, όπου αυτές έχουν πιο έντονο αποτέλεσμα:

- Η **αιμοτοξίνη**, η οποία προκαλεί καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση).
- **Φωτοτοξίνη**, η οποία προκαλεί επικίνδυνη φωτοευαισθησία.

Οι τοξίνες επίσης μπορούν να ταξινομηθούν στις **εξωτοξίνες**, που εκκρίνονται από έναν οργανισμό ή **ενδοτοξίνες**, που απελευθερώνονται κυρίως με τη λύση των βακτηριδίων (δηλαδή το κύτταρο λύει και απελευθερώνει την τοξίνη στο περιβάλλον).

Μια εξωτοξίνη είναι μια τοξίνη που εκκρίνεται από τα βακτήρια και προκαλεί βλάβη στον ξενιστή (host) καταστρέφοντας τα κύτταρα ή διαταράσσοντας τον φυσιολογικό κυτταρικό μεταβολισμό (Rayan and Ray, 2004). Είναι πολύ επικίνδυνη και προκαλεί σημαντική ζημιά στον ξενιστή. Τα αρνητικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια παράγουν κυστίδια στον έξω χώρο των κυτταρικών μεμβρανών, που περιέχουν ενδοτοξίνη λιποπολυσακχαρίτη. Ως αποτέλεσμα, αυτά συνεισφέρουν στις διεργασίες ευκαρυωτών με την κυκλοφορία κυψελίδων μεμβράνης, η οποία είναι αρκετά δραστική στη διασύνδεση ξενιστή-παθογόνου. Ορισμένες γνωστές εξωτοξίνες είναι: η τοξίνη αλλαντίασης που παράγεται από *Clostridium botulinum*, η τοξίνη που παράγεται κατά της διφθερίτιδας από το *Corynebacterium diphtheriae* και η τετανοσπασμίνη που παράγεται από το *Clostridium tetani*. Οι τοξικές ιδιότητες των περισσότερων εξωτοξινών αδρανοποιούνται με θερμότητα ή χημική επεξεργασία προς παραγωγή ενός τοξοειδούς (μια χημικώς εξουδετερωμένη τοξίνη από τα βακτήρια που δεν μπορεί να δώσει ασθένεια). Τα τοξοειδή διατηρούν την αντιγονική τους ειδικότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αντιτοξινών, όπως στην περίπτωση των τοξοειδών διφθερίτιδας και τετάνου, όπου χρησιμοποιούνται ως εμβόλια. Οι εξωτοξίνες είναι ευαίσθητες σε αντισώματα που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Πολλές εξ αυτών, όμως, είναι τοξικές και μπορεί να καταστούν θανατηφόρες για τον ξενιστή, πριν το ανοσοποιητικό σύστημα αμυνθεί εναντίον τους. Για το λόγο αυτό οι αντιτοξίνες (αντισώματα που περιέχονται σε αντιορό) ενέσονται για να παράξουν παθητική ανοσία.

Οι ενδοτοξίνες είναι γνωστές ως λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και είναι μεγάλα μόρια τα οποία αποτελούνται από ένα λιπίδιο και έναν πολυσακχαρίτη που συντίθεται από Ο-αντιγόνο, εξωτερικό πυρήνα και εσωτερικό πυρήνα συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό. Οι ενδοτοξίνες βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

6.3 Βιοτοξίνες

Ο όρος "**βιοτοξίνη**" χρησιμοποιείται μερικές φορές για να επιβεβαιώσει με σαφήνεια τη βιολογική προέλευση αυτών των τοξινών. Οι βιοτοξίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε μυκητιακές, μικροβιακές, φυτικές ή ζωικές βιοτοξίνες. Οι τοξίνες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς είναι σημαντικοί παράγοντες λοίμωξης δράσης (μολυσματοκότητας) που ευθύνονται για τη μικροβιακή παθογένεια ή και για την αποφυγή της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή (Proft, 2009). Οι βιοτοξίνες είναι εξαιρετικά πολύπλοκες. Για παράδειγμα, το σαλιγκάρι κώνος (cone snail) παράγει ένα ισχυρό θανατηφόρο δηλητήριο, που περιέχει δωδεκάδες μικρές πρωτεΐνες με κάθε μια απ'

αυτές να στοχεύει σε ένα συγκεκριμένο νευρικό κανάλι ή υποδοχέα. Οι βιοτοξίνες στη φύση έχουν τη λειτουργία της θήρευσης (predating), όπως η αράχνη, το φίδι, ο σκορπιός, η μέδουσα, η σφήκα και τη λειτουργία της άμυνας όπως η μέλισσα, το μυρμήγκι, ο τερμίτης, η σφήκα και το δηλητήριο-βέλος του βατράχου.

6.3.1 Τύποι βιοτοξινών

Μερικοί από τους πιο γνωστούς τύπους βιοτοξινών περιλαμβάνουν:

1. **Κυανοτοξίνες**, που παράγονται από κυανοβακτήρια
2. **Δινοτοξίνες**, παραγόμενες από δινοφλαγγέλτες
3. **Νεκροτοξίνες** που προκαλούν νέκρωση στα κύτταρα και καταστρέφουν όλους τους τύπους ιστών. Οι νεκροτοξίνες εξαπλώνονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Στον άνθρωπο, οι δερματικοί και μυϊκοί ιστοί είναι πιο ευαίσθητοι στις νεκροτοξίνες.
 - Οι οργανισμοί που διαθέτουν νεκροτοξίνες είναι:
 - Η χρώματος καφέ αράχνη ερημίτης ή "fiddleback" αράχνη του γένους *Loxosceles*
 - Οι περισσότεροι κροταλίες και οχιές (έχιδνες) υπάγονται στην κατηγορία σκληρογλύφων φιδιών με ιοβόλα δόντια, όπου με τα δαγκώματά τους παράγουν φωσφολιπάση και διάφορες πρωτεάσες σερίνης, όπως η τρυψίνη.
 - Δηλητηριώδη φίδια με κοινή ονομασία puff adder του γένους *Bitis arietans* που παράγουν μέσω των ιδιαίτερα μακριών δοντιών τους ένα ισχυρό, αν και βραδείας δράσης κυτταροτοξικό δηλητήριο
 - Νεκρωτική γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από διάφορα είδη Gram-θετικών κόκκων: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* και *enterococcus*. Ο *Streptococcus pyogenes* παράγει μια τοξίνη σχηματισμού πόρων. Δημιουργεί μια λοίμωξη του περιτόναιου που έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του μαλακού ιστού του σώματος και είναι γνωστή στα αγγλικά ως «ασθένεια που τρώει τη σάρκα».
4. **Οι νευροτοξίνες** πρωτίστως επηρεάζουν το νευρικό σύστημα των ζώων. Αυτές κυρίως αποτελούνται από τοξίνες διαύλου ιόντων που διαταράσσουν την αγωγιμότητα του διαύλου. Οι οργανισμοί που διαθέτουν νευροτοξίνες περιλαμβάνουν:
 - Τη μαύρη αράχνη («μαύρη χήρα», widow) του γένους *Latrodectus*
 - Οι περισσότεροι των σκορπιών
 - Το χτύπημα μέδουσας
 - Τα φίδια της οικογένειας Elapidae
 - Το σαλιγκάρι κώνος (cone snail)
 - Το χταπόδι με τους μπλε δακτυλίους του γένους *Haralochlaena*
 - Τα δηλητηριώδη ψάρια (venomous fish)

- Οι βάτραχοι
 - Το είδος κοραλίων *Palgthoa* που παράγει παλιτοξίνη, μια ιδιαίτερα τοξική λιπαρή αλκοόλη (πολυυδροξυλιωμένη και μερικώς ακόρεστη με μακρυά ανθρακική αλυσίδα με 8 διπλούς δεσμούς).
 - Ποικίλοι διαφορετικοί τύποι αλγών, κυανοβακτήρια και δινοφλαγγελάτες (φυλογενετικές ομάδες των φυκών)
5. **Οι μυοτοξίνες** είναι μικρά, βασικά πεπτίδια που βρίσκονται στα δηλητήρια φιδιών και σαύρας και προκαλούν βλάβη των μυϊκών ιστών με μηχανισμό μη ενζυματικού υποδοχέα.
6. **Οι κυτοτοξίνες** είναι τοξικές στο επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Τυπικά παραδείγματα αυτών των τοξινών είναι:
- Η ρικίνη (ricin) είναι μια φυσικά απαντώμενη λεκτίνη (μια πρωτεΐνη δέσμησης υδατανθράκων) που παράγεται στους ελαιούχους σπόρους του φυτού κάστωρ. Είναι πολύ ισχυρή τοξίνη με μέση θανατηφόρο δόση (LD50) περίπου 22 μικρογραμμάρια ανά κιλό σωματικού βάρους
 - Η απιτοξίνη ή δηλητήριο της μέλισσας είναι ένα πικρό άχρωμο υγρό που περιέχει πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν τοπική φλεγμονή (έχει ομοιότητες με την τοξίνη της τσουκνίδας)
 - Η T-2 μυκοτοξίνη είναι ένα φυσικό παραπροϊόν από ορισμένα είδη τοξικών μανιταριών (μύκητας *Fusarium spp.*)
7. **Οι αφλατοξίνες** παράγονται από ορισμένους μύκητες που εμφανίζονται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων. Η αφλατοξίνη B1 είναι αναγνωρισμένη καρκινογόνος ουσία. Όταν η αφλατοξίνη B1 απορροφάται από βοοειδή, εκκρίνεται ως υδροξυλιωμένος μεταβολίτης της αφλατοξίνης M1 (AFM1). Λόγω της καρκινογένεσης του AFM1, ο προσδιορισμός αυτής της τοξικής ένωσης στο γάλα παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον (*De Boevere and Van Peteghem, 1993*). Το επίπεδο δράσης για το AFM1 στο γάλα έχει καθοριστεί σε 0,5 ppb (δηλαδή 1,5 nM) από την U.S. Food and Drug Administration. Ωστόσο, αυτό το επίπεδο σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες είναι νομοθετικά χαμηλότερο (δηλαδή < 0,15 nM) (*Qian, Yasei and Yang, 1984*).
8. **Η τοξίνη της χολέρας** (CT) είναι ένα βακτηριακό πολυπεπτίδιο και συμπεριλαμβάνεται σε μια ομάδα βιολογικά δραστικών ενώσεων που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα γαγγλιοσίδια σε φυσικές και τεχνητές μεμβράνες. Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της τοξίνης της χολέρας και του γαγγλιοσιδίου GM1 προκαλεί την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (*Fishman, 1986*), ένα φαινόμενο που θεωρείται κλασικό παράδειγμα για τη μεταγωγή σήματος μέσω βιολογικών μεμβρανών (*Wisnieski and Bramhall, 1981*). Το γαγγλιοσίδιο είναι ένα συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης του πλάσματος που ρυθμίζει τα γεγονότα μεταγωγής του κυτταρικού σήματος και φαίνεται να συγκεντρώνεται σε λιπιδικές σχεδίες (rafts). Η τοξίνη της χολέρας έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζει διαύλους σε τεχνητές διπλοστοιβάδες που περιέχει γαγγλιοσίδιο GM1 (*Borochoy-Neori, Yavin and*

Montal, 1984). Η σύνδεση της τοξίνης με γαγγλιοσίδια έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μακρομοριακών και επιφανειακών συμπλεγμάτων (Borochov-Neori, Yavin and Montal, 1984; Lazarovici, Yanai and Yavin, 1987). Η CT είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που εκκρίνεται από το βακτήριο *Vibrio cholerae* και μπορεί να προκαλέσει επιδημική νόσο και να οδηγήσει σε ταχεία αφυδάτωση, οξέωση και στο θάνατο σε λίγες ώρες. Τα περισσότερα από τα περιστατικά χολέρας αναφέρονται σε υποανάπτυκτες χώρες και εκτιμάται ότι η CT προκαλεί περίπου 120.000 θανάτους ετησίως. Η CT έχει καταστεί μια πολύ σημαντική ένωση στα όπλα εναντίον της βιοτρομοκρατίας και έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον των ερευνητών για την ανάπτυξη ταχέων, επιλεκτικών, ευαίσθητων και φορητών βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της (Lazarovici, Yanai and Yavin, 1987; Reed, Mattai and Shipley, 1987; Nikoleli, Nikolelis, and Tzamtzis, 2011).

9. **Θαλάσσιες Βιοτοξίνες.** Η παρουσία φυτοπλαγκτικών βιοτοξινών σε θαλάσσια οικοσυστήματα έχει αναγνωριστεί ως πρόβλημα για την ανθρώπινη υγεία, την οικολογία των οργανισμών και την παγκόσμια οικονομία. Η εκτίμηση της έκτασης και της σοβαρότητας των προβλημάτων απαιτεί κατανόηση ορισμένων παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι η ταυτοποίηση και τα επίπεδα συγκέντρωσης των βιοτοξινών. Από τα οστρακοειδή, τα διηθηματοφάγα μύδια και στρείδια είναι οργανισμοί που επιδέχονται τη βιοσυσσώρευση των τοξινών, λόγω της ακινησίας και του μηχανισμού τροφοληψίας τους (διήθηση του νερού), αποτελώντας έτσι τον κύριο φορέα μεταφοράς βιοτοξινών στην τροφική αλυσίδα. Από τις πιο γνωστές ομάδες θαλάσσιων τοξινών που έχουν περιγραφεί είναι:

- **Amnesic Shellfish Poisoning toxins (ASP)**, βιοτοξίνες που μπορεί να προκαλέσουν αμνησιακή δηλητηρίαση με πρώτο εκπρόσωπο το ντομοϊκό οξύ.
- **Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins (DSP)**, βιοτοξίνες που μπορεί να προκαλέσουν διαρροϊκή δηλητηρίαση, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αρκετές υποομάδες, όπως η υποομάδα του οκαδαϊκού οξέος (OA και δινοφυσυστοξίνες: DTX1, DTX2 και DTX3), πικτινοτοξίνες (PTX1 και PTX2), αζασπειροξέα (AZA1, AZA2 και AZA3) και γεστοτοξίνες (YTX, 45-OH-YTX, ομο-YTX). Οι δύο τελευταίες υποομάδες θεωρούνται ξεχωριστές ομάδες, επειδή οι AZA είναι πολύ τοξικές και δεν παράγουν διαρροϊκά συμπτώματα.
- **Paralytic Shellfish Poisoning toxins (PSP)**, βιοτοξίνες που μπορεί να προκαλέσουν παραλυτική δηλητηρίαση ακόμη και το θάνατο με κύριο εκπρόσωπο την ομάδα σαξιτοξίνης (STX).

Ένας ορισμένος αριθμός μεθόδων αναφοράς για τον προσδιορισμό θαλάσσιων βιοτοξινών σε οστρακοειδή περιγράφονται στους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2074/2005/EK, 1664/2006/EK, 1244/2007/EK). Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν βιολογική δοκιμή σε ποντικούς (mouse bioassay, MBA) για STX και λιποφιλικές τοξίνες, βιοδοκιμασία σε αρουραίους (rat bioassay, RBA) για λιποφιλικές τοξίνες, HPLC με ανιχνευτή φθορισμού για STX τοξίνες (AOAC, 2005) και ντομοϊκό οξύ ("μέθοδος Lawrence"), καθώς και μεθόδους που βασίζονται σε αντισώματα (ELISA)

για τον έλεγχο του ντομοϊκού οξέος (domoic acid). Ενώ οι βιολογικές δοκιμές για την ανάλυση των λιποφιλικών τοξινών δεν αποτέλεσαν ποτέ αντικείμενο διεργαστηριακής διαδικασίας επικύρωσης, οι άλλες επικυρώθηκαν και τυποποιήθηκαν ως επίσημες μέθοδοι AOAC που σήμερα χρησιμοποιούνται για την επαλήθευση της συμμόρφωσης με τους επίσημους κανονισμούς. Παρά την ισχυρή και διεθνή ανάγκη για καλύτερες μεθόδους προσδιορισμού αυτών των τοξινών, πέρα των χρωματογραφικών HPLC-FLD (AOAC, 2011) και LC/MS/MS (Fang *et al.*, 2004; Harju *et al.*, 2015) δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμες νέες επίσημες επικυρωμένες μέθοδοι. Το υψηλό κόστος του εξοπλισμού σε συνδυασμό με τις χρονοβόρες τεχνικές παραγοντοποίησης μετά τη στήλη (post column derivatization) και η αδυναμία παραγωγής αποτελέσματος επί τόπου, έδωσε χώρο στην έρευνα για κατασκευή μικροσκοπικών βιοαισθητήρων, χαμηλού κόστους που δίνουν γρήγορα και επί τόπου αξιόπιστα αποτελέσματα προσδιορισμού STX, όπως είναι η προτεινόμενη μέθοδος στην παρούσα έρευνα (Bratakou *et al.*, 2017).

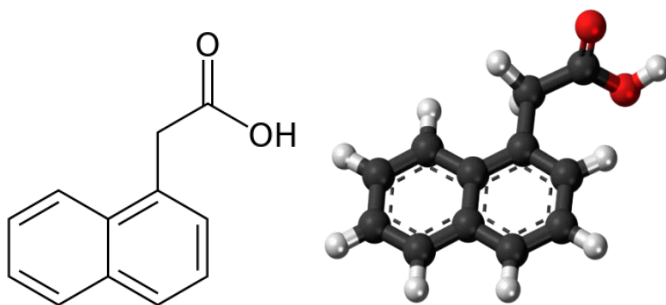
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7⁰

7 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΟΥ ΝΑΦΘΑΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΗΛΕΚΤΟΔΙΟ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

7.1 Εισαγωγή

Το 1-ναφθαλινοξικό οξύ, κοινώς συντομογραφούμενο ως NAA (1-Naphthalene acetic acid), είναι μια οργανική ένωση με τύπο $C_{10}H_7CH_2CO_2H$. Αυτό το άχρωμο στερεό είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες και διαθέτει μια ομάδα καρβοξυμεθυλίου συνδεδεμένη στην "θέση 1" του ναφθαλενίου. Το NAA είναι μια συνθετική φυτική ορμόνη, ανήκει στην οικογένεια των αυξίνων (auxins) και αποτελεί συστατικό πολλών εμπορικών φυτικών προϊόντων που καλλιεργούν ριζοβόλα φυτά. Είναι ένας παράγοντας ριζοβολίας (εκκίνηση σχηματισμού ρίζας) και χρησιμοποιείται για την βλαστική (αγενή) αναπαραγωγή των φυτών από μοσχεύματα ιστών και φύλλων. Αν και η τοξικότητα του NAA είναι χαμηλή (Morshed et al., 2005), η υποβάθμιση του δεν είναι ακόμη σαφής (Hac-Wydro and Flasiński, 2015). Ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA, Environmental Protection Agency) το 2007 εξέδωσε μια τροποποίηση του πρότυπου καταχώρισης που υπήρχε από το 1981 για τα όρια ανοχής αλάτων, εστέρων και ακεταμιδίων του NAA, μειώνοντας κατά δέκα φορές τα αποδεκτά υπολειμματικά όρια σε μήλα, αχλάδια και κυδώνια (U.S. EPA, 2007).



Σχήμα 7.1. Συντακτικός και στερεοχημικός τύπος ναφθαλινοξικού οξέος: Ονομασία κατά IUPAC: 2-(1-Naphthyl)acetic acid. Ιδιότητες: Χημικός τύπος $C_{12}H_{10}O_2$, μοριακή μάζα 186,210 g/mol, σημείο τήξεως 135 °C, οξύτητα (pKa) 4,24, διαλυτότητα στο ύδωρ 0,42 Kg/m³.

Όταν εφαρμόζονται υπό μορφή ψεκάσμου οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ 20-100 mg/mL, ανάλογα με τον τύπο του φυτού (Fernandez-Arguelles et al., 2005). Οι αυξίνες που εκκρίνονται από φυτά είναι συνήθως περίπου 1-100 ng/g νωπού βάρους (Shishova and Lindberg, 2010; Ma et al., 2008). Είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται και να ελέγχονται τα επίπεδα NAA στα τρόφιμα, τα λαχανικά και τα φρούτα. Υπάρχουν πολλές

αναλυτικές τεχνικές για την ανάλυση του NAA, συμπεριλαμβανομένης της φασματοφωτομετρίας (Ma et al., 2008), της ηλεκτροκινητικής τριχοειδούς χρωματογραφίας μικροκυψέλης (Liu, Zhong and Lu, 2002), του φωσφορισμού σε θερμοκρασία δωματίου (Fernandez-Arguelles et al., 2005; Zhu, Wang and Wang, 2005), της αεριοχρωματογραφίας (Du and Xu, 2002) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Li et al., 2015). Αξιολόγηση αυτών των αναλυτικών τεχνικών έχει αναφερθεί πρόσφατα (Fernandez-Arguelles et al., 2005).

Αρχικές μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις του NAA με υποδοχέα εκχύλισμα πρωτεΐνης - αυξίνης ακινητοποιημένο σε λιπιδικές μεμβράνες από το κολεόπτילו σύστημα του καλαμποκιού (Thompson and Krull, 1983; Krull, 1987), έδειξαν ασήμαντες αλλαγές διαπερατότητας της μεμβράνης και πολύ αργή κινητική προσρόφηση NAA. [(coleoptile=θήκη που προστατεύει το νεαρό άκρο του βλαστού μέχρι να εκβλαστήσει από το έδαφος]. Ωστόσο, αυτές οι λιπιδικές μεμβράνες σχηματίστηκαν από ένα λιπιδικό διάλυμα σε η-δεκάνιο και την τεχνική της ψύκτρας που είναι γνωστό ότι παράγει εξαιρετικά ασταθείς διπλοστοιβάδες. Πρόσφατες μελέτες σχετικές με τις μονοστοιβάδες φωσφολιπιδίων (Harc-Wydro and Flasiński, 2015) έδειξαν μικρή μόνο διείσδυση του NAA στην πολική λιπιδική περιοχή, που οφείλεται στις στερεοχημικές ιδιότητες του δακτυλίου ναφθαλινίου, αλλά και ελπιδοφόρες ιδιότητες δέσμευσης του υποδοχέα για την κατασκευή αισθητήρων.

Σημαντική πρόοδος στο σχεδιασμό και τη σταθεροποίηση των πλατφορμών διπλής στιβάδας λιπιδίων έχει επιτευχθεί από την ερευνητική ομάδα Νικολέλης κ.ά (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002; Nikolelis et al., 2004; Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005) που παρέχουν στους βιοαισθητήρες λιπιδικών μεμβρανών επαρκή βαθμό ανθεκτικότητας, ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευση π.χ. ντοπαμίνης και εφεδρίνης (Nikolelis et al., 2004; Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005) και να διευκολύνουν την κατασκευή τους. Αυτές οι σταθεροποιημένες πλατφόρμες έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα NAA (Nikolelis et al., 2008a; Nikolelis et al., 2008b). Οι βιοαισθητήρες αυτοί είναι οι μόνοι βιοαισθητήρες για το NAA που έχουν εμφανιστεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα. Δυστυχώς, η ακριβής ανάλυση των ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών (plant growth regulators, PGRs) καθίσταται μια πολύ δύσκολη εργασία. Για παράδειγμα, οι PGR υπάρχουν στα φυτά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, έναντι ενός ευρέος φάσματος άφθονων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Έτσι, οι αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών πρέπει να είναι ταυτόχρονα εξαιρετικά εκλεκτικές και ευαίσθητες (Li et al., 2015). Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθεί ένας βιοαισθητήρας NAA που να είναι φορητός και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον επί τόπου προσδιορισμό αυτής της φυτορμόνης.

Ο πρώτος υποδοχέας της αυξίνης αναγνωρίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 σε κλάσματα μεμβράνης των κολεόπτιλων του φυτού ζέα (zea) (Hertel, Thomson and Russo, 1972), όπου συντέθηκε **πρωτεΐνη με δεσμευμένη αυξίνη 1** (auxin-binding protein 1, ABP1). Μετά από δεκαετίες έρευνας για τη μοριακή βιολογία των αυξινών, έχουν διευκρινισθεί ορισμένες πτυχές της σχετικής οδού σηματοδότησης (Kelley and Riechers, 2007). Εκτός από την ABP1 που προκαλεί επέκταση κυτταρικού τοιχώματος, η **απόκριση αναστολέα μεταφοράς 1** (transport inhibitor response 1, TIR1) και οι συναφείς με **την αυξίνη πρωτεΐνες F-box** (auxin F-box, AFB) σηματοδοτούν την έναρξη εισαγωγής της γονιδιακής έκφρασης

(Dharmasiri, Dharmasiri and Estelle, 2005; Kepinski and Leyser, 2005; Dharmasiri, 2005). Παρ' ότι η ABP1 έχει μελετηθεί εκτενώς (Napier, David and Perrot-Rechenmann, 2002; Badescu and Napier, 2006) και είναι το πιθανότερο ένας υποδοχέας αυξίνης (Dharmasiri, Dharmasiri and Estelle, 2005), ο δρόμος σηματοδότησης του TIR1 είναι καθορισμένος στις λεπτομέρειες πολύ καλύτερα (Badescu and Napier, 2006). Η σύγκριση των δεδομένων δέσμησης ABP1 και SCF^{TIR1} αποκαλύπτει ορισμένες ομοιότητες και μερικές διαφορές (Badescu and Napier, 2006). Η συγγένεια του ABP1 προς το 1-NAA αναφέρεται ποικιλοτρόπως μεταξύ 50 και 200 nM, ενώ η συγγενεία του με το φυτικά παραγόμενο ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) είναι πολύ χαμηλότερη (5-10 μM). Αντίθετα, το TIR1 ευνοεί το φυσικό συνδέτη (ligand) υποδεικνύοντας, ότι η εκλεκτικότητα των δύο θέσεων σύνδεσης διαφέρει, ωστόσο η συγγένεια που δείχνει κάθε θέση για τον ευνοούμενο συνδέτη είναι παρόμοια. Αμφότερες οι πρωτεΐνες συνδέουν σχετικά ασθενώς την ισχυρή αυξίνη 2,4-D και καμία δεν δεσμεύει τρυπτοφάνη ή βενζοϊκό οξύ. Αντιστρόφως, τα χαρακτηριστικά σύνδεσης των ABP1 και SCF^{TIR1} παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές pH. Η σύνδεση του 1-NAA με το ABP1 εξαρτάται έντονα από το pH. Η δέσμηση του 1-NAA με το ABP1 εξαρτάται έντονα από το pH. Η βέλτιστη τιμή pH βρίσκεται μεταξύ 5,0-5,5 και πέφτει για ένα μικρό κλάσμα σε pH 7,0 (Napier, 1995). Οι μελέτες σχετικά με τη δέσμηση του IAA με το SCF^{TIR1} δεν έδειξαν τέτοια εξάρτηση (Dharmasiri, Dharmasiri and Estelle, 2005; Kepinski and Leyser, 2005). Εν τούτοις σε κάθε περίπτωση, το pH στο οποίο βρίσκεται η σύνδεση υψηλής συγγένειας είναι κατάλληλο για τα τμήματα στα οποία αναφέρθηκαν, ότι ενεργούν οι υποδοχείς: στον πυρήνα (pH 7.2-7.5 για TIR1) και στην κυτταρική επιφάνεια (pH 5,0-6,0 για τη ABP1).

Συνεπώς, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των συγγενειών σύνδεσης και των επιλεκτικών χαρακτηριστικών του συμπλόκου SCF^{TIR1} και του ABP1 είναι συνεπείς ως προς την ποικιλία που απαιτείται για τη λειτουργία σε διαφορετικά τμήματα. Η συνδεδεμένη με μεμβράνη ABP1 φαίνεται πιο κατάλληλη για την εξυπηρέτηση μιας πλατφόρμας βιοαισθητήρα λεπτής λιπιδικής μεμβράνης

Στην παρούσα έρευνα περιγράφεται ένας μικροσκοπικός δυναμομετρικός αισθητήρας ναφθαλινικού οξέος (NAA) πάνω σε νανόφυλλα γραφενίου με ενσωματωμένες σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες. Ο υποδοχέας ABP1 ακινητοποιήθηκε στις σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες και παρείχε επαρκή εκλεκτικότητα για την ανίχνευση αυτής της φυτορμόνης. Οι λιπιδικές μεμβράνες σχηματίστηκαν πάνω σε μικροπορώδη φίλτρα από υαλώδεις ίνες (γυάλινες ίνες) με πολυμερισμό UV ακτινοβολίας. Το μεθακρυλικό οξύ ήταν το λειτουργικό μονομερές, ο διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης ήταν ο παράγοντας σχηματισμού σταυροειδών δεσμών και το 2,2α-αζωδις- (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) ήταν ο εκκινητής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φυσικός υποδοχέας, ενσωματωμένος στο μίγμα λιπιδίων πριν από τον πολυμερισμό, διατηρεί τη βιοδραστικότητά του εντός της λιπιδικής πλατφόρμας. Για την ανίχνευση NAA χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα ανάλυσης ροής, προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός αναλύσεων ανά αισθητήρα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό της NAA σε φρούτα, χυμούς φρούτων και λαχανικά. Η προτεινόμενη τεχνική μπορεί να είναι συμπληρωματική των καθιερωμένων μεθόδων HPLC και μπορεί να αναπτυχθεί σε μια φορητή συσκευή για την ταχεία και επί τόπου διαλογή φρούτων και λαχανικών από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

7.2 Υλικά και διαλύματα

1. Διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη [Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC, (C₄₀H₈₀NO₈P)] αποτελείται από 2 μόρια παλμιτικού οξέως, που εστεροποιούνται με την 3-φωσφορική L-γλυκερίνη, η οποία περιέχει ένα μόριο χολίνης, προσδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Αγοράστηκε από τη Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA και χρησιμοποιήθηκε ως λιπίδιο για το σχηματισμό των μεμβρανών που υποστηρίζονται επί ενός πολυμερούς.
2. Μεθακρυλικό οξύ (C₄H₆O₂, Mr=86, Aldrich, Steinmheim, Germany).
3. Ακετονιτρίλιο (CH₃CN, Mr=41, Aldrich, Steinmheim, Germany).
4. Διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη (Mr=208, Aldrich, Steinmheim, Germany).
5. 2,2'-αζωδισ- (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) (AIBN, C₈H₁₂N₄, Mr=164,21 Merck, Darmstadt, Germany).
6. Μικροφίλτρα υάλου (0,7 και 1,0 μm, Whatmam Scientific Ltd., Kent, UK).
7. Για την παρασκευή των διακυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο / φιλτραρισμένο νερό (με ειδική αντίσταση τουλάχιστον 18 MΩ cm) και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συσκευή για φιλτράρισμα Milli-Q (Millipore, El Paso, Texas, USA).

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 25±1 °C. Για τη συλλογή, απομόνωση και καθαρισμό του υποδοχέα ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως έχει περιγραφεί λεπτομερώς (Narier, 1995). Εν συντομία, το διάλυμα που περιείχε τον καθαρισμένο υποδοχέα λυοφιλοποιήθηκε σε κλάσματα των 100 μL και διατηρήθηκε ξηρό στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Κάθε κλάσμα επανασυστάθηκε σε 100 μL αποσταγμένο νερό. Χρησιμοποιήθηκαν όγκοι των 10 μL για την παρασκευή σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών με ενσωματωμένο υποδοχέα.

7.3 Όργανα και συσκευές

1. Τα φάσματα Raman ελήφθησαν με ένα ανακλαστικό μικροσκόπιο in Via Renishaw (Via Reflex Raman microscope system) χρησιμοποιώντας ως πηγή διέγερσης ένα laser Ar⁺ ion (λ=514.5 nm). Η ακτίνα laser επικεντρώθηκε στα 785 nm στο φίλτρο ή στο σύρμα με μεγέθυνση 50X (δεδομένα εργαστηρίου).
2. Τα ηλεκτροχημικά πειράματα διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό ηλεκτρόμετρο Keithley μοντέλο 614 (Keithley Model 614, USA). Για τις μετρήσεις του χρόνου απόκρισης χρησιμοποιήθηκε ένας καταγραφέας Knauer (KNAUER GmbH, Berlin, Germany) που συνδέθηκε στην έξοδο του ηλεκτρόμετρου.
3. Ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag / AgCl.
4. Σύστημα υπερήχων (sonicator) Bandelin της SONELEX Digital 10P (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany).
5. Αναλυτικός ζυγός.

6. Αναδευτήρας δίνης (Vortex Genie).
7. Αναδευτήρας υπερήχων (Bek Nilas, Ultrasonic).
8. Λυχνία UV- δευτερίου
9. Φίλτρα υαλονημάτων (GF/FTM, Whatman Scientific Ltd, Kent, UK).
10. Ποτήρια ζέσεως, πιπέτες Pasteur, σιφώνια, κωνικές και ογκομετρικές φιάλες.

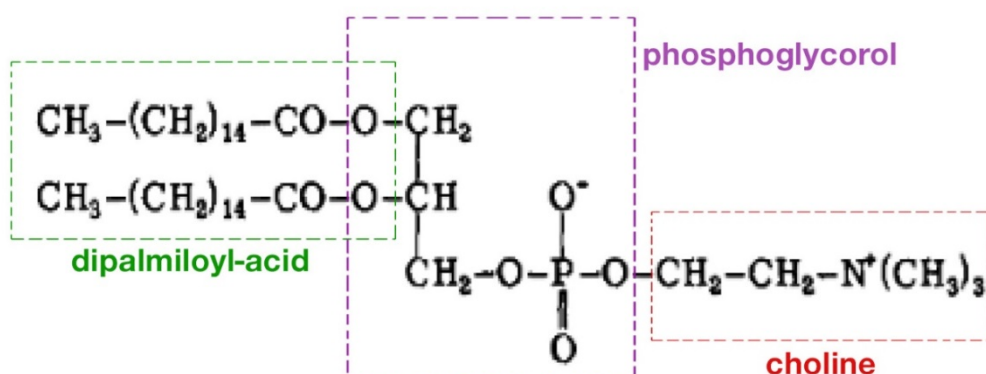
7.4 Κατασκευή αισθητήρα ηλεκτροδίου στηριζόμενου σε λιπίδιο με ενσωματωμένο τον υποδοχέα της ορμόνης αυξίνης πάνω σε ηλεκτρόδιο γραφενίου

7.4.1 Κατασκευή σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών με ενσωματωμένο τον υποδοχέα αυξίνης/πειραματικές συνθήκες

Για την κατασκευή της λιπιδικής μεμβράνης παρασκευάζεται με ανάμειξη ένα μείγμα αποτελούμενο από:

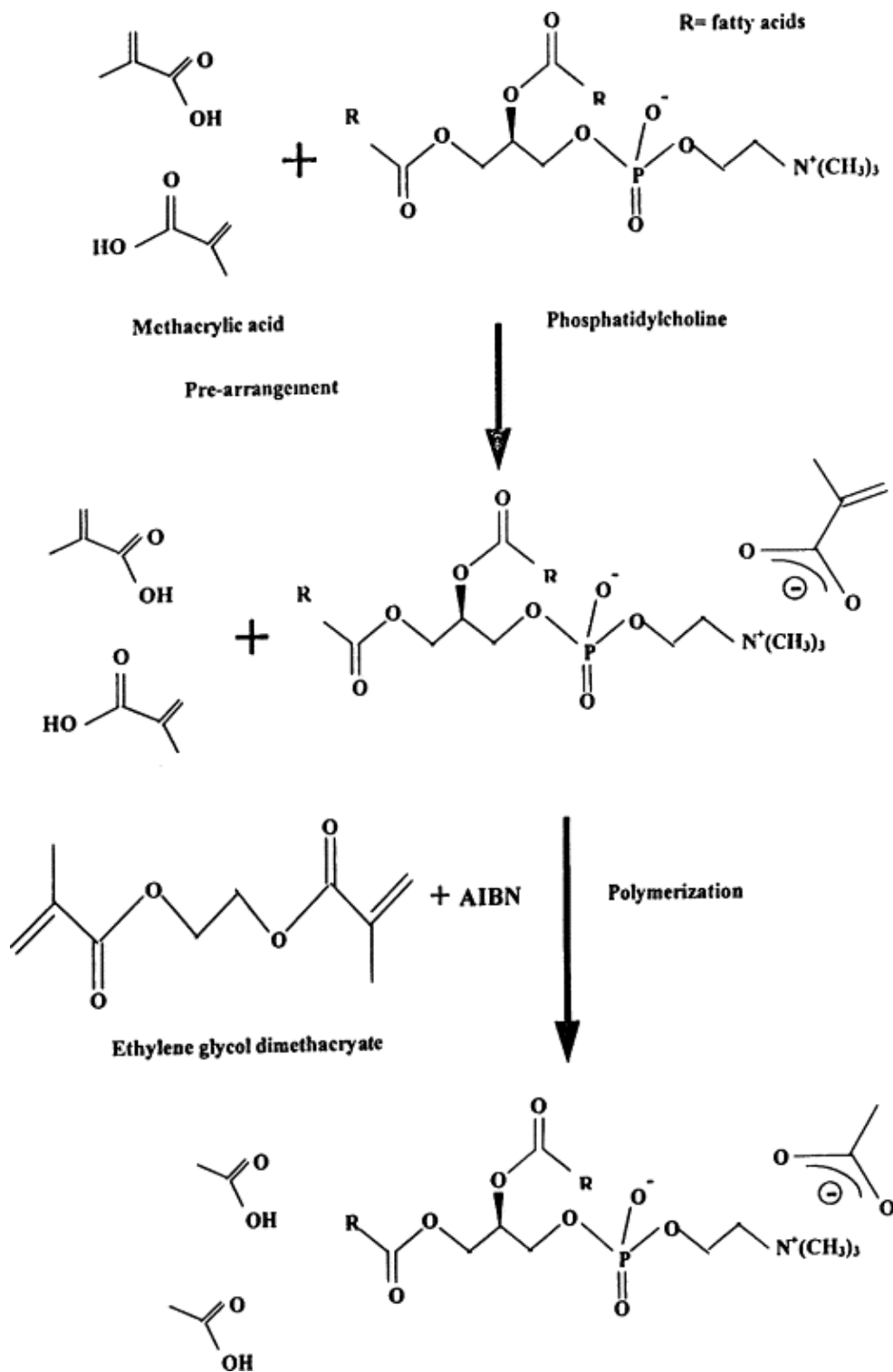
- 5 mg DPPC
- 0,070 mL μεθακρυλικό οξύ,
- 0,8 mL διμεθακρυλική αιθυλενο-γλυκόλη,
- 8 mg 2,2'-αζωδισ- (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) (AIBN) και
- 1,0 mL ακετονιτρίλιο.

Από το παραπάνω μείγμα 0,15 mL περίπου και 0,015 mL ενσωματωμένου υποδοχέα αυξίνης, διαποτίστηκαν πάνω στα φίλτρα υαλονημάτων (διαμέτρου περίπου 9 mm) και τοποθετήθηκαν άμεσα κάτω από λυχνία UV για 4 ώρες, με αποτέλεσμα να επέλθει πολυμερισμός των μεμβρανών.



Σχήμα 7.2. Η χημική δομή του φωσφολιπιδίου DPPC (διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη). Η DPPC αποτελείται από 2 μόρια παλμιτικού οξέος, που εστεροποιούνται με την 3-φωσφορική L-γλυκερίνη, η οποία περιέχει ένα μόριο χολίνης, προσδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό.

Στο σχήμα 7.3 απεικονίζεται το προτεινόμενο σχήμα του πολυμερισμού. Αυτό αποδείχτηκε με την προσθήκη γραμισιδίνης A και D, όπου η γραμισιδίνη μέσα σε λιποσώματα (ή διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες) παρουσιάζει διμερή ελικοειδή δομή με αποτέλεσμα την παραγωγή συνεχών καναλιών ιόντων, ενώ αυτό δεν συμβαίνει στην παρούσα περίπτωση. Η σχηματική αναπαράσταση ακινητοποίησης του λιπιδίου σε επιφάνεια φίλτρου με τη μέθοδο του πολυμερισμού είναι η ακόλουθη:



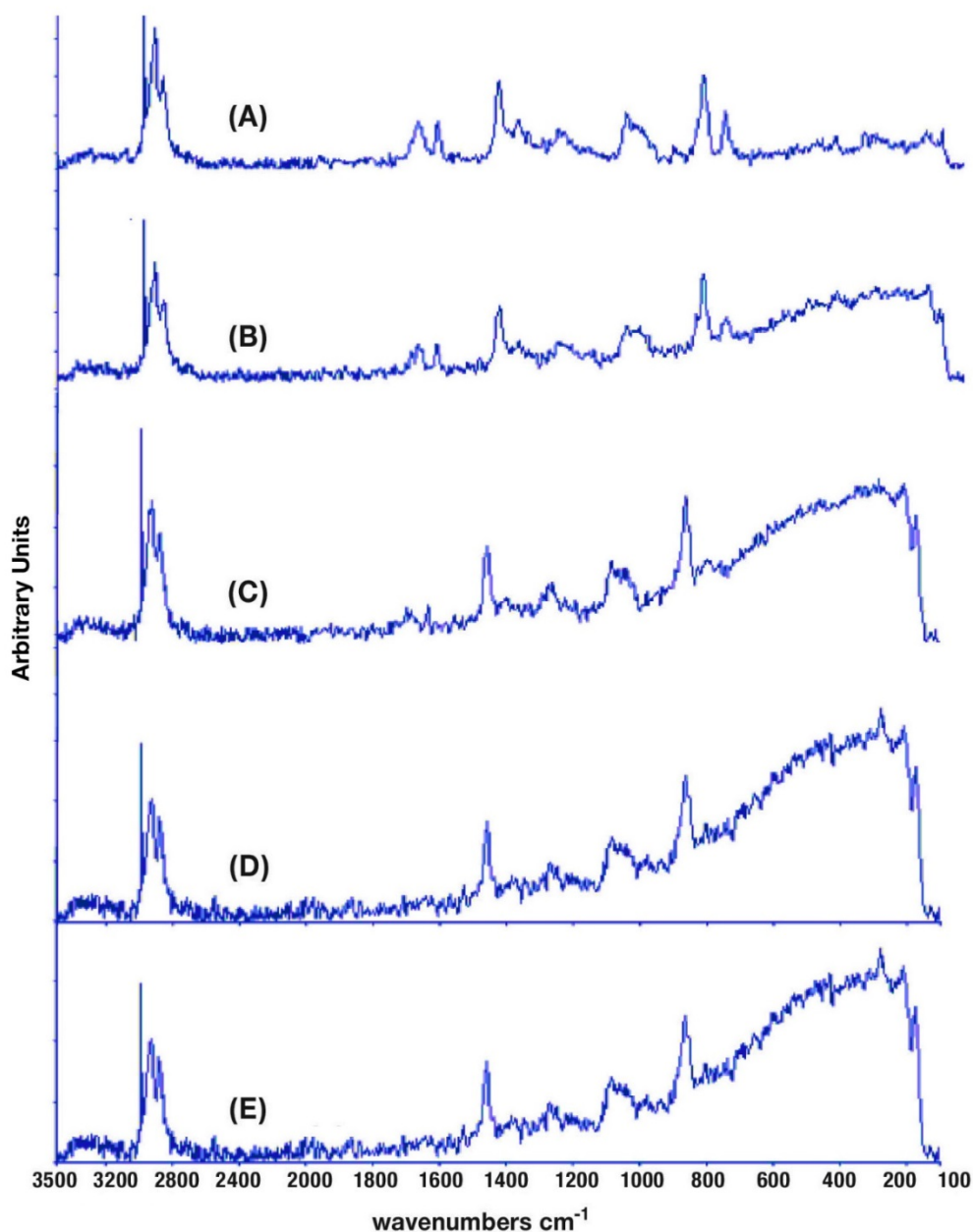
Σχήμα 7.3. Σχηματική αναπαράσταση ακινητοποίησης του λιπιδίου σε επιφάνεια φίλτρου με τη μέθοδο πολυμερισμού (Nikolelis et al., 2005).

Η τεχνική για να είναι οι λιπιδικές μεμβράνες σταθερές στον αέρα έχει αναφερθεί σε προηγούμενη δημοσίευση (Nikolelis et al., 2005) στον προσδιορισμό καρβαμιδικών (καρβοφουρανίου). Το πολυμερές σώμα είναι αδιάλυτο σε οποιοδήποτε από τους κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως ακετονιτρίλιο, DMSO, εξάνιο, χλωροφόρμιο, αιθανόλη, και ακετόνη, και αυτά είναι στοιχεία που συνηγορούν ότι το πολυμερές σώμα είναι το διασταυρούμενο (crosslinker). Σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες παρασκευάστηκαν με πολυμερισμό, με διαδικασία παρόμοια με αυτήν που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002; Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005; Nikoleli et al., 2012; Nikoleli et al., 2014; Nikolelis et al., 2008; Nikolelis et al., 2006).

Αναλυτικότερα, η πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα έρευνα είναι η εξής:

1. Προσθήκη 5,0 mg DPPC σε μείγμα αποτελούμενο από 0,070 mL μεθυλακρυλικού οξέος, 0,8 mL διμεθακρυλικής αιθυλενογλυκόλης, 8 mg 2,2'-αζωδις- (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο), 1,0 mL ακετονιτρίλιου και 0,29 mg υποδοχέα φωσφορυλίου.
2. Διαβίβαση αζώτου στο μείγμα για περίπου 1 λεπτό και επεξεργασία του μείγματος με υπερήχους για 30 λεπτά.
3. Εναπόθεση στην επιφάνεια του μικροφίλτρου ποσότητας 0,15 mL από το παρασκευασμένο μείγμα (**παρασκευή σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης**).
4. Ακολουθεί **ενσωμάτωση του υποδοχέα δέσμευσης της αυξίνης** (ABP1, Auxin Binding Protein1) **στις λιπιδικές μεμβράνες διπλής στοιβάδας** με την εναπόθεση 10 μL του εναιωρήματος του υποδοχέα μαζί με το μείγμα πολυμερισμού. Δηλαδή, για την ενσωμάτωση του ABP1 στις λιπιδικές μεμβράνες, το μικροφίλτρο καλύφθηκε με 0,15 mL από το μείγμα πολυμερισμού και διαποτίστηκε με 10 μL από το αιώρημα του υποδοχέα.
5. **Ακτινοβόληση του μείγματος** με χρήση λυχνίας UV-δευτερίου για να επέλθει **πολυμερισμός** των παρασκευασμένων λιπιδικών μεμβρανών. Ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε εντός 4 ωρών. Εναλλακτικά, ο πολυμερισμός δοκιμάστηκε με τη διαδικασία θερμικού πολυμερισμού στους 80 °C, αλλά αποδείχθηκε ότι ο χρόνος πολυμερισμού ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος.

Οι μεμβράνες διατηρούνται σταθερές στον αέρα, για επαναλαμβανόμενες χρήσεις, για περιόδους μεγαλύτερες των δύο μηνών. Οι πλατφόρμες ανίχνευσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μία φορά (και στη συνέχεια να απορριφθούν) ή σε επαναλαμβανόμενα πειράματα (μετά από αναγέννηση - βλέπε παρακάτω). Όταν δεν χρησιμοποιούνται, οι πλατφόρμες διατηρούνται στους 4 °C και συνήθως έχουν διάρκεια ζωής μεγαλύτερη από δύο μήνες. Για την παρακολούθηση της κινητικής διαδικασίας πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα φασματομετρίας Raman από προηγούμενες δημοσιεύσεις (Nikolelis et al., 2008; Nikolelis et al., 2006). Όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (σχ. 7.4) ο πολυμερισμός των μεμβρανών περατώθηκε κατά 80% περίπου σε χρόνο 4 ωρών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή από το ποσοστό αυτό σε ακτινοβόληση για περισσότερες ώρες π.χ 6, 12, 24. Αυτός είναι ο λόγος που ο χρόνος έκθεσης του μείγματος σε υπεριώδη ακτινοβολία ήταν 4 ώρες.



Σχήμα 7.4. Φάσματα Raman του μείγματος κατασκευής της λιπιδικής μεμβράνης κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία A) για 0 λεπτά, B) 60 λεπτά, C) 120 λεπτά, D) 240 λεπτά, E) 300 λεπτά

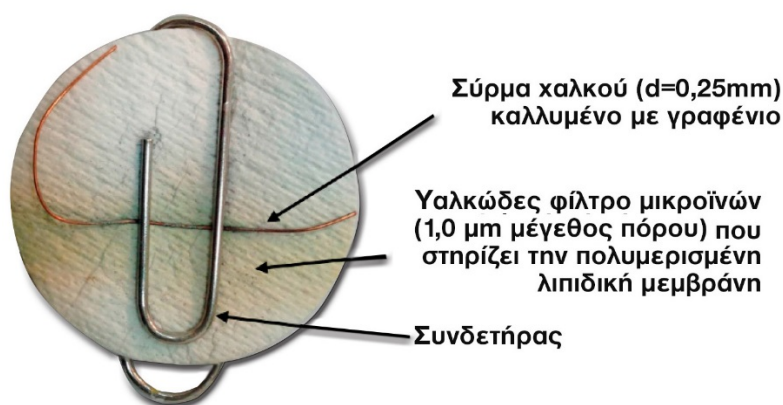
7.4.2 Κατασκευή του ηλεκτροδίου γραφενίου

Για την κατασκευή του ηλεκτροδίου γραφενίου ακολουθήθηκε η πορεία όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Nikoleli et al., 2012; Nikoleli et al., 2014).

1. Παρασκευάζεται ένα ομογενές αιώρημα γραφενίου (~ 0,4 mg / mL) σε N-μεθυλοπυρρολιδόνη (NMP) με ήπια κατεργασία (ελαφρά δόνηση) χρησιμοποιώντας τη συσκευή υπερήχων (sonicator της SONELEX Digital 10P, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) για 180 ώρες.

2. Ακολουθεί φυγοκέντριση του αιωρήματος για 2 ώρες στις 700 στροφές/λεπτό. Ο αυξημένος χρόνος δόνησης μέσω των υπερήχων κρίθηκε απαραίτητος, επειδή το μέγεθος των φυλλιδίων (flakes) μια κρίσιμη παράμετρος για αρκετές εφαρμογές, είναι πολύ μειωμένο (Ciesielskia and Samori, 2014; Hennrich et al., 2007). Επιπλέον, η παρατεταμένη υπερήχηση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του γραφενίου, δηλ. τον αριθμό και τη θέση των περιοχών διάσπασης της σύζευξης σε γραφένιο (εμφάνιση ατομικών ή σημειακών ελαττωμάτων) που διέπουν τις ηλεκτρονικές του ιδιότητες. Τα ελαττώματα αυτά εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις άκρες των φυλλιδίων του γραφενίου, ενώ το βασικό επίπεδο των φυλλιδίων είναι σχετικά ελεύθερο ελαττωμάτων (Lotya, 2009). [31].
3. Έκχυση του αιωρήματος γραφενίου επί ενός σύρματος χαλκού ($d = 0.25 \text{ mm}$) τοποθετημένου πάνω σε ένα φίλτρο από υαλώδεις ίνες. Το σύρμα χαλκού χρησιμοποιείται ως σύνδεσμος μεταξύ ηλεκτροδίου και οργάνου μέτρησης του δυναμικού προς εξαγωγή των σημάτων τάσης για την καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Εξάτμιση του οργανικού διαλύτη χρησιμοποιώντας θερμαντικό ανεμιστήρα.

Η κατασκευή του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα ολοκληρώθηκε με την ενθυλάκωση του φίλτρου, που στηρίζει την πολυμερισμένη λιπιδική μεμβράνη, πάνω στο σύρμα χαλκού που περιέχει τα νανόφυλλα γραφενίου (σχ. 7.5).



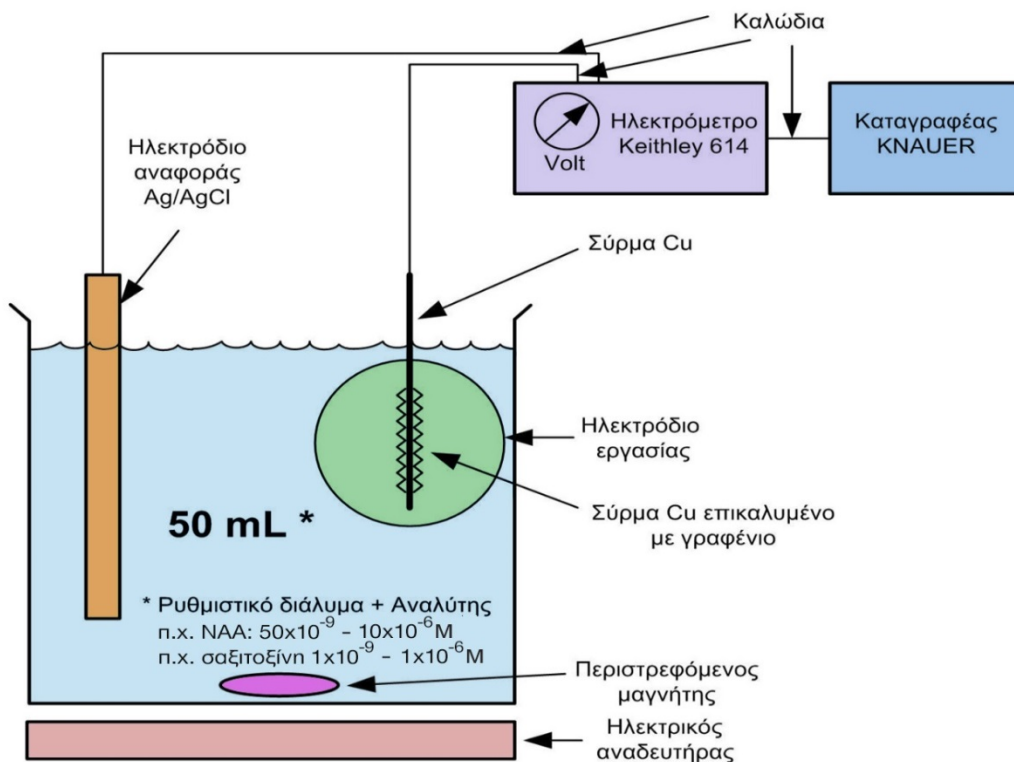
Σχήμα 7.5. Φωτογραφία του κατασκευασθέντος βιοαισθητήρα της αυξίνης (ABP1).

7.5 Ηλεκτροχημικές μετρήσεις

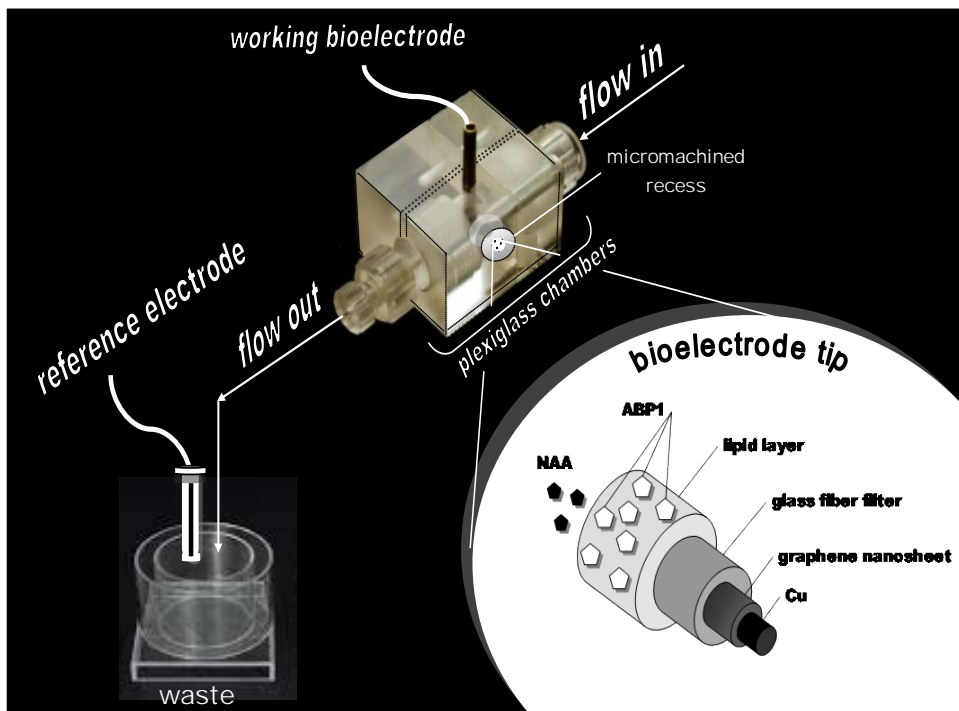
Ένα σύστημα δύο ηλεκτροδίων χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ποτενσιομετρικής ηλεκτροχημικής απόκρισης (ως διαφορά δυναμικού) του κατασκευασμένου βιοαισθητήρα NAA με τη χρήση ενός ψηφιακού ηλεκτρόμετρου (Keithley Electrometer Model 614, USA). Το ένα ηλεκτρόδιο είναι το βιοηλεκτρόδιο εργασίας το οποίο αποτελείται από σταθεροποιημένη πολυμερική λιπιδική μεμβράνη/γραφένιο και το έτερο είναι το πρότυπο ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Η τάση μετρήθηκε έναντι του ηλεκτροδίου αναφοράς (σχ. 7.6).

Η βαθμονόμηση του αισθητήρα πραγματοποιήθηκε με τρόπο διακοπτόμενης ροής: Διαλύματα NAA, σε κλάσματα των 10 μL και 20 μL εγχύνονται στην εισροή του φορέα

ηλεκτρολύτη (pH = 7,0) και ακολουθεί διακοπή της ροής για 5 λεπτά. Ο χρόνος αυτό είναι επαρκής για την καταγραφή της απόκρισης, ενώ με το τέλος αυτού του χρόνου η έγχυση επαναλαμβάνεται εκ νέου με ρυθμό ροής 2,0 mL/min δύο ή και τρεις φορές για την αναγέννηση του αισθητήρα (σχ.7.7).



Σχήμα 7.6. Πειραματική διάταξη μετρήσεων βιοαισθητήρα ναφθαλινικού οξέος.



Σχήμα 7.7. Σχηματική παράσταση της πειραματικής ρύθμισης και του επιφανειακού άκρου του βιοηλεκτροδίου.

7.6 Προετοιμασία των δειγμάτων

Φρούτα, χυμοί φρούτων και λαχανικά αγοράστηκαν από την τοπική αγορά και διατηρήθηκαν σε ψυγείο (2-8° C) μέχρι να αναλυθούν. Οι χυμοί που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη είναι: χυμός μήλου (50% φρούτα κατ' όγκο), χυμός κερασιού (30% φρούτα κατ' όγκο), σιρόπι κερασιού (20% φρούτα κατ' όγκο), χυμός γκρέιπφρουτ (60% κατ' όγκο), χυμός ανανά (30% φρούτα κατ' όγκο) και χυμός φράουλας (50% φρούτα κατ' όγκο). Τα δείγματα κατεργάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται σε σειρά δημοσιεύσεων (Nikolelis et al., 2008; Hertel, Thomson and Russo, 1972; Wang et al., 2014). Κατ' αρχήν τα δείγματα υποβλήθηκαν σε έκπλυση με νερό βρύσης και ακολούθως έκπλυση με αποσταγμένο νερό. Μετά την έκπλυση τα βρώσιμα μέρη των φρούτων και λαχανικών τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια μαχαιριδίου σε μικρά τεμάχια και ζυγίστηκαν δείγματα βάρους των 10 g ακριβώς. Ακολούθησε προσθήκη 50 mL ηλεκτρολύτη, ανάμειξη, πολτοποίηση και ομογενοποίηση σε αναμεικτήρα από ανοξείδωτο χάλυβα. Οι χυμοί φρούτων χρησιμοποιήθηκαν, όπως αγοράστηκαν σε ποσότητες των 50 mL. Οι χυμοί και τα δείγματα πολτού αναταράχθηκαν έντονα με υπερήχους για 60 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και αραιώθηκε.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο προσθήκης. Πέντε (5) δείγματα από κάθε τύπο φρούτου/λαχανικού ενοφθαλμίστηκαν με διάλυμα NAA, αναμίχθηκαν με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε pH=7,0 και αναλύθηκαν αμέσως με την ίδια διαδικασία βαθμονόμησης του αισθητήρα. Ένα μη ενοφθαλμισμένο δείγμα κατεργάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τα ενοφθαλμισμένα και χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος (μάρτυρας).

7.7 Αποτελέσματα και συζήτηση

Η παρασκευή σταθερών στον αέρα λιπιδικών μεμβρανών για επαναλαμβανόμενες χρήσεις έγινε με έκθεση σε ακτινοβολία με λυχνία δευτερίου UV και όχι με θερμικό πολυμερισμό στους 60-80 °C, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Nikolelis and Mitrokotsa, 2002; Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005; Nikoleli et al., 2012; Nikoleli et al., 2014; Nikolelis et al., 2008; Nikolelis et al., 2006). Αυτό συμβαίνει, διότι σε αυτά τα υψηλής θερμοκρασίας δείγματα, κατά τη διάρκεια διεργασίας του πολυμερισμού είναι δυνατόν οι **πρωτεΐνες** («υποδοχείς») δηλαδή το ένζυμο, ή αντίσωμα ή φυσικός ή συνθετικός υποδοχέας να απενεργοποιηθούν. Όμως η διαδικασία πολυμερισμού με λυχνία UV που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, επέτρεψε την ενσωμάτωση του «υποδοχέα» (δηλ. της ABP1) κατά την κατασκευή της μεμβράνης χωρίς την απενεργοποίησή της, δίνοντας τη δυνατότητα για καλύτερο έλεγχο και βελτιστοποίηση της φόρτωσης του «υποδοχέα».

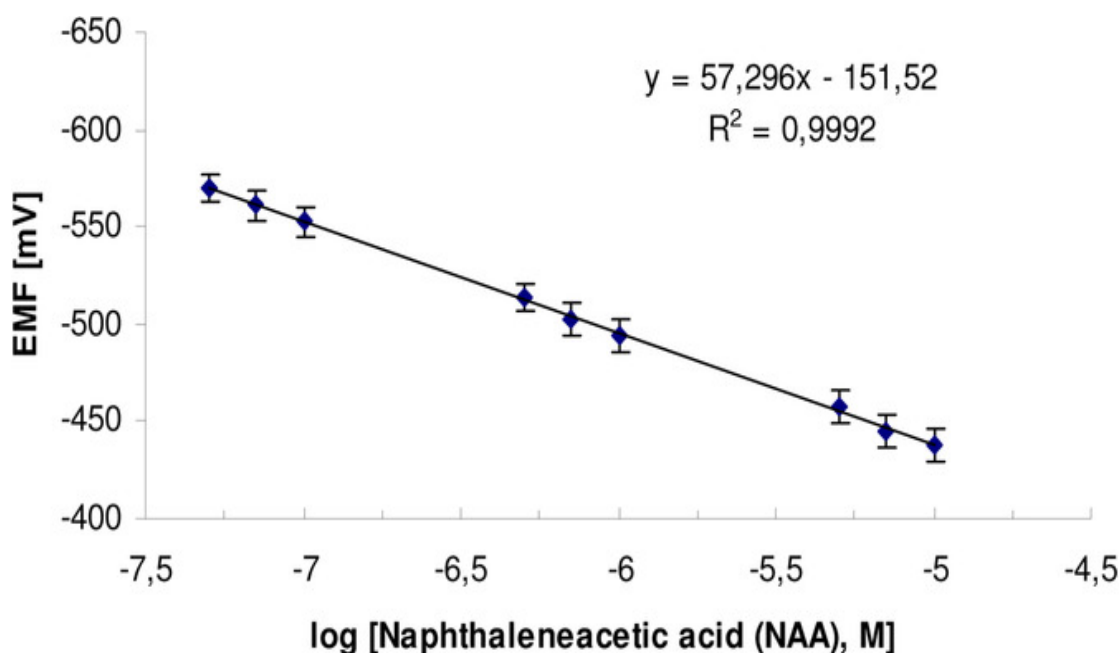
7.7.1 Αξιοπιστία μετρήσεων

Τα νανόφυλλα γραφενίου που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη, επέτρεψαν την ελαχιστοποίηση του αισθητήρα NAA με έναν εύκολο τρόπο. Αυτά είναι πλήρως

χαρακτηρισμένα και επαρκή δεδομένα περί αυτών έχουν δημοσιευθεί σε προηγούμενες μελέτες (Kepinski and Leyser, 2005; Nikoleli et al., 2013). Η ηλεκτροχημική απόκριση του βιοαισθητήρα μετρήθηκε, ως διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Από τις λαμβανόμενες μετρήσεις διαπιστώθηκε μια εξαιρετικά σταθερή έξοδος και μια καλή γραμμική καμπύλη ευαισθησίας εντός μιας μεγάλης δυναμικής περιοχής συγκεντρώσεων του NAA από 50×10^{-9} M έως 10×10^{-6} M σε pH 7,0. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 βρέθηκε να είναι 0,9992 ($n = 30$) (σχ. 7.8). Το όριο ανίχνευσης με βάση τη χαμηλότερη συγκέντρωση που θα μπορούσε να μετρηθεί με αξιοπιστία ($S/N = 3$), ήταν 10 nM NAA. Ο αισθητήρας έδειξε εξαιρετική κλίση της καμπύλης ευαισθησίας με τιμή 57,3 mV ανά δεκάδα συγκέντρωσης. Η εξίσωση που παρέχει την ποτενσιομετρική απόκριση του βιοαισθητήρα ακολουθεί την εξίσωση Nernst:

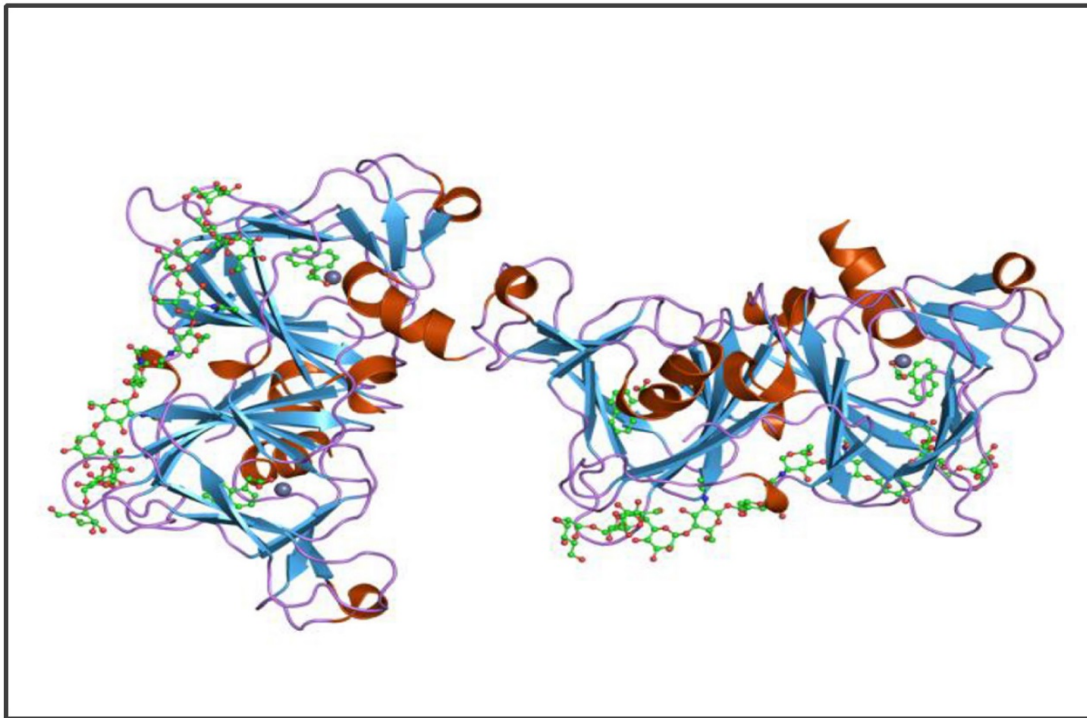
$$E = 57,3 \log C - 151,2$$

Η υψηλή ευαισθησία που επιτυγχάνεται μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο των νανόφυλλων γραφενίου. Η μεταβλητότητα της μέτρησης ως σχετικό πρότυπο σφάλμα (5,95% όριο εμπιστοσύνης) για $n=40$, με τον ίδιο αισθητήρα, αναλυτή και ημέρα βρέθηκε $\pm 3,2-3,8\%$, και για $n=30$ με νέους κατασκευασμένους αισθητήρες, διαφορετικούς αναλυτές και ημέρες βρέθηκε $\pm 4,9-5,8\%$.

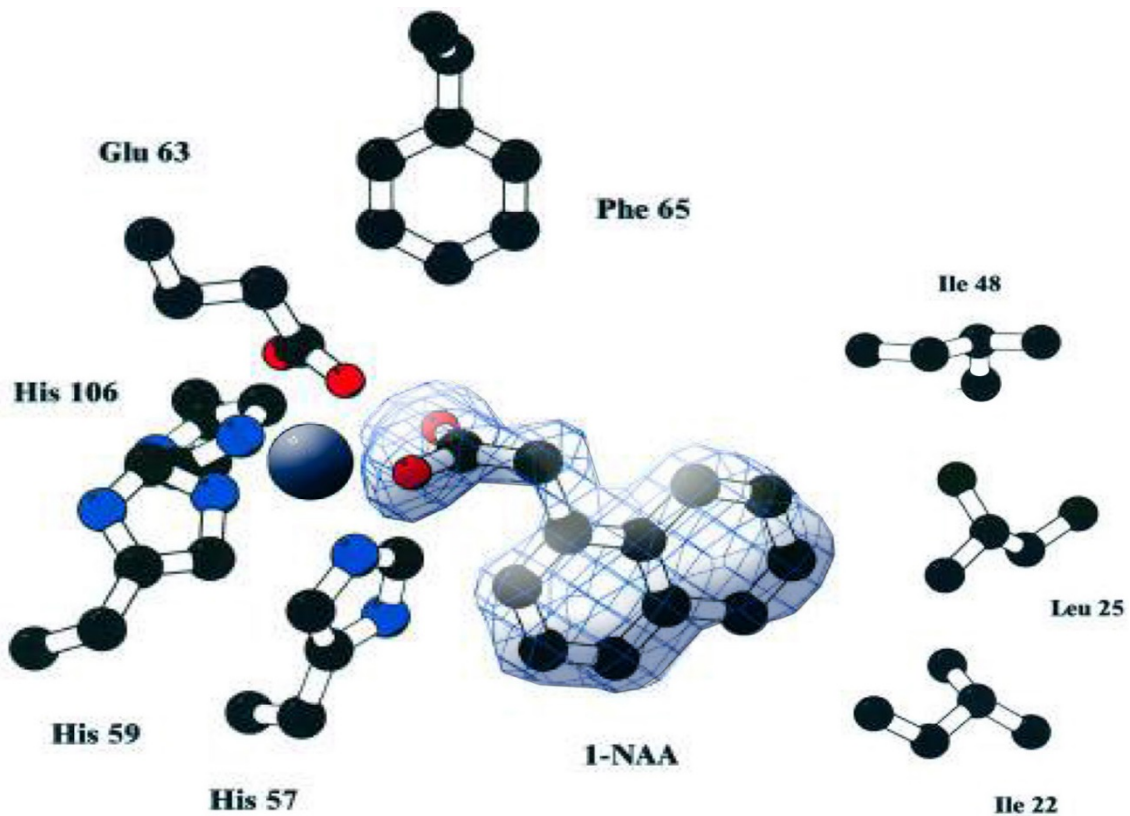


Σχήμα 7.8. Η καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση του NAA χρησιμοποιώντας τον μικροσκοπικό ποτενσιομετρικό αισθητήρα με υποδοχέα αυξίνης (ABP1) ενσωματωμένο σε πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες πάνω σε νανόφυλλα γραφενίου. Πειραματικές συνθήκες: pH 7,0, θερμοκρασία 25 °C, περιοχή συγκέντρωσης NAA 50×10^{-9} M έως 10×10^{-6} M, λαμβανόμενες αποκρίσεις σε λειτουργία διακοπής ροής, ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Οι γραμμές στην καμπύλη αναφοράς, στον άξονα τετμημένων, υποδηλώνουν τυπική απόκλιση ($n = 3$).

Η ABP1 είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την αυξίνη NAA (Auxin Binding Protein 1). Σε διάλυμα η ABP1 είναι ένα διμερές και σε κρυσταλλική κατάσταση, όπου οι υπομονάδες σχετίζονται με μη κρυσταλλογραφική συμμετρία (σχ. 7.9).



(α)



(β)

Σχήμα 7.9. α) Κρυσταλλική δομή του υποδοχέα σύνδεσης της αυξίνης με πρωτεΐνη ABP1 σε σύμπλοκο με 1-NAA και β) χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας σε ανάλυση 1,9 Å με το 1-NAA συνδεδεμένο με ABP1.

Λεπτομερείς περιγραφές για τους υποδοχείς δέσμευσης των αυξινών έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Kerinski and Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005) και έχει αποδειχθεί, ότι η συγγένεια μεταξύ αυξινών και της ABP1 διαφοροποιείται όσον αφορά τον κάθε συνθετικό υποδοχέα. Για παράδειγμα η συγγένεια της ABP1 για το συνθετικό υποδοχέα 1-NAA, είναι μεταξύ 50 έως 200 nM, ενώ η συγγένεια για το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) είναι πολύ υψηλότερη (5-10 mM). Αντίθετα, η τρυπτοφάνη και το βενζοϊκό οξύ δεν δεσμεύονται από την ABP1, ενώ η ισχυρή αυξίνη 2,4-D δεσμεύεται σχετικά ασθενώς.

7.7.2 Έλεγχος παρεμποδίσεων

Για τον έλεγχο των παρεμποδίσεων από άλλες συνθετικές αυξίνες, που υπάρχουν στις καλλιέργειες, πραγματοποιήθηκαν σχετικές μελέτες. Όλα τα πειράματα έγιναν ηλεκτροχημικά με τον παρασκευασθέντα αισθητήρα και περιλάμβαναν έρευνα των πιο κοινά εντοπισμένων ενώσεων σε πραγματικά δείγματα φρούτων και λαχανικών. Η παρεμπόδιση των βιολογικά ανενεργών 2-NAA και IAA μελετήθηκε και οι ενώσεις αυτές δεν έδειξαν σημαντική δέσμευση ακόμη και σε επίπεδα συγκέντρωσης 10^{-4} M. Διερεύνηση για άλλες βιοενεργές αυξίνες που μπορεί να υπάρχουν στα συλλεγμένα δείγματα, κατέδειξε την παρουσία της 2,4-D αυξίνης η οποία παρέχει σήμα, αλλά σε επίπεδα συγκέντρωσης υψηλότερα από 10^{-4} M. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, υποδηλώνουν ότι κάθε σήμα προκαλεί μια προσωρινή αλλαγή στη μεμβράνη και ότι κάθε μία από αυτές τις διαταραχές μπορεί να συμβεί χωρίς παρεμπόδιση από πολύ παρόμοιες ενώσεις. Ισχυρές παρεμποδίσεις υποτίθεται ότι μπορεί να παρατηρηθούν, όταν δοκιμαστεί ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, που συνήθως απαντώνται σε φρούτα και λαχανικά όπως ασκορβικό οξύ, γλυκόζη, λευκίνη, γλυκίνη, τρυγικό, κιτρικό, όξινο ανθρακικό, καφεΐνη. Ωστόσο τα αποτελέσματα (Πίνακας 7.1) δεν έδειξαν παρεμποδίσεις από αυτές τις ενώσεις σε συγκεντρώσεις που συνήθως βρίσκονται σε πραγματικά δείγματα φρούτων και λαχανικών. Το σχετικό σφάλμα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρότερο από 5%.

Πίνακας 7.1. Επίδραση των πιθανών παρεμποδίσεων στο βιοαισθητήρα.

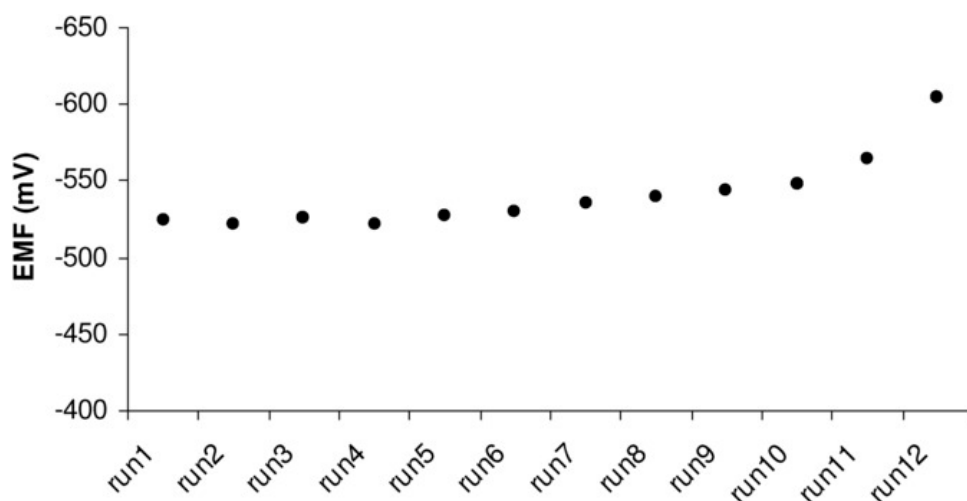
Παρεμπόδιση	Δοκιμασμένη περιοχή συγκεντρώσεων	Μέγιστο σχετικό σφάλμα (%) στο σήμα του NAA συγκέντρωσης 7×10^{-7} M
Ασκορβικό οξύ	$0,05-50 \times 10^{-3}$ M	+4,8%
Γλυκόζη	$5-100 \times 10^{-3}$ M	-2,2%
Λευκίνη	$0,01-10 \times 10^{-3}$ M	+0,2%
Γλυκίνη	$0,01-10 \times 10^{-3}$ M	+0,2%
Τρυγικό	$0,005-5 \times 10^{-3}$ M	-0,8%
Κιτρικό	$0,05-50 \times 10^{-3}$ M	+1,5% (σε χαμηλή συγκέντρωση)/-0,5% (σε υψηλή συγκέντρωση)
Διττανθρακικό	$0,05-50 \times 10^{-3}$ M	+2,7% (σε χαμηλή συγκέντρωση)/-1,0% (σε υψηλή συγκέντρωση)
Καφεΐνη	$0,01-10 \times 10^{-3}$ M	-0,5%

Επίσης εκτελέστηκαν **τυφλά πειράματα** με σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες, χωρίς την παρουσία του υποδοχέα δέσμευσης ABP1, και με εγχύσεις διαφορετικών ποσοτήτων 1-NAA. Σε όλες τις δοκιμές τυφλών πειραμάτων δεν ελήφθησαν παροδικά ρεύματα. Προκαταρκτικές έρευνες για την απόκριση του αισθητήρα στο NAA απουσία υποδοχέα, έδειξαν χαμηλή απόδοση (ή φτωχή έξοδο) με κλίση ευαισθησίας ~ 3 mV ανά δεκάδα συγκέντρωσης, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 1×10^{-6} M έως 1×10^{-3} M (σε pH = 7). Έτσι γίνεται προφανές, ότι η μη ειδική δέσμευση δεν αποτελεί κρίσιμο ζήτημα στην αξιοπιστία των μετρήσεων του αισθητήρα που αναπτύξαμε. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ελέγχου παρεμβολών καθώς και από τα τυφλά πειράματα, δείχνουν ότι η **παρούσα τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα φρούτων και λαχανικών χωρίς παρεμβολές από συστατικά της μήτρας του δείγματος.**

7.7.3 Αναγέννηση του βιοαισθητήρα

Η αναγέννηση του βιοαισθητήρα μπορεί να γίνει με απεριόριστη αραίωση επιτρέποντας να λάβει χώρα διάσπαση με δράση μάζας. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται εύκολα με τη χρήση του συστήματος συνεχούς ροής, όπου η διαχωρισμένη ορμόνη απομακρύνεται συνεχώς και εμποδίζεται να επανασυνδεθεί με τον υποδοχέα. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού ροής για την **αναγέννηση του υποδοχέα**, και για πιθανή **απόρριψη/απώλεια του υποδοχέα**. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ρυθμούς ροής, υψηλότερους από 2,5 mL/min, το σήμα του αισθητήρα επέστρεψε στο επίπεδο υποβάθρου (θορύβου) εντός 2-5 λεπτών. Όσο υψηλότερος είναι ρυθμός ροής, τόσο ταχύτερη είναι η αναγέννηση. Εν τούτοις παρατηρήθηκε κάποια απώλεια του υποδοχέα, η οποία έγινε ιδιαίτερα εμφανής μετά τον τρίτο κύκλο πλυσίματος (ως μείωση της απόκρισης του αισθητήρα). Σε ρυθμούς ροής μικρότερους από 2,5 mL/min, η αναγέννηση του υποδοχέα απαιτούσε περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθεί χωρίς να παρατηρηθεί εκρόφιση υποδοχέα π.χ. με ρυθμό ροής 1,0 mL/min ο απαιτούμενος χρόνος αναγέννησης έφθασε στα 12 λεπτά. Ο βέλτιστος ρυθμός ροής για την αναγέννηση της πλατφόρμας ρυθμίστηκε στα 2,0 mL/min για 6 λεπτά. Άρα **ο μέγιστος αριθμός πειραμάτων** που μπορούσαν να εκτελεστούν, εντός του επιπέδου ακρίβειας που καθορίστηκε κατά τη διάρκεια βαθμονόμησης του αισθητήρα, ήταν περίπου δέκα (10), δεδομένου ότι καταγράφεται η διαφορά δυναμικού και όχι η απόλυτη τιμή του δυναμικού (σχ. 7.10). Ο αισθητήρας ολισθαίνει προς μεγαλύτερο αριθμό εγχύσεων, πιθανώς λόγω απόσπασης του υποδοχέα από τη λιπιδική μεμβράνη.

Ο αισθητήρας που αναπτύξαμε **επικυρώθηκε** με τη χρήση πραγματικών δειγμάτων από τριάντα έξι (36) τύπους χυμών φρούτων και εκχυλίσματα λαχανικών και φρούτων (Πίνακας 7.2) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA, δηλαδή 5×10^{-8} M και 1×10^{-7} M. Σύμφωνα με τους κανονισμούς (U.S. EPA, 2007) το NAA επιτρέπεται για διάφορες καλλιέργειες σπαρτών και φρούτων, όπως μήλα, κεράσια, ελιές, πορτοκάλια, αχλάδια, τάγκελα και μανταρίνια, για την αποτροπή της πτώσης φρούτων από το δένδρο πριν τη συγκομιδή και για την καθυστέρηση της ανθοφορίας των λουλουδιών. Πολλά είδη του Πίνακα 7.2 είναι εντός των ορίων καταλληλότητας του NAA.



Σχήμα 7.10. Απόκριση αισθητήρα σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις NAA συγκέντρωσης 5×10^{-7} M, σε pH 7,0. Μετά από κάθε απόκριση, που καταγράφηκε σε λειτουργία διακοπής ροής 5 λεπτών, ο αισθητήρας αναγεννήθηκε σε ρυθμό ροής 2,0 mL/min για 6 λεπτά, πριν από την επόμενη έγχυση NAA.

Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων φρούτων / λαχανικών με τον προτεινόμενο βιοαισθητήρα.

Δείγμα ID	Υπολείμματα NAA σε δείγματα ελέγχου*	Ανάκτηση	
		Προστιθέμενο NAA	Ανάκτηση % (υπολογισμένη τιμή**/ προστιθέμενη τιμή)
Μήλα	64 nM	50 nM	91-102
		100 nM	97-103
Χυμός Μήλου	n.d.***	50 nM	93-100
		100 nM	96-103
Μπανάνες	n.d.	50 nM	95-101
		100 nM	96-102
Φασολάκια	n.d.	50 nM	91-101
		100 nM	97-104
Λάχανο λευκό	n.d.	50 nM	95-105
		100 nM	97-103
Καρότα	n.d.	50 nM	92-101
		100 nM	97-100
Σέλινο	n.d.	50 nM	97-105
		100 nM	98-102
Κεράσια	53 nM	50 nM	94-104
		100 nM	95-105
Χυμός Κεράσι	n.d.	50 nM	96-102
		100 nM	97-102

Σιρόπι Κεράσι	n.d.	50 nM	98-100
		100 nM	96-103
Άνηθος	n.d.	50 nM	97-101
		100 nM	98-104
Γκρέιπφρουτ	n.d.	50 nM	95-102
		100 nM	97-102
Χυμός Γκρέιπφρουτ	n.d.	50 nM	97-103
		100 nM	96-106
Λεμόνια	n.d.	50 nM	97-102
		100 nM	96-103
Μαρούλι	n.d.	50 nM	98-101
		100 nM	98-102
Πεπόνι	n.d.	50 nM	96-103
		100 nM	98-101
Νεκταρίνια	77 nM	50 nM	91-101
		100 nM	95-103
Κρεμμύδια	n.d.	50 nM	94-104
		100 nM	96-106
Πορτοκάλια	50 nM	50 nM	95-104
		100 nM	95-103
Χυμός Πορτοκάλι	n.d.	50 nM	92-105
		100 nM	97-102
Μαϊντανός	n.d.	50 nM	97-103
		100 nM	91-101
Ροδάκινα	79 nM	50 nM	98-106
		100 nM	96-104
Χυμός Ροδάκινου	n.d.	50 nM	98-106
		100 nM	98-103
Αρακάς	60 nM	50 nM	94-105

		100 nM	91-100
Πιπεριές πράσινες	n.d.	50 nM	98-102
		100 nM	95-104
Πιπεριές κόκκινες	n.d.	50 nM	96-105
		100 nM	96-103
Ανανάς	64 nM	50 nM	99-103
		100 nM	98-102
Χυμός Ανανά	n.d.	50 nM	94-101
		100 nM	98-102
Πατάτες	n.d.	50 nM	99-104
		100 nM	95-106
Ζαχαρότευτλα	n.d.	50 nM	96-104
		100 nM	91-102
Σπανάκι	n.d.	50 nM	96-105
		100 nM	95-103
Φράουλες	n.d.	50 nM	96-104
		100 nM	98-103
Χυμός Φράουλας	n.d.	50 nM	95-102
		100 nM	96-102
Μανταρίνια	78 nM	50 nM	95-104
		100 nM	98-102
Τομάτες	n.d.	50 nM	96-103
		100 nM	98-102
Καρπούζι	n.d.	50 nM	95-104
		100 nM	98-104

* Υπολείμματα προσδιορισμένα σε μη εμβολιασμένα δείγματα.

** Αν υπάρχει σήμα ελέγχου, αυτό έχει αφαιρεθεί.

*** Δεν ανιχνεύθηκε.

Τα επίπεδα υπολειμμάτων του NAA προσδιορίστηκαν σε μη εμβολιασμένα δείγματα (μάρτυρες). Η ανάκτηση του εμβολιασμένου διαλύματος εκτιμήθηκε ως % φαινομενική ανάκτηση για n=5, μετά την αφαίρεση του εμβολιασμένου σήματος από το σήμα ελέγχου. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν αμέσως μετά την κατασκευή στον ίδιο αισθητήρα, χρησιμοποιώντας την γραφική παράσταση βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο σχήμα 7.8 και στο σχήμα της αναγέννησης του αισθητήρα των 6 λεπτών (σχ. 7.10). Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 91-106 % και για τα χαμηλά και υψηλά επίπεδα NAA

(Πίνακας 7.2). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, ακόμη και με την παρουσία υπολειμματικού NAA, υπάρχει σχεδόν μια πλήρης ισορροπία μάζας του ανακτημένου αναλύτη, δηλαδή υπάρχει μια καλή ευθυγράμμιση συγκέντρωσης βαθμονόμησης της εμβολιασμένης φυτορμόνης. Δεν παρατηρήθηκαν θετικές ή αρνητικές τάσεις, ενδεικτικές καθορισμένων σφαλμάτων και επιδράσεων μήτρας. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τα δεδομένα των αναλυτικών πειραμάτων αποδεικνύοντας έτσι την καταλληλότητα του μικροαισθητήρα για τον ποιοτικό έλεγχο καλλιεργημένων νωπών και ελαφρώς επεξεργασμένων προϊόντων διατροφής.

7.8 Συμπεράσματα βιοαισθητήρα ναφθαλινικού οξέος

Στην παρούσα ενότητα περιγράφεται η κατασκευή ενός νέου σταθεροποιημένου βιοαισθητήρα βασιζόμενου σε μια λιπιδική μεμβράνη, η οποία στηρίζεται σε ένα πολυμερές και ενσωματώνει τη πρωτεΐνη δέσμευσης της αυξίνης 1 (ABP1) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ηλεκτροχημική εμφάνιση του ναφθαλινοξικού οξέος (NAA) σε φρούτα και λαχανικά. Η κατασκευή του αισθητήρα είναι απλή και αξιόπιστη που υποδεικνύει προοπτική εμπορικής εκμετάλλευσης. Η μέθοδος ανίχνευσης προσφέρει ταχείς χρόνους απόκρισης (της τάξης των λεπτών) και νανομοριακή ανιχνευσιμότητα της φυτορμόνης. Τα αποτελέσματά της μελέτης αυτής δείχνουν ότι όρια ανίχνευσης είναι συγκρίσιμα με προηγούμενη παρασκευή ενός οπτικού βιοαισθητήρα (*Nikolelis et al., 2008b*) και πολύ ανώτερα από ένα ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα (*Nikolelis et al., 2008a*). Το πλεονέκτημα όμως της παρούσας διάταξης βιοαισθητήρα, σε σύγκριση με τον οπτικό βιοαισθητήρα, είναι ότι ο υπάρχων βιοαισθητήρας μπορεί να επανειλημμένα για τουλάχιστον δέκα προσδιορισμούς, ενώ ο οπτικός βιοαισθητήρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία μόνο χρήση. Τα παραπάνω προσφέρουν μια τεχνική με πλεονεκτήματα παρόμοια με τις μεθόδους HPLC, και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταχεία ανίχνευση του NAA στο χώρο ή στο πεδίο, πράγμα που δεν μπορεί να γίνει με τις μεθόδους HPLC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8⁰

8 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΑΞΙΤΟΞΙΝΗΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΗΛΕΚΤΟΔΙΟ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

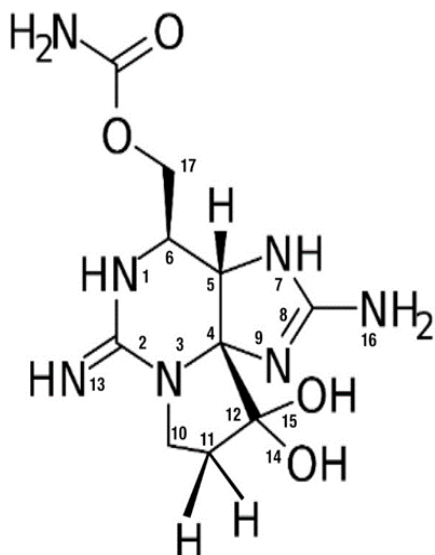
8.1 Εισαγωγή

Η σαξιτοξίνη (saxitoxin, STX) είναι θαλάσσια βιοτοξίνη τόσο πολύ ισχυρή όσο και η νευροτοξίνη. Η σαξιτοξίνη δεν είναι πρωτεΐνη όπως οι περισσότερες τοξίνες. Πρόκειται για μια μικρού μοριακού βάρους (299,286 g/mol) οργανική ένωση με υψηλή πολικότητα, άμορφη, άγευστη, διαλυτή στο ύδωρ, σταθερή σε βρασμό εκτός από αλκαλικά διαλύματα με pH άνω του 8,5 και όξινα με pH κάτω του 3, ενώ δεν καταστρέφεται με το μαγείρευμα. Δομικά η STX ανήκει στα τρικυκλικά αλκαλοειδή της γουανιδίνης (σχ.8.1).

Είναι η πιο γνωστή παραλυτική τοξίνη οστρακοειδών (paralytic shellfish toxin, PST). Η κατάποση της σαξιτοξίνης, συνήθως με την κατανάλωση οστρακοειδών μολυσμένων από τοξικές ανθοφόρες φυλές, είναι υπεύθυνη για την ασθένεια του ανθρώπου γνωστή ως *παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών* (PSP). Μια δόση 1 mg της τοξίνης από μία μερίδα 400 g μολυσμένου κρέατος οστρακοειδών (2,5 ppm STX) είναι θανατηφόρα για τον άνθρωπο (EFSA, 2009). Η Ευρωπαϊκή Αρχή Τροφίμων και Ασφάλειας καθόρισε την οξεία δόση αναφοράς σε 0,5 µg STX ανά kg σωματικού βάρους (ισοδύναμο έως 75 ppb ή 30 µg STX / μερίδα 400 g για έναν ενήλικα βάρους 60 kg) (EFSA, 2009), ενώ οι περισσότερες χώρες καθόρισαν το πρότυπο του πόσιμου νερού σε 1-3 µg / L (Hardy, 2011). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η τοξικότητα STX ποικίλλει σημαντικά με τον τρόπο χορήγησης, τα επιτρεπόμενα επίπεδα σήμερα βρίσκονται υπό αναθεώρηση (Munday et al., 2013).

Ο μηχανισμός νευροτοξικότητας περιλαμβάνει την αναστολή των διαύλων νατρίου (voltage-gated) των νευρικών κυττάρων με πηγή τάσης, αποτρέποντας την κανονική κυτταρική λειτουργία και οδηγώντας σε παράλυση (Cestele and Catterall, 2000). Η τοξίνη παράγεται φυσικά από ορισμένα είδη θαλάσσιων διφωσφορυλικών (***Alexandrium sp.***, ***Gymnodinium sp.***, ***Pyrodinium sp.***) και από κυανοβακτήρια (***Anabaena sp.***, μερικά ***Aphanizomenon spp.***, ***Cylindrospermopsis sp.***, ***Lyngbya sp.***, ***Planktothrix sp.***) (Anderson, Glibert and Burkholder, 2002). Η STX έχει μεγάλες περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις καθώς η παρουσία του στα δίθυρα οστρακοειδή όπως είναι τα μύδια, οι αχιβάδες, τα στρείδια και τα χτένια συχνά οδηγούν σε απαγορεύσεις συγκομιδής εμπορικών οστρακοειδών σε πολλά εύκρατα παράκτια ύδατα σε όλο τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων των βορειοανατολικών και δυτικών Ηνωμένων Πολιτειών, της δυτικής Ευρώπης, της ανατολικής Ασίας, της Αυστραλίας, της Νέας Ζηλανδίας και της

Νότιας Αφρικής (Garcia Camacho, 2007). Στις ΗΠΑ, παρατηρήθηκε παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών στην Καλιφόρνια, το Όρεγκον, την Ουάσιγκτον, την Αλάσκα και τη Νέα Αγγλία (Lefebvre et al., 2016).



Φυσικές πηγές: Dinoflagellates

Pyrodinium bahamense
Alexandrium spp.
Gymnodinium catenatum
Cyanobacteria
Anabaena sp.
Aphanizomenon spp.
Cylindrospermopsis sp.
Lyngbya sp.
Planktothrix sp.

1. Δομή σκελετού: Αλκαλοειδές
Χημικός τύπος: C₁₀H₁₇N₇O₄
Μέση μάζα: 299,286 D_a

2. Health impact: Παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών
Μοριακός στόχος: Περιορισμός τάσης στους διαύλους ιόντων
Φαρμακολογία: Αναστολέας πόρων

Σχήμα 8.1. Δομή σαξιτοξίνης (STX). Βασικά, είναι μια τετραϋδροπουρίνη τριαλκυλίου, με τις θέσεις 2 και 8 του δακτυλίου της πουρίνης να περιέχουν τις ομάδες αμίνης, οι οποίες σχηματίζουν δύο μονάδες γουανιδινίου. Έχει δύο τιμές pKa: 8,22 (για την ομάδα 7,8,9 γουανιδινίου) και 11,28 (για την ομάδα 1,2,3 γουανιδινίου). Σε pH 7, η ομάδα 1,2,3-γουανιδινίου είναι θετικά φορτισμένη και η ομάδα 7,8,9-γουανιδινίου είναι μερικώς αποπρωτονωμένη.

Η ανάλυση της τοξίνης πραγματοποιείται επί του παρόντος με βιολογική δοκιμασία ποντικού, in vitro λειτουργικές και κυτταρικές δοκιμασίες, ELISA και διάφορες αναλυτικές τεχνικές που περιλαμβάνουν υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Cusick and Sayler, 2013). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με την τεχνική αυτή είναι 5 nM το οποίο απαιτεί προκαταρκτική συγκέντρωση ή χρωματογραφική προ-οξείδωση (Halme et al., 2012). Οι ανοσοπροσδιορισμοί που αναπτύσσονται είναι πολύ ευαίσθητοι και εύχρηστοι, αν και οι διασταυρούμενες αντιδράσεις και τα αποτελέσματα της μήτρας (matrix) θέτουν σε κίνδυνο την αξιοπιστία των μετρήσεων (Garibo, et al., 2013). Λόγω της σοβαρότητας της μόλυνσης, υπάρχει η ανάγκη για ταχεία και κατά προτίμηση επί τόπου ανίχνευση. Οι βιοαισθητήρες θα

μπορούσαν να προσφέρουν μια κατάλληλη εναλλακτική λύση για την ανίχνευση της σαξιτοξίνης. Διάφορες προσεγγίσεις έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένων αυτών που βασίζονται σε κύτταρα (*Henao-Escobar et al., 2016; Wang et al., 2015*), αυτών που βασίζονται στον υποδοχέα (*Sadik and Yan, 2004*) ή μορφές ανοσοδοκιμασιών (*Zhu et al., 2014*). Η σαξιτοξίνη μπορεί να ανιχνευθεί κάτω από συγκεντρώσεις 3,3 nM με βιοτινυλιωμένα αντισώματα και επισημασμένη με Cy5 στρεπταβιδίνη ως φθορίζον ιχνηλάτης (*Zhu et al., 2014*). Μία βελτιωμένη λειτουργική δοκιμασία για τη σαξιτοξίνη και τη μπρεβετοξίνη έχει προταθεί πρόσφατα με βάση καρδιομυοκύτταρα με ικανότητα ανίχνευσης 1,2 nM (*Wang et al., 2015*). Οι ηλεκτροχημικές ή πιεζοηλεκτρικές πλατφόρμες ήταν οι πιο επιτυχημένες στην επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης (*Chen et al., 2007*). Για παράδειγμα, ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας που βασίζεται σε απταμερές (aptasensor) και αναπτύχθηκε πρόσφατα (*Hou et al., 2016*), έδειξε ένα όριο ανίχνευσης 0,38 nM, αν και παρατηρείται γραμμικότητα εντός της περιοχής συγκεντρώσεων 0,9 και 30 nM.

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί πρόσφατα στο σχεδιασμό και τη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων με βάση τις λιπιδικές μεμβράνες (*Nikolelis and Mitrokotsa, 2002; Nikolelis et al., 2004; Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005*), που έχουν αποδειχθεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών αισθητήρων για ντοπαμίνη (*Nikolelis et al., 2004*) και εφεδρίνη (*Nikolelis, Psaroudakis and Ferderigos, 2005*).

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται ένας μικροσκοπικός ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας σαξιτοξίνης, χρησιμοποιώντας ενσωματωμένες λιπιδικές μεμβράνες σε νανόφυλλα γραφενίου και το φυσικό υποδοχέα της ένωσης αυτής (Anti-STX) ακινητοποιημένο στις σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες. Ο αισθητήρας έδειξε γρήγορους χρόνους απόκρισης (5-20 λεπτά) και παρέχει καλή καμπύλη γραμμικής ευαισθησίας σε μεγάλη δυναμική περιοχή από 1×10^{-9} M έως 1×10^{-6} M σαξιτοξίνης σε pH 7,0. Το όριο ανίχνευσης ήταν 1 nM με βάση τη χαμηλότερη συγκέντρωση που θα μπορούσε να μετρηθεί με αξιοπιστία ($S/N=3$). Μια καλή αναπαγωγικότητα, επαναχρησιμοποίηση, εκλεκτικότητα, μεγάλη διάρκεια ζωής, νανομοριακό όριο ανίχνευσης και υψηλή ευαισθησία περίπου 60 mV / δεκαετία συγκέντρωσης τοξινών, ήταν τα κύρια χαρακτηριστικά του παρόντος αισθητήρα. Η καταλληλότητα του εξεταζόμενου αισθητήρα επαληθεύθηκε περαιτέρω πάνω σε δείγματα νερού λίμνης και δείγματα νωπών οστρακοειδών εμβολιασμένα με STX.

8.2 Υλικά και διαλύματα

1. Διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη [Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC, ($C_{40}H_{80}NO_8P$), αγοράστηκε από τη Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA και χρησιμοποιήθηκε ως λιπίδιο για το σχηματισμό των μεμβρανών που υποστηρίζονται επί ενός πολυμερούς.
2. Μεθακρυλικό οξύ ($C_4H_6O_2$, Mr=86, Aldrich, Steinmheim, Germany).
3. Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , Mr=41, Aldrich, Steinmheim, Germany).
4. Διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη (Mr=208, Aldrich, Steinmheim, Germany).

5. 2,2'-αζωδισ- (2-μεθυλοπροπιονιτριλίο) (AIBN, C₈H₁₂N₄, Mr=164,21 Merck, Darmstadt, Germany).
 6. Πρότυπα διαλύματα καθαρής σαξιτοξίνης (STX) παρελήφθησαν από Calbiochem (San Diego, California, USA). Από αυτά παρασκευάστηκε το μητρικό (stock) διάλυμα STX των 100 μΜ σε διάλυμα οξικού οξέος 0,05 mM το οποίο διατηρήθηκε στο ψυγείο. Τα διαλύματα εργασίας της τοξίνης παρασκευάζονταν πρόσφατα, λίγα λεπτά πριν τη χρήση τους.
 7. Καθαρή αντιτοξίνη STX ορού κουνελιού (IgG αντι-STX) προμηθεύτηκε από την Agrisera AB (Vännäs, Sweden). Το αντίσωμα συντηρήθηκε στους 4 °C για ένα μήνα και όταν απαιτήθηκε μεγαλύτερος χρόνος συντήρησης αποθηκεύτηκε σε κλάσματα στους -20° C. Επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη αποφεύχθηκε. Τα αντισώματα υπήρχαν σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 7,2 και με 0,01% νατραζίδιο (NaN₃) ως συντηρητικό.
 8. Δοκιμαστικό κιτ ELISA σαξιτοξίνης.
 9. Διάλυμα οξικού οξέος 0,1 M και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.
 10. Μικροφίλτρα υάλου (Whatman Scientific Ltd., Kent, UK). Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γυάλινες μικροΐνες με πόρους διαφορετικών μεγεθών 0,7 και 1,0 μm.
 11. Υπερκάθαρο νερό. Το χρησιμοποιούμενο για τα πειράματα απιονισμένο νερό καθαρίστηκε με διέλευση μέσω φύσιγγας του συστήματος φιλτραρίσματος Milli-Q (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, ΗΠΑ) και είχε ελάχιστη ειδική αντίσταση 18 MΩ cm.
- Όλες οι άλλες χημικές ουσίες ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

8.3 Όργανα και συσκευές

1. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) Quanta™ (Model Quanta 250) FEI, Eindhoven, Netherlands.
2. Συσκευή Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) και Μικροσκοπίας Διαπερατότητας (Transmission Electron Microscopy, TEM) Model SA2000 (Chalmers Science Park, SE-41288, Göteborg, Sweden).
3. Ηλεκτρόμετρο Keithley μοντέλο 614 (Keithley Model 614, USA). Όλα τα ηλεκτροχημικά πειράματα διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας αυτό το ηλεκτρόμετρο, ενώ για τις μετρήσεις του χρόνου απόκρισης στην έξοδο του ηλεκτρόμετρου συνδέθηκε ένας καταγραφέας Knauer (KNAUER GmbH, Berlin, Germany).
4. Ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag / AgCl.
5. Αναλυτικός ζυγός.
6. Αναδευτήρας δίνης (Vortex Genie).
7. Αναδευτήρας υπερήχων (Bek Nilas, Ultrasonic).
8. Σύστημα υπερήχων (sonicator) Bandelin της SONELEX Digital 10P (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany).

9. Φίλτρα υαλονημάτων (GF/FTM, Whatman Scientific Ltd, Kent, UK).
10. Λυχνία δευτερίου UV
11. Ποτήρια ζέσεως, πιπέτες Pasteur, σιφώνια, κωνικές και ογκομετρικές φιάλες.

8.4 Κατασκευή αισθητήρα ηλεκτροδίου στηριζόμενου σε λιπίδιο με ενσωματωμένο υποδοχέα πάνω σε ηλεκτρόδιο γραφενίου

8.4.1 Κατασκευή λιπιδικών μεμβρανών με ενσωματωμένη Anti STX

Αναλυτική πορεία: Η διαδικασία παρασκευής των πολυμερισμένων λιπιδικών μεμβρανών ολοκληρώνεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή του μείγματος μεμβράνης.
 - α) Σε ποτήρι ζέσεως των 10,0 mL προστίθενται υπό ανάμειξη κατά σειρά 5 mg DPPC (σκόνη), 0,070 mL μεθακρυλικό οξύ, 0,8 mL διμεθακρυλική αιθυλενο-γλυκόλη, 8 mg 2,2'-αζωδις- (2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) και 1,0 mL ακετονιτρίλιο.
 - β) Στο μείγμα διαβιβάζεται άζωτο για περίπου 1 λεπτό και ακολουθεί επεξεργασία του μείγματος με υπερήχους για 30 λεπτά.
2. Παρασκευή σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης.

Από το παρασκευασμένο μείγμα λαμβάνονται με μικροπιπέτα 0,15 mL και εναποτίθενται στην επιφάνεια του μικροφίλτρου, οπότε αρχίζει η σχηματοποίηση της λιπιδικής μεμβράνης πάνω στο μικροφίλτρο. Άμεσα με τη βοήθεια μικροπιπέτας, η επιφάνεια του μικροφίλτρου διαποτίζεται με 10 μL καθαρής αντιτοξίνης (Anti-STX) από το εναιώρημα του υποδοχέα.
3. **Πολυμερισμός των παρασκευασμένων λιπιδικών μεμβρανών** Ολόκληρο το σύστημα, δηλαδή το μικροφίλτρο με το μείγμα και τον υποδοχέα δέσμευσης της αντιτοξίνης STX τίθεται σε **ακτινοβόληση** χρησιμοποιώντας τη λυχνία δευτερίου UV. Ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε εντός 4 ωρών και οι μεμβράνες παρέμειναν σταθερές στον αέρα, για περιόδους αποθήκευσης περισσότερο από δύο μήνες. Έτσι, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η Anti-STX ενσωματώθηκε στις λιπιδικές μεμβράνες διπλής στιβάδας με την εξάπλωση των 10 μL του εναιωρήματος αντισώματος πάνω στα 0,15 mL του μείγματος πολυμερισμού. Το σχήμα πολυμερισμού έχει περιγραφεί στην ενότητα 7 (παρ.7.3.1).

8.4.2 Κατασκευή ηλεκτροδίου γραφενίου

Για την κατασκευή του ηλεκτροδίου γραφενίου ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράψαμε στη ενότητα 7 (παρ. 7.3.2) όπως έχει περιγραφεί προηγουμένα από τους Νικολέλη κ.ά. (Nikolelis et al., 2006). Εδώ περιγράφεται εν συντομία:

1. Παρασκευάζεται ένα ομογενοποιημένο αιώρημα 0,4 mg/mL γραφενίου σε N-μεθυλοπυρρολιδόνη (NMP) μετά από ήπια κατεργασία με υπερήχους επί 180 ώρες και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 700 rpm/λεπτό για 2 ώρες. Η κατεργασία με υπερήχους δημιουργεί τάσεις διάτμησης και σπηλαίωσης στο διαλύτη, ο οποίος έτσι διασπά το γραφίτη και απολεπίζει τα φύλλα σε διακριτά (ξεχωριστά), φυλλίδια γραφίτη με όσο το δυνατό μικρότερη πλάγια διατομή (Johnson, Dobson and Coleman, 2015).

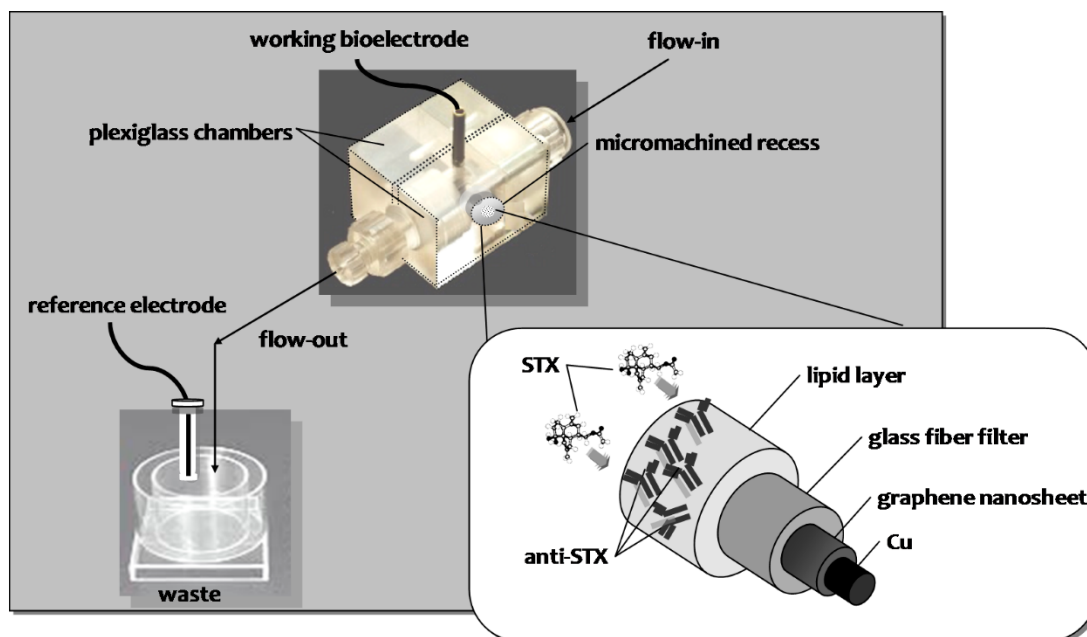
Παρατήρηση. Ο αυξημένος χρόνος υπερήχων απαιτείται επειδή το μέγεθος των φυλλιδίων (flakes), μια κρίσιμη παράμετρος για αρκετές εφαρμογές, είναι πολύ μειωμένο (Ciesielskia and Samori, 2014; Hennrich et al., 2007). Επιπλέον, η παρατεταμένη υπερήχηση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του γραφενίου, δηλ. τον αριθμό και τη θέση των περιοχών διάσπασης της σύζευξης σε γραφένιο (εμφάνιση ατομικών ή σημειακών ελαττωμάτων) που διέπουν τις ηλεκτρονικές του ιδιότητες. Τα ελαττώματα αυτά εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις άκρες των φυλλιδίων του γραφενίου με το βασικό επίπεδο των φυλλιδίων να είναι σχετικά ελεύθερο ελαττωμάτων (Lotya et al., 2009).

2. Στη συνέχεια ένα σύρμα χαλκού με διάμετρο 0,25 mm βυθίζεται στο αιώρημα και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη με θερμικό ανεμιστήρα. Το σύρμα χαλκού χρησιμοποιήθηκε ως επαφή μεταξύ του ηλεκτροδίου και του οργάνου μέτρησης του δυναμικού (εξαγωγή σημάτων τάσης) για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (σχ.8.2).



Σχήμα 8.2. Φωτογραφία του κατασκευασθέντος βιοαισθητήρα της σαξιτοξίνης.

3. Η τελειοποίηση του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα σαξιτοξίνης ολοκληρώθηκε με την ενσωμάτωση του σύρματος χαλκού που περιείχε τα νανόφυλλα γραφενίου πάνω στο φίλτρο που καλύπτεται από τις πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένη την αντιτοξίνη (Anti-STX) της σαξιτοξίνης (σχ. 8.3).



Σχήμα 8.3. Σχηματική διαμόρφωση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα της σαξιτοξίνης και η επιφάνεια ακμής του βιοηλεκτροδίου.

8.5 Ηλεκτροχημικές μετρήσεις

Για τη μέτρηση της ποτενσιομετρικής ηλεκτροχημικής απόκρισης του κατασκευασμένου βιοαισθητήρα σαξιτοξίνης (σχ. 8.3) χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόμετρο Keithley (στη λειτουργία τάσης του) αποτελούμενο από ένα σύστημα δύο ηλεκτροδίων: (α) από το βιοηλεκτρόδιο εργασίας, που είναι η σταθεροποιημένη πολυμερική λιπιδική μεμβράνη/γραφένιο και (β) από το ηλεκτρόδιο αναφοράς, που είναι το πρότυπο Ag/AgCl (με $d = 0,25$ mm, παρασκευασμένο σε 0,1 M KCl). Η τάση μετρήθηκε ως προς το ηλεκτρόδιο αναφοράς (σχ. 8.4).

Η βαθμονόμηση του αισθητήρα πραγματοποιήθηκε σε κατάσταση διακοπτόμενης ροής: διαλύματα σαξιτοξίνης, σε κλάσματα των 10 μ L ή 20 μ L, εγχύνονταν στην ροή του ηλεκτρολύτη φορέα (pH = 7,0) με ρυθμό 2,0 mL/min. Ακολουθούσε σταμάτημα της ροής για 5 λεπτά, χρόνος επαρκής για την καταγραφή της απόκρισης, και στη συνέχεια νέο ξεκίνημα για αναγέννηση του αισθητήρα.

8.6 Μοντέλα προσομοίωσης και δείγματα νερού λίμνης

Για τη μελέτη των μοντέλων προσομοίωσης επιλέχθηκαν επτά πιθανές παρεμποδίσσεις ιοντικών ενώσεων που συνήθως συναντήθηκαν στα νερά της λίμνης Κουμουνδούρου

(Πίνακας 8.1). Κάθε είδος εξετάστηκε μεμονωμένα, αλλά και σε μείγματα, σε όλη την αναφερόμενη περιοχή πάνω σε πρόσφατα παρασκευασμένους αισθητήρες σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν αναπτυχθεί στις αναφορές (Nikolelis et al., 2006; Nikolelis et al., 2008a; Nikolelis et al., 2008b), με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό των Plackett-Burman για την επίδραση των συστατικών της μήτρας δείγματος στην απόκριση των ηλεκτροδίων (Kochana et al., 2008). Δηλαδή, ένα ορθογώνιο σχεδιασμό δύο επιπέδων που ελαχιστοποιεί τον αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται για τη διερευνητική μελέτη ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων, για να διαπιστωθεί κατά πόσον αυτά έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση. Ο έλεγχος έγινε για κάθε είδος χωριστά σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό). Τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης καθενός παράγοντα παρεμπόδισης χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ζευγών και συνδυασμένων μειγμάτων. Η σημασία των επιδράσεων των παρεμποδίσεων εκτιμήθηκε με τη χρήση της δοκιμής Student's t-test.

Πίνακας 8.1. Ιοντικές ενώσεις που ελέγχθηκαν ως πιθανοί παρεμποδιστές σε προσομοιωμένα δείγματα νερού λίμνης.

Χημική ένωση μήτρας	Περιοχή συγκέντρωση (mg/L)		
	Χαμηλή	Μέτρια	Υψηλή
Mg ²⁺	8-15	15-30	30-40
Ca ²⁺	30-60	60-110	110-155
HCO ³⁻	100-380	380-650	650-800
SO ₄ ²⁻	50-75	75-120	120-200
Cl ⁻	100-150	150-250	250-300
NO ³⁻	200-350	350-600	600-800
NH ₄ ⁺	10-25	25-50	50-70

Πραγματικά δείγματα νερού ελήφθησαν από την περιαισθητική λίμνη Κουμουνδούρου που βρίσκεται στο δυτικό τμήμα της Αττικής με γνωστό φυσικοχημικό και το βιολογικό προφίλ (Dimitriou et al., 2008). Τα δείγματα της λίμνης αποθηκεύτηκαν σε 4 °C, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στην αναφορά (Dimitriou et al., 2008). Μετά από διπλή διήθηση μέσω φίλτρων Whatman (βαθμού GF/A: 1,6 mm) δέκα δείγματα νερού της λίμνης εμβολιάστηκαν (spiked) με διάλυμα σαξιτοξίνης. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH = 7,0 και αναλύθηκαν άμεσα με διαδικασία παρόμοια με αυτήν της βαθμονόμησης του αισθητήρα. Ένα μη εμβολιασμένο δείγμα νερού λίμνης υποβλήθηκε σε παρόμοια επεξεργασία, όπως τα εμβολιασμένα δείγματα και χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Για την εκτίμηση της μεταβλητότητας της ανάκτησης ολόκληρης της διαδικασίας ακολουθήθηκε η εξής πορεία: σε έξι δείγματα νερού λίμνης προστέθηκε από 1 mM σαξιτοξίνης πριν από τη διήθηση και ακολούθησε επεξεργασία και άμεση ανάλυση, όπως περιγράφεται παραπάνω σε έναν πρόσφατα παρασκευασμένο αισθητήρα.

8.7 Δείγματα οστρακοειδών

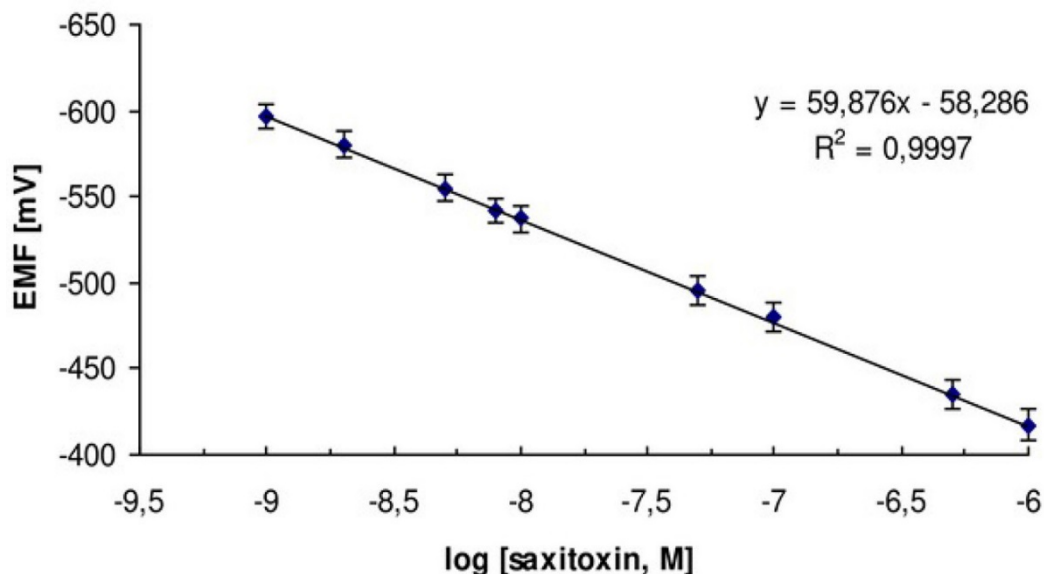
Για την προετοιμασία των δειγμάτων οστρακοειδών ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην αναφορά (Zhang and Zhang, 2012). [26]. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα οστρακοειδών γλυκού νερού για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μήτρας του ιστού. Μύδια, μαλάκια και στρείδια αγοράστηκαν φρέσκα από την τοπική αγορά των Αθηνών και ελέγχθηκαν αμέσως με ένα εμπορικό δοκιμαστικό κιτ ELISA (Fast Saxitoxin, Ridascreen, Darmstadt, Germany) με όριο ανίχνευσης 2 µg/Kg (2 ppb), όπου όλα τα δείγματα βρέθηκαν απαλλαγμένα από τοξίνη. Τα δείγματα εκπλύθηκαν εξωτερικά με τη βοήθεια βούρτσας, αφαιρέθηκε από τα κελύφη τους με μαχαιρίδιο το εσωτερικό μέρος των ειδών και ακολούθως στραγγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν με ένα αλεστήρα (μπλέντερ). Ποσότητα 5,0 g ομογενοποιημένου δείγματος εκχυλίστηκε με 15,0 mL 0,1 M οξικού οξέος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 20 λεπτά (σε θερμοκρασία δωματίου), και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό. Το στερεό υλικό, υπό μορφή σφαιριδίου, εκχυλίστηκε για δεύτερη φορά με 10,0 mL οξικού οξέος 0,1 M. Τα δύο υπερκείμενα υγρά συνενώθηκαν και διηθήθηκαν από φίλτρο κυτταρίνης 0,22 mm. Το λαμβανόμενο διήθημα ρυθμίστηκε σε pH 7,0, εμβολιάσθηκε με διάλυμα STX και αναλύθηκε την ίδια ημέρα.

8.8 Αποτελέσματα και συζήτηση

Για την παρασκευή των σταθεροποιημένων στον αέρα λιπιδικών μεμβρανών, για επαναλαμβανόμενες χρήσεις, αναφερθήκαμε στην παρ.7.3.1 σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Nikolelis et al., 2008a; Nikoleli et al., 2012) χρησιμοποιώντας θερμικό πολυμερισμό στους 60-80 °C. Οι υψηλές τιμές θερμοκρασίας απαγόρευαν την ενσωμάτωση πρωτεϊνικών τμημάτων στη λιπιδική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της διεργασίας πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός UV που χρησιμοποιήθηκε στην τρέχουσα μελέτη επέτρεψε την ενσωμάτωση της αντιτοξίνης (anti-STX) κατά τη διάρκεια κατασκευής της μεμβράνης, καταλήγοντας σε μια σημαντική βελτιστοποίηση του φορτίου του αντισώματος.

Τα νανόφυλλα γραφενίου που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη επέτρεψαν την κατασκευή αισθητήρων σε μικρογραφία. Η απόκριση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα μετρήθηκε ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Τα πειράματα έδειξαν:

- α) Έξοδο υψηλής σταθερότητας η οποία μετρήθηκε με γραμμική ευαισθησία σε μια ευρεία δυναμική περιοχή της σαξιτοξίνης από 1×10^{-9} M έως 1×10^{-6} M σε pH 7,0 (σχ.8.4).
- β) **Το όριο ανίχνευσης** (DL) βασίστηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση που θα μπορούσε να μετρηθεί αξιόπιστα με $S/N=3$ και βρέθηκε 1 nM. Η ανιχνευσιμότητα του αισθητήρα ήταν συγκρίσιμη ή ακόμη και χαμηλότερη από ότι παρόμοιες προσεγγίσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Henaio-Escobar et al., 2016; Wang et al., 2015; Sadik and Yan, 2004; Zhu et al., 2014; Chen et al., 2007; Hou et al., 2016).



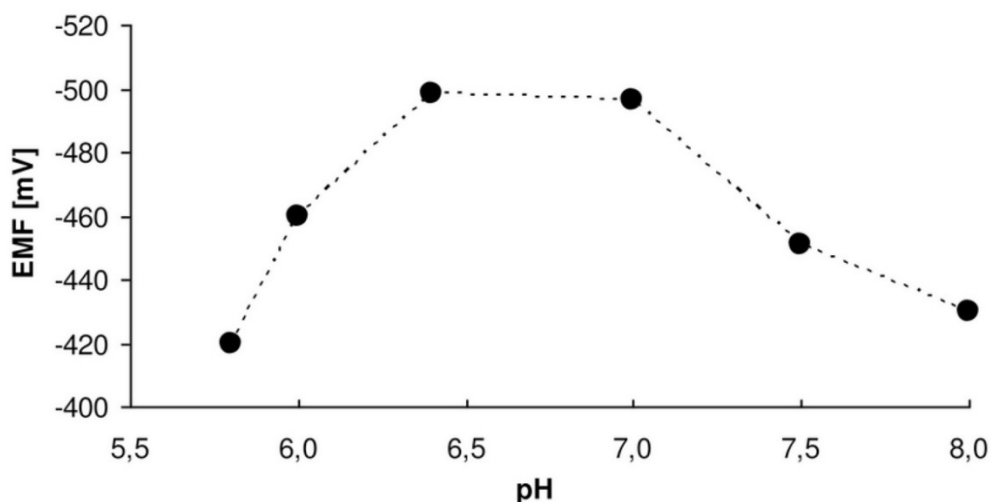
Σχήμα 8.4. Καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση σαξιτοξίνης (STX) χρησιμοποιώντας μικροσκοπικό ποτενσιομετρικό αισθητήρα: καθαρισμένη IgG αντιτοξίνη-STX ορού κουνελιού είναι ενσωματωμένη σε πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες πάνω σε νανόφυλλα γραφενίου. Πειραματικές συνθήκες: pH 7,0 (PBS). Θερμοκρασία: 25 °C. Περιοχή συγκέντρωσης STX: 1×10^{-9} M έως 1×10^{-6} M. Αποκρίσεις που λαμβάνονται σε λειτουργία διακοπτόμενης ροής. Ηλεκτρόδιο αναφοράς: Ag/AgCl. Οι γραμμές σφαλμάτων δηλώνουν τυπική απόκλιση ($n = 3$).

- γ) **Η κλίση της ευαισθησίας** (b) του αισθητήρα είχε τιμή ~ 60 mV ανά δεκάδα συγκέντρωσης και επιβεβαίωσε την αύξηση της δυναμικής τιμής κοντά στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του αναλύτη.
- δ) **Ο συντελεστής μεταβλητότητας** (R^2) του προσδιορισμού ήταν 0.9997 ($n = 27$)
- ε) **Η αναπαραγωγιμότητα** της απόκρισης ήταν 4,2 - 4,8% εντός των αναλύσεων της ημέρας ($n = 30$ και 95,5% όριο εμπιστοσύνης) και 5,5% μεταξύ των ημερών ($n = 12$ και 95,5% όριο εμπιστοσύνης).
- στ) **Η υψηλή ευαισθησία** που επιτεύχθηκε οφείλεται στην υψηλή αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο νανόφυλλων γραφενίου. Προκαταρκτικές έρευνες σχετικά με την απόκριση του αισθητήρα στην τοξίνη, χωρίς την τροποποίηση του γραφενίου, έδειξαν χαμηλή απόδοση με κλίση ευαισθησίας ~ 30 mV ανά δεκάδα συγκέντρωσης, σε μια περιοχή συγκέντρωσης από 10×10^{-8} M έως 10×10^{-6} M (σε pH = 7,0). Η αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο νανόφυλλων γραφενίου προβλέπεται θεωρητικά να είναι ~ 2630 m²/g (Stoller et al., 2008), αν και στην πράξη, τα δίκτυα γραφενίου θα μπορούσαν να φθάσουν σε συγκεκριμένες επιφάνειες ~ 1100 m²/g (Miller, Outlaw and Holloway, 2010; Bo et al., 2013).

Για τον προσδιορισμό της απόκρισης του αισθητήρα με την απουσία του αντισώματος πραγματοποιήθηκαν **τυφλά πειράματα**. Τα πειράματα αυτά έδειξαν κλίση ευαισθησίας ~ 3 mV ανά δεκάδα συγκέντρωσης, σε μια περιοχή συγκέντρωσης από 10×10^{-6} M έως

10×10^{-3} M (σε pH = 7,0). Ως εκ τούτου γίνεται σαφές, ότι η **μη ειδική δέσμευση, δεν αποτελεί κρίσιμο ζήτημα στην αξιοπιστία της απόκρισης.**

Οι βέλτιστες τιμές pH για δέσμευση της STX σε περιοχή της αντι-STX, κυμαίνονταν μεταξύ pH = 3,0 - 8,0 (Hu and Kao, 1991; Bergantin and Sevilla, 2010). **Η απόκριση του αισθητήρα βρέθηκε να αλλάζει με το pH μέτρησης του μέσου εντός της περιοχής 5,8 - 8,0 (σχ.8.5).** Οι χαμηλότερες τιμές pH δεν εξετάστηκαν, καθώς η ηλεκτρική χωρητικότητα των λιπιδικών διπλοστιβάδων είναι σημαντικά μειωμένη σε όξινες συνθήκες (Naumowicz, Figaszewski and Róltorak, 2013). Χαμηλές τιμές παρατηρήθηκαν σε pH 5,8 και 8,0, αλλά μια **βέλτιστη απόκριση** παρατηρήθηκε σε pH 6,4 και παρέμεινε **σταθερή στην τιμή 7,0, η οποία είναι η τιμή pH που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη,** για ζητήματα απλότητας και συμβατότητας. Αυτή η συμπεριφορά δείχνει την εξάρτηση της σύνδεσης της σαξιτοξίνης στο διάλυο ιόντων νατρίου από το pH του διαλύματος. Το pH του διαλύματος είναι αυτό που καθορίζει τον βαθμό πρωτονίωσης των ομάδων γουανιδινίου της STX και συνεπώς τη δέσμευση της με τα καρβοξυλικά υπολείμματα στη θέση σύνδεσης του διαλύου νατρίου (Hu and Kao, 1991; Bergantin and Sevilla, 2010).



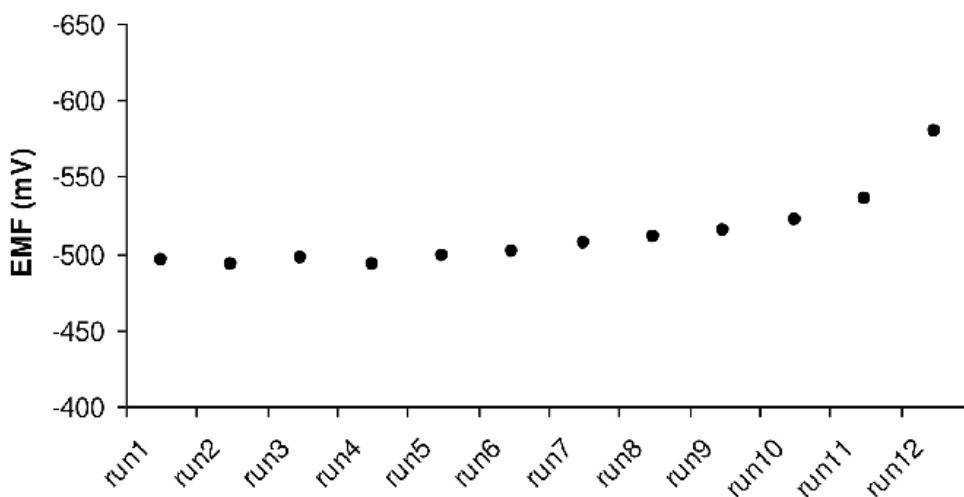
Σχήμα 8.5. Η απόκριση του μικροσκοπικού αισθητήρα για συγκέντρωση 5×10^{-8} M σαξιτοξίνης σε εύρος τιμών pH 5,8 - 8,0.

Η παρούσα χρήση των σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών του βιοαισθητήρα, που στηρίζονται πάνω στο φίλτρο για την ανίχνευση της σαξιτοξίνης, παρέχει ένα σύστημα μέτρησης, στο οποίο το αντίσωμα συνδέεται στη λιπιδική μεμβράνη και αλληλεπιδρά με την τοξίνη κατά τρόπο αντιστρεπτό. Ο βιοαισθητήρας έδειξε χρόνους απόκρισης από 5 έως 20 λεπτά και αυτή η μεταβολή στους χρόνους απόκρισης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της σαξιτοξίνης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τοξίνης (μέχρι $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$), παρατηρήθηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι απόκρισης (μέγιστο 20 λεπτά), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η απόκριση σταθερής κατάστασης επιτυγχάνεται σε μικρότερη χρονική περίοδο (περίπου 5 λεπτά). Η κινητική σύνδεσης του αντισώματος της τοξίνης (Anti-STX) είναι ελαφρώς ευαίσθητη ως προς τη συγκέντρωση της τοξίνης (Sadana and Sadana, 2010). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η βραδεία διάχυση της σαξιτοξίνης στη φάση του αντιδραστηρίου ανίχνευσης, οδηγεί σε μεγαλύτερο χρόνο που είναι όμως απαραίτητος

για να επιτευχθεί ισορροπία σύνδεσης. Οι χρόνοι απόκρισης που καταγράφονται στη μελέτη αυτή (δηλ., από 5-20 λεπτά) συμφωνούν με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Bergantin and Sevilla, 2010; Usleber et al., 1995; Yakes et al., 2011).

Ο παρών αισθητήρας μπορεί να αναγεννηθεί είτε με άπειρη αραιώση, επιτρέποντας να λάβει χώρα διάσπαση με μετακίνηση μάζας ή με τη χρήση χαοτροπικών παραγόντων (Bright, Betts and Litwiler, 1990). Γενικώς οι χαοτροπικοί παράγοντες δρουν για να διασπασούν τα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου προκαλώντας μια μεταβολή στη δομή του αντισώματος που έχει ως αποτέλεσμα εξασθένηση της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο (Locascio-Brown et al., 1990). Η τεχνική μετακίνησης μάζας, μπορεί επί του παρόντος, να εφαρμοστεί με τη χρήση του συστήματος συνεχούς ροής, όπου τα αποσυνδεδεμένα μόρια τοξίνης απομακρύνονται συνεχώς και κατά συνέπεια εμποδίζονται να επανασυνδεθούν με το αντίσωμα. Μια ανταλλαγή (trade-off) έχει δημιουργηθεί μεταξύ του χρόνου αναγέννησης και του ρυθμού ροής. Όσο υψηλότερη είναι η παροχή, τόσο ταχύτερη είναι η αναγέννηση της πλατφόρμας, αλλά και τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να εκπλυθεί το αντίσωμα. Η βέλτιστη τιμή συνεχούς ροής βρέθηκε στα 2,0 mL / λεπτό για 10 λεπτά.

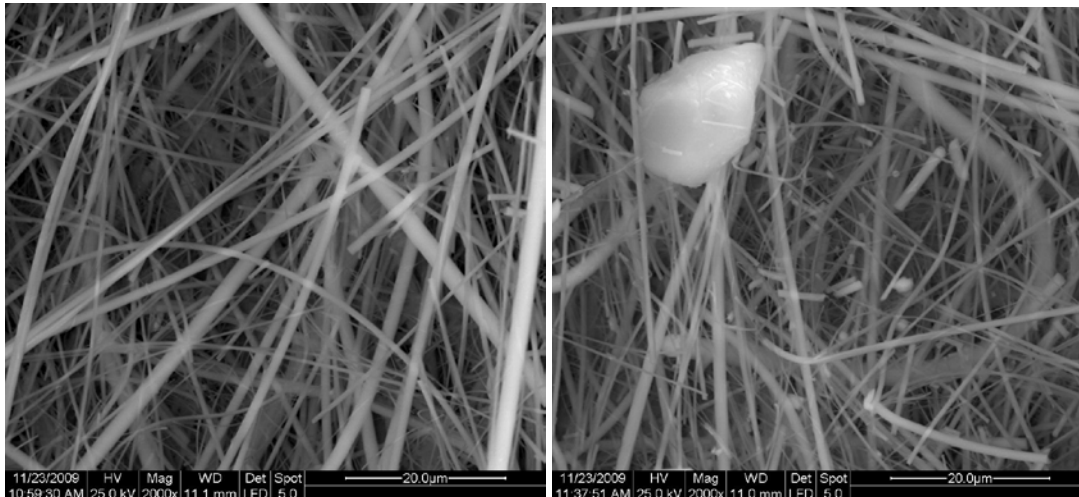
Ο μέγιστος αριθμός των πειραμάτων που θα μπορούσαν να εκτελεστούν ήταν περίπου 10, υπό την προϋπόθεση ότι μετريέται η διαφορά δυναμικού και όχι η απόλυτη τιμή του δυναμικού (σχ. 8. 6). Η απόκριση του αισθητήρα οδηγείται για μεγαλύτερο αριθμό εγχύσεων λόγω της αποσύνδεσης των υποδοχέων από το λιπιδικό φιλμ. Σε κάθε περίπτωση, η πιθανή μετατόπιση του αισθητήρα (απουσία τοξίνης) ήταν $25 \pm 1,6 \mu\text{V} / \text{ώρα}$.



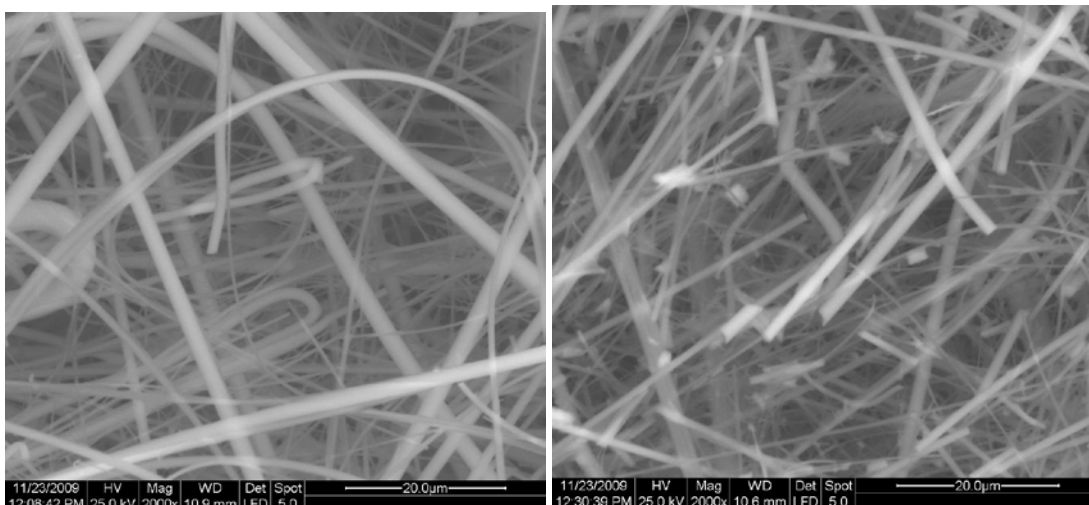
Σχήμα 8.6. Απόκριση αισθητήρα σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις με $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ σαξιτοξίνης ($\text{pH} = 7,0$). Μετά από κάθε απόκριση (που καταγράφηκε σε λειτουργία διακοπτόμενης ροής) ο αισθητήρας αναγεννήθηκε με ρυθμό ροής 2,0 mL/min για 10 λεπτά πριν από την επόμενη έγχυση σαξιτοξίνης.

Για την εκμετάλλευση του μηχανισμού παραγωγής σήματος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα **Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης** (Scanning Electron Microscope, SEM) παρουσία και απουσία της αντι-σαξιτοξίνης (αντι-STX) και της τοξίνης. Οι εικόνες SEM της

δομής του πολυμερούς χωρίς το λιπίδιο (σχ. 8.7A) έδειξαν, ότι η δομή δεν είναι κρυσταλλική. Αντίθετα, παρουσία του λιπιδίου η δομή έγινε κρυσταλλική (σχ.8.7B). Οι εικόνες SEM της δομής του πολυμερούς με το λιπίδιο μετά την ενσωμάτωση της Anti-STX (σχ.8.7C) έδειξαν ότι παρουσία του υποδοχέα η δομή επανέρχεται σε μη κρυσταλλική, όπως της εικόνας 8.7A. Μετά, όμως, από την προσθήκη μιας σταγόνας τοξίνης πάνω στο φίλτρο η δομή έγινε πάλι κρυσταλλική (σχ.8.7D).



(A) (B)



(C) (D)

Σχήμα 8.7. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης: (A) πολυμερές χωρίς το λιπίδιο, (B) πολυμερές μαζί με λιπίδιο, (C) πολυμερές μαζί με λιπίδιο μετά την ενσωμάτωση της Anti-STX, και (D) ίδιο με (C) μετά την απόθεση μιας σταγόνας τοξίνης πάνω στο φίλτρο.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί στη βιβλιογραφία (Zou *et al.*, 2015). Η σαξιτοξίνη έχει καταδείξει την ικανότητα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που διαθέτει με τις λιπιδικές μεμβράνες (Duran-Riveroll *et al.*, 2016), ενώ η σύνδεσή της με αντισώματα προκαλεί δυναμικές αλλαγές διαμόρφωσης (Tobi and Bahar, 2005) που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη ρευστότητα της λιπιδικής μεμβράνης (Schild and Moczydlowski, 1991). Η αλλαγή αυτή στη

δομική φάση του λιπιδικής μεμβράνης μεταβάλλει τα δυναμικά και ηλεκτροστατικά της επιφάνειας της μεμβράνης και επιπλέον τη ρευστότητα της μεμβράνης, με συνέπεια να προκύπτουν αλλαγές σε ενδεχόμενες μεταβολές του δυναμικού.

8.9 Εφαρμογή σε προσομοιωμένα και πραγματικά δείγματα νερού

Η καταλληλότητα του αισθητήρα που αναπτύχθηκε για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων, διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας προσομοιωμένα δείγματα για διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων επτά πιθανών παρεμποδίσεων (ιοντικών ενώσεων), που συνήθως συναντώνται στα νερά της λίμνης (Πίνακας 1). Κάθε είδος εξετάστηκε μεμονωμένα σε όλη την αναφερόμενη περιοχή, αλλά και σε μείγματα των ειδών, με πρόσφατα παρασκευασμένους αισθητήρες. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές παρεμποδίσεις από την παρουσία αυτών των ενώσεων, είτε μεμονωμένα είτε στα μείγματα. Σε όλες τις περιπτώσεις το σχετικό σφάλμα δεν υπερέβη το 5%.

Το νερό από τη λίμνη Κουμουνδούρου είναι ένα κατάλληλο πραγματικό δείγμα μήτρας για τον έλεγχο της δυνατότητας εφαρμογής του αισθητήρα για περιβαλλοντικά δείγματα. Η μικροβιολογική και χημική ποιότητα της λίμνης έχει διερευνηθεί από προηγούμενη έρευνα (*Dimitriou et al., 2008*) επιβεβαιώνοντας την απουσία βακτηριακών τοξινών. Για την αξιόπιστη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μήτρας και για να αποφευχθεί η μεταβλητότητα στις ανακτήσεις από τη διαδικασία εξαγωγής, **τα δείγματα νερού μετά τη διήθηση εμβολιάστηκαν με τοξίνη**. Πέντε (5) δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου χαμηλού επιπέδου με συγκέντρωση σαξιτοξίνης 50 nM, και τα υπόλοιπα πέντε (5) ως δείγματα ελέγχου υψηλού επιπέδου με συγκέντρωση σαξιτοξίνης 1mM.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν αμέσως μετά την προετοιμασία τους στο ίδιο αισθητήρα, χρησιμοποιώντας τη γραφική παράσταση βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο σχήμα 8.4. και με το σχήμα των 10 λεπτών αναγέννησης του αισθητήρα που περιγράφηκε παραπάνω (σχ.8.6). Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων νερού της λίμνης παρουσιάζονται ως % καθαρής ανάκτηση στον Πίνακα 2 (*Burns, Danzer and Townshend, 2002*). Η ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ 90-106% για τη χαμηλή συγκέντρωση και 95-102% για την υψηλή συγκέντρωση.

Για να αξιολογηθεί η μεταβλητότητα ανάκτησης της διαδικασίας εκχύλισης, έξι **δείγματα νερού λίμνης εμβολιάστηκαν με 1 μM σαξιτοξίνης πριν από τη διήθηση** τους και αναλύθηκαν σε πρόσφατο παρασκευασμένο αισθητήρα, χρησιμοποιώντας την ίδια γραφική παράσταση βαθμονόμησης (σχ. 8.4) και αναγέννησης του αισθητήρα (σχ. 8.6). Αν και παρατηρήθηκε ελαφρώς υψηλότερη μεταβλητότητα (σε σύγκριση με τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί μετά τη διήθηση), η ανάκτηση κυμάνθηκε μεταξύ 92-103% (Πίνακας 8.2). Σύμφωνα με τις οδηγίες ICH του 2006 για την αναλυτική επικύρωση Q2 (R1), ([http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\)](http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1))) καθαρές ανακτήσεις 80-115% είναι αποδεκτές. Τιμές μεγαλύτερες από 100% αποτελούν την αναμενόμενη θετική πλευρά του μέσου όρου μιας τυπικής κατανομής αναλυτικών αποτελεσμάτων από αναλύτες, που βρίσκονται στο 100% ή κοντά στο 100%, οι οποίες όμως ισορροπούνται με

ισοδύναμα αποτελέσματα στην αρνητική πλευρά του μέσου όρου. Οι υψηλές ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν στην παρούσα μελέτη, ειδικότερα στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης τοξινών, δείχνουν μια σχεδόν πλήρη ισορροπία μάζας του αναλύτη ανάκτησης, δηλαδή (για παράδειγμα) μια καλή ευθυγράμμιση της συγκέντρωσης της τοξίνης και της βαθμονόμησης. Δεν παρατηρήθηκαν θετικές ή αρνητικές τάσεις, ενδεικτικές τυποποιημένων σφαλμάτων και στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης της σαξιτοξίνης. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τα δεδομένα **αναλυτικής ανάπτυξης της μεθόδου**, αποδεικνύοντας έτσι την καταλληλότητα του μικροαισθητήρα για επαναλαμβανόμενη παρακολούθηση δειγμάτων ύδατος.

Πίνακας 8.2. Ανίχνευση της σαξιτοξίνης (STX) σε εμβολιασμένα δείγματα νερού λίμνης με ποτενσιομετρικό μικροαισθητήρα που στηρίζεται σε λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένη αντι-STX πάνω με νανόφυλλα γραφενίου.

Επίπεδα προσθήκης STX στα δείγματα νερού	# Δείγμα ID	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση STX \pm SD, (n=3)	% Ανάκτηση (υπολογισμένη τιμή/τιμή αναφοράς)
Εμβολιασμένα δείγματα μετά τη διήθηση			
Χαμηλή προσθήκη (50 nM)	#1	45,05 nM (\pm 3,60)	90,10
	#2	53,00 nM (\pm 4,24)	106,0
	#3	46,15 nM (\pm 3,70)	92,30
	#4	51,25 nM (\pm 4,10)	102,5
	#5	45,35 nM (\pm 3,63)	90,70
Υψηλή προσθήκη (1 μ M)	#6	0,967 μ M (\pm 0,048)	96,70
	#7	1,010 μ M (\pm 0,060)	101,0
	#8	0,955 μ M (\pm 0,030)	95,50
	#9	1,018 μ M (\pm 0,060)	101,8
	#10	0,988 μ M (\pm 0,070)	98,80
Εμβολιασμένα δείγματα πριν τη διήθηση			
Υψηλή προσθήκη (1 μ M)	#11	1,007 μ M (\pm 0,076)	100,7
	#12	0,970 μ M (\pm 0,046)	97,00
	#13	1,013 μ M (\pm 0,076)	101,3
	#14	0,967 μ M (\pm 0,057)	96,70
	#15	0,973 μ M (\pm 0,107)	97,30
	#16	1,003 μ M (\pm 0,080)	100,3

8.10 Εφαρμογή σε δείγματα οστρακοειδών

Ο αισθητήρας έχει επικυρωθεί σε δείγματα οστρακοειδών γλυκού νερού (μύδια, μαλάκια και στρείδια) που αγοράστηκαν νωπά από την τοπική αγορά. Τα δείγματα εξετάστηκαν αμέσως με ένα εμπορικό προϊόν ελέγχου (κιτ) ELISA και βρέθηκαν απαλλαγμένα από τοξίνες. Μετά την εκχύλιση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην αναφορά (Zhang and Zhang, 2012), τα δείγματα εμβολιάστηκαν με διάλυμα σαξιτοξίνης για να παρουσιάσουν συγκέντρωση διηθήματος 8 nM (ισοδύναμη με 0,5 μg τοξίνης/ g οστρακοειδών). Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν αμέσως μετά την προετοιμασία τους στον ίδιο αισθητήρα, χρησιμοποιώντας τη γραφική παράσταση βαθμονόμησης του σχήματος 8.4, και του σχήματος αναγέννησης των 10 λεπτών του αισθητήρα (σχ.8.6). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3.

Πίνακας 8.3. Ανίχνευση σαξιτοξίνης σε εμβολιασμένα δείγματα οστρακοειδών γλυκού νερού (με 8 nM τοξίνης), χρησιμοποιώντας τον ποτενσιομετρικό μικροαισθητήρα που στηρίζεται σε λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένη αντι-STX πάνω με νανόφυλλα γραφενίου.

Είδη οστρακοειδών	#Δείγμα ID	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση STX \pm SD, (n=3)	Ανάκτηση% (παρατηρούμενη τιμή / τιμή αναφοράς)
Μύδια	#1	8,28 nM (\pm 0,40)	103,5
>>	#2	8,40 nM (\pm 0,60)	105,0
>>	#3	8,37 nM (\pm 0,25)	104,6
Μαλάκια	#1	8,34 nM (\pm 0,92)	104,2
>>	#2	8,54 nM (\pm 0,51)	106,8
>>	#3	8,46 nM (\pm 0,42)	105,7
Στρείδια	#1	8,53 nM (\pm 0,34)	106,6
>>	#2	8,23 nM (\pm 0,08)	102,9
>>	#3	8,27 nM (\pm 0,17)	103,4

Ο αισθητήρας έδωσε σταθερά υψηλότερες τιμές, πιθανώς λόγω των επιδράσεων που προκαλούνται από τη μήτρα των δειγμάτων. Ωστόσο, η μέγιστη απόκλιση που παρατηρήθηκε ήταν μόνο 6,8%, καθιστώντας τον αισθητήρα ικανό να μετρά μολυσμένα και πολύπλοκα δείγματα επί του πεδίου αγοράς και παραγωγής. Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της οργανικής ύλης πρέπει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερο βάθος και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη θα πρέπει να επαληθευτούν περαιτέρω με περισσότερα δείγματα οστρακοειδών. Επιπλέον, πρέπει να εκτιμηθούν οι απώλειες τοξινών και η μεταβλητότητα ανάκτησης λόγω της διαδικασίας εκχύλισης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αναμένεται υψηλή μεταβλητότητα και σημαντικές απώλειες (μέχρι 10%) τόσο για την ενδοκυτταρική (Mackenzie, 2010) όσο και για την εξωκυτταρική (Rundberget et al., 2007) περιεκτικότητα σε τοξίνες.

8.11 Συμπεράσματα βιοαισθητήρα σαξιτοξίνης

Στην παρούσα ενότητα περιγράφεται η κατασκευή ενός νέου μικροσκοπικού βιοαισθητήρα, βασισμένου πάνω σε μια σταθεροποιημένη με πολυμερές λιπιδική μεμβράνη και ένα ενσωματωμένο αντίσωμα σαξιτοξίνης που είναι συσκευασμένο σε νανόφυλλα γραφενίου. Ο αισθητήρας παρουσιάζει μεγάλη διάρκεια ζωής και επαρκή λειτουργική σταθερότητα για περιβαλλοντική ανάλυση και ανάλυση τροφίμων. Ο αισθητήρας έχει επικυρωθεί για την ανίχνευση σαξιτοξίνης σε δείγματα νερού και οστρακοειδών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις της αντι-STX-σαξιτοξίνης, που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη, μπορούν να χρησιμεύσουν ως ένα κατάλληλο μοντέλο για την ανάπτυξη σχημάτων ανίχνευσης για άλλες τοξίνες που μπλοκάρουν, όπως η μπεβετοξίνη, η παλιτοξίνη ή σιγκουατοξίνη

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου που περιγράφηκε είναι οι ταχείς χρόνοι απόκρισης (5-20 λεπτά, ανάλογα με τη συγκέντρωση τοξινών) και τα επίπεδα ναυομοριακής ανίχνευσης, χωρίς σημαντική παρεμπόδιση από άλλα συστατικά του νερού. Η επιφάνεια του βιοαισθητήρα μπορεί εύκολα και αναπαραγωγίμως να παρασκευαστεί και να ανανεωθεί. Η διεπαφή της λιπιδικής μεμβράνης στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα παρέχει ένα βιοσυμβατό περιβάλλον, που έχει αποδειχθεί ευεργετικό στο να αντιστέκεται στη μη ειδική προσρόφηση ανιοντικών και κατιοντικών ειδών, εξασφαλίζοντας έτσι ένα χαμηλό υπόβαθρο σήμα στην ανάλυση. Ο προτεινόμενος αισθητήρας εμφανίζει καλή αναπαραγωγικότητα, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης και εκλεκτικότητα μαζί με υψηλή ευαισθησία $\sim 60 \text{ mV} / \text{δεκάδα συγκέντρωσης}$ σε ένα ευρύ λογαριθμικό εύρος συγκεντρώσεων σαξιτοξίνης που κυμαίνεται από $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ έως $1 \times 10^{-6} \text{ M}$. Το προτεινόμενο σχήμα εύκολα μπορεί να συσκευάζεται σε ένα φορητό ανιχνευτή πεδίου για ταχεία προκαταρκτική αξιολόγηση της ποιότητας του νερού, όσον αφορά επιμολύνσεις που είναι απειλητικές για τη ζωή και επιθέσεις βιοτρομοκρατίας.

Γ. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

9 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

9.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, χρησιμοποιώντας σταθεροποιημένη πολυμερισμένη λιπιδική μεμβράνη με υποδοχέα ABP1 ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου γραφενίου/χαλκού. Ο βιοαισθητήρας εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της συνθετικής φυτικής ορμόνης ναφθαλινοξικού οξέος (NAA) σε πραγματικά δείγματα φρούτων/χυμών φρούτων και λαχανικών, καθώς και σε εμβολιασμένα με NAA αιωρήματα δείγματα φρούτων /λαχανικών παρασκευασμένων σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7. Τα αιωρήματα των πραγματικών ως έχουν δειγμάτων και τα εμβολιασμένα με NAA δείγματα εγχύθηκαν στον βιοαισθητήρα με τη μέθοδο της σταθερής ροής (flow injection). Η τεχνική δοκιμάστηκε ποτενσιομετρικά και τα αποτελέσματα συγκρινόμενα με προηγούμενη σχετική δημοσίευση οπτικού βιοαισθητήρα (Nikolelis et al., 2008b) βελτίωσε τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής του για τουλάχιστον 10 προσδιορισμούς, έναντι ενός, ενώ το όριο ανίχνευσης διατηρήθηκε στο ίδιο επίπεδο των 10nM. Όσον αφορά τον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα (Nikolelis et al., 2008a) έχει κατώτερο όριο ανίχνευσης από 12 έως 15 nM για φρούτα και λαχανικά αντίστοιχα και περιορισμένη γραμμική περιοχή της καμπύλης συγκέντρωσης 50×10^{-7} έως 10×10^{-4} , ενώ έχει τον ίδιο χρόνο απόκρισης των 5 λεπτών. Άλλες δημοσιεύσεις κατασκευής βιοαισθητήρων που να αναφέρονται στην ανίχνευση του NAA δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Οι κύριες μέθοδοι ανίχνευσης της ορμόνης αναφέρονται σε συμβατικές μεθόδους με κυρίαρχες τη Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), το Φθορισμό (F) και το Φωσφορισμό σε θερμοκρασία δωματίου (RTP). Η σύγκριση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα που αναπτύχθηκε, ως προς συμβατικά όργανα και τις μεθόδους ανάλυσης (πίνακας 9.1), φανερώνει την καλή αξιοπιστία του βιοαισθητήρα. Σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος κατασκευής και τον εύκολο χειρισμό από μη εξειδικευμένο προσωπικό, δίνεται η δυνατότητα εξέλιξης του βιοαισθητήρα σε φορητή συσκευή για ανίχνευση στο χώρο ή στο πεδίο, γεγονός που δεν έχει επιχειρηθεί έως σήμερα και δεν μπορεί να γίνει με τις χρωματογραφικές τεχνικές και άλλες μεθόδους του πίνακα 9.1 (HPLC, GC, F, RTP).

Ο δεύτερος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε με την ίδια μεθόδευση κατασκευής χρησιμοποιώντας μήτρα γραφενίου/χαλκού και ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη όπου είχε εγκολληθεί ο υποδοχέας anti-STX. Ο βιοαισθητήρας αυτός εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της τοξίνης Σαξιτοξίνης (STX) σε δείγματα οστρακοειδών και σε πραγματικά δείγματα νερού λίμνης εμβολιασμένα με τοξίνη. Το αιώρημα που προέκυψε από τη σάρκα των οστρακοειδών με τη βοήθεια οξικού οξέος 0,1M και τα δείγματα νερού διαχύθηκαν στο βιοαισθητήρα με τη μέθοδο έγχυσης ροής.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η τεχνική κατασκευής του βιοαισθητήρα με τη συνδυασμένη μέθοδο ανίχνευσης της ποτενσιομετρίας δοκιμάστηκε πρώτη φορά για τον προσδιορισμό της Σαξιτοξίνης. Οι μελετηθείσες παράμετροι του βιοαισθητήρα όπως το όριο ανίχνευσης, ο χρόνος απόκρισης και η γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων σε σύγκριση με βιοαισθητήρες άλλων μεθόδων δείχνουν την καλή αξιοπιστία του βιοαισθητήρα όπως φαίνεται στον πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.1. Σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους ανίχνευσης NAA.

Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης	Γραμμική περιοχή	% ανάκτηση	Αναφορές
HPLC (UV)	6,28 μM	10-125 μM	94-103	(Ma et al., 2008)
LC-MS/MS	10-125 μM	$<9,4 \times 10^{-3} \mu\text{M}$	67	
Τριχοειδής χρωματογραφία	0,077 $\mu\text{g/mL}$	6-0,1 $\mu\text{g/mL}$	92-108	(Liu, Zhong and Lu, 2002)
Κυκλική Βολταμετρία ιοντικού υγρού (RTILs)	$1,69 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$	$2 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$	97- 107	(Duan, Zhang and Gao, 2012)
Φωσφορισμός (RTP)	1,2 ng/mL	έως 500 nm/mL	97-108	(Fernandez-Arguelles et al., 2005)
Φωσφορισμός (RTP)	$1,35 \times 10^{-7} \text{ M}$	$2 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-4} \text{ M}$	95-104	(Zhu, Wang and Wang, 2005)
HPLC (F)	1,7-2,6 nM	0,0125-6,35 μmol	94-104	(Li et al., 2015).
Ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας	10 nM	$50 \times 10^{-9} - 10 \times 10^{-6} \text{ M}$	95-102	(παρούσα μελέτη)

Πίνακας 9.2. Σύγκριση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης της STX

Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης	Γραμμική περιοχή	Ανάκτηση %	Αναφορές
Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR)	5–10 ng/mL	10-500 ng/mL	87-104	(Fonfria et al., 2007)
Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR)	1,7-2 ng/mL	5-1000 ng/mL	92-108	(Campbell et al., 2011)
Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (LSPR) με απταμερές	2,46 $\mu\text{g/L}$	5-10.000 $\mu\text{g/L}$	96-116	(Ha et al., 2019)
Κυτταρική	0,1 nM	1–1000 nM	-	(Zou et al., 2015)
Αμπερομετρική με απταμερές	0,38 nM	0,9-30 nM	91-107	(Hou et al., 2016).
Φθορισμομετρική	0,3 $\mu\text{g/L}$	2-100 $\mu\text{g/L}$	89-102	(Ha et al., 2019)
Ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας	1 nM	$10 \times 10^{-8} - 10 \times 10^{-6} \text{ M}$	93-106	Παρούσα μελέτη

Ο απλός τρόπος κατασκευής του βιοαισθητήρα σε συνδυασμό με την ποτενσιομετρική μέθοδο ανίχνευσης καλύπτει πολλά από τα χαρακτηριστικά των αναφορών του πίνακα II. Το όριο ανίχνευσης ($LOD=1 \text{ nM}$) είναι σχετικά χαμηλότερο από τις τρεις πρώτες αναφορές (μετά από αναγωγή των μονάδων), αλλά υψηλότερο από τις άλλες αναφορές που το όριο τους προσεγγίζει στην περιοχή των μM . Επίσης ο βιοαισθητήρας υπερτερεί έναντι των άλλων στο χρόνο απόκρισης (5 λεπτά) και στην εύκολη αναγέννησή του (10 φορές χρήση) χωρίς να μειωθεί η δραστηριότητά του. Οι ανακτήσεις σε προσομοιωμένα δείγματα νερού και πραγματικά δείγματα οστρακοειδών 93-106% είναι καλύτερες από όλες σχεδόν τις πηγές αναφοράς του πίνακα II. Όλα τα ανωτέρω πιστοποιούν την καταλληλότητα του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της STX όχι μόνο στα οστρακοειδή, αλλά και σε άλλα αλιεύματα που τρέφονται με άγλη (ψάρια, μαλάκια).

Οι μορφολογικές πλευρές και η κρυσταλλική ποιότητα των νανόφυλλων του γραφενίου που παρασκευάστηκαν έχει μελετηθεί πρόσφατα στον ίδιο εργαστηριακό χώρο της παρούσης έρευνας (Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας ΕΜΠ) με πειράματα AFM και TEM και συσκευή Model SA2000 (Chalmers Science Park, SE-41288, Göteborg, Sweden), οπότε δεν χρειάστηκε να γίνουν νέα πειράματα και τα αποτελέσματα αυτά ελήφθησαν ως δεδομένα (Nikoleli et al., 2012; Νικολέλη, 2015). Ειδικότερα μέσω της AFM το πάχος των νανόφυλλων βρέθηκε πολύ λεπτό της τάξεως των nm (που δίνει το πλεονέκτημα του ταχέως χρόνου απόκρισης του αισθητήρα), και μέσω της TEM επιβεβαιώθηκε το μικρό πάχος των νανόφυλλων και η ομοιόμορφη κρυσταλλική δομή (που έχει ως αποτέλεσμα την καλή επαναληψιμότητα).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, προκύπτει ότι αναπτύχθηκε για πρώτη φορά ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της Σαξιτοξίνης στο νερό και σε οστρακοειδή με μοναδική τεχνική κατασκευής και με πολύ ικανοποιητικές λειτουργικές επιδόσεις. Η ανάπτυξη του βιοαισθητήρα για το Ναφθαλινικό Οξικό Οξύ έγινε για πρώτη φορά ποτενσιομετρικά και βελτίωσε σε σημαντικά σημεία οπτικό βιοαισθητήρα ανάλογης κατασκευής. Τα **πλεονεκτήματα** των συγκεκριμένων βιοαισθητήρων σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές μεθόδους είναι:

- (α) η εύκολη κατασκευή τους
- (β) οι φθηνές πρώτες ύλες
- (γ) η ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων
- (δ) η ταχεία ανίχνευση του αναλύτη και
- (δ) η χρήση μη ειδικευμένου προσωπικού.

9.2 Προοπτικές

Η ανάγκη για ταχείες, ευαίσθητες και αξιόπιστες μεθόδους ικανές να εγγυηθούν την ασφάλεια των αλιευμάτων και την προστασία των καταναλωτών ευνόησε την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση θαλάσσιων τοξινών. Χάρη στην ικανότητά τους να αναλύουν πολύπλοκα δείγματα, η ευκολία στη χρήση, η φορητότητα

και οι χαμηλού κόστους ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν αναδειχθεί ως υποσχόμενα βιοαναλυτικά εργαλεία στον τομέα ανίχνευσης και προσδιορισμού της θαλάσσιας τοξίνης.

Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη βελτίωση ορισμένων χαρακτηριστικών απόδοσης του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα Σαξιτοξίνης, όπως η μείωση του ορίου ανίχνευσης σε ακόμα χαμηλότερα επίπεδα, λόγω και της αναθεώρησης των θεσμοθετημένων ορίων ανοχής της τοξίνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ομοίως η διεύρυνση της δυναμικής περιοχής της καμπύλης θα διευκολύνει τον εντοπισμό των πραγματικών ορίων ανίχνευσης.

Με βάση τις αρχές κατασκευής των βιοαισθητήρων αυτών που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, είναι δυνατόν με αλλαγή του «υποδοχέα» ή των συνθηκών μέτρησης, να κατασκευαστούν παρόμοιοι βιοαισθητήρες για την ανίχνευση κι άλλων τοξικών ουσιών ή παραγώγων της φυτικής ορμόνης 3-ινδολο-οξικού οξέος.

Η μετεξέλιξη των συγκεκριμένων βιοαισθητήρων με την ενσωμάτωσή τους σε φορητή ηλεκτρονική ψηφίδα (τσιπ) θα αποτελέσει αποφασιστικό βήμα στην προστασία των καταναλωτών με δεδομένο την επιτόπια ανίχνευση τοξινών ή αυξητικών ορμονών κατά τον υγειονομικό έλεγχο στην αγορά τροφίμων ή στον αγρό.

Επιπλέον, είναι δυνατή υπό προϋποθέσεις (κυρίως οικονομικές) η μαζική παραγωγή των βιοαισθητήρων αυτών.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmad, R., Tripathy, N., Jang, N. K., Khang, G., and Hahn, Y-B. (2015). Fabrication of highly sensitive uric acid biosensor based on directly grown ZnO nanosheets on electrode surface. *Sensors and Actuators B: Chemical* **206**, 146–151.
- Ahuja, D and Parande, D. (2012). Optical sensors and their applications. *Journal of Scientific Research and Reviews* **1** (5), 060-080.
- Akhavan, O., Ghaderi, E., and Rahighi, R. (2012). Toward single-DNA electrochemical biosensing by graphene nanowalls. *ACS Nano* **6**, 2904–2916.
- Alberts, B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walte, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition, Ch.10 pp. 617-650 & Ch. 11 pp. 651-654. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Al-Hardan, N. F., Hamid, A. A., Shamsudin, R., Othman, N. K. and Keng, L. K. (2016). Amperometric non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on aligned zinc oxide nanorods. *Sensors* **16** (7), 1004- doi:10.3390/s16071004
- Ali, J., Najeeb, J., Ali, M. A., Aslam, M. F., and Raza, A. (2017). Biosensors: Their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications. A review. *Journal of Biosensors and Bioelectronics* **8** (1), 1-9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
- Ali, S. U., Kashif, M., Ibutoto, Z. H., Fakhar-e-Alam, M., Hashim, U., and Willander, M. (2011). Functionalised zinc oxide nanotube arrays as electrochemical sensors for the selective determination of glucose. *Micro and Nano Letters* **6** (8), 609-613.
- Alocilja, E. C., Radke, S. M. (2003) Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 841–846.
- Ambrosi, A., Sasaki, T., and Pumera, M. (2010). Platelet Graphite Nanofibers for Electrochemical Sensing and Biosensing: The Influence of Graphene Sheet Orientation. *Chemistry An Asian Journal* **5** (2), 266-271.
- Andersen, O. S., Koeppe, II., and Roger, E. (2007). Bilayer thickness and membrane protein function: An energetic perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **36** (1), 107–130.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., and Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* **25** (4), 704-726.
- Andreou, V. G., and Nikolelis D. P. (1998). Flow injection monitoring of aflatoxin M1 in milk and milk preparations using filter-supported bilayer lipid membranes. *Analytical Chemistry* **70**, 2366–2371.
- AOAC Official Method 2005.06. (2005). *Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection*. AOAC International. Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC Official Method 2011.02. (2011). *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in mussels, clams, oysters and scallops. Post-column oxidation method (PCOX)*. AOAC International. Gaithersburg, MD, USA.
- Aral, H., Aral, T., Ziyadanogulları, B., Ziyadanogulları, R. (2013). Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones. *Talanta* **116**, 155–163.

- Artiles, M. S., Rout, C. S., and Fisher, T. S. (2011). Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63** (14-15), 1352-1360.
- Arya, A., Krull, U. J., and Thomson, M. (1985). Langmuir-Blodgett deposition of lipid films on hydrogel as a basis for biosensor development. *Analytica Chimica Acta* **173**, 331-336.
- Arya, S. K., Saha, S., Ramirez-Vick, J. E., Gupta, V., Bhansali, S., and Singh, S. P. (2012). Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications. *Analytical Chimica Acta* **737**, 1-21.
- Atanasov, V., Atansova, P. P., Vockenroth, I. K., Knorr, N., and Köper, I. (2006). A molecular toolkit for highly insulating tethered bilayer lipid membranes on various substrates. *Bioconjugate Chemistry* **17** (3), 631-637.
- Atta, N. F., Galal, A., and Ekram, H. El-Ads. (2015). Graphene-a platform for sensor and biosensor applications. In: *Biosensors-Micro and Nanoscale Applications*, T. Rinken (ed.), Ch. 2, pp.37-87. InTech <http://dx.doi.org/10.5772/60676>
- Avan, A. A. and Filik, H. (2018). Electrochemical determination of dopamine using a graphene-screen-printed carbon electrode with magnetic solid-phase microextraction. *Analytical Letters* **51** (16), 2626-2642.
- Badescu, G. O., and Napier, R. M. (2006). Receptors for auxin: will it all end in TIRs?. *Trends in Plant Science* **11** (5), 217-223.
- Badhulik, S., Terse-Thakoor, T., Villarreal C., and Mulchandani, A. (2015). Graphene hybrids: synthesis strategies and applications in sensors and sensitized solar cells. *Frontiers in Chemistry* **3** (article 38), 1-19.
- Bai, Y., Du, F., and Liu, H. (2010). Determination strategies of phytohormones: Recent advances. *Analytical methods* **2** (12), 1867-1873.
- Bakker, E., and Qin, Y. (2006). Electrochemical sensor. *Analytical Chemistry* **78** (12), 3965–3984.
- Barkawi, L. S., Tam, Y. Y., Tillman, J. A., Pederson, B., Calio, J., Al-Amier, H., Emerick, M., et al. (2008). A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Analytical Biochemistry* **372**, 177–188.
- Bavi N., Nakayama Y., Bavi O., Cox C. D., Qin Q-H., and Martinac, B. (2014). Biophysical implications of lipid bilayer rheometry for mechanosensitive channels. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **111** (38), 13864–13869.
- Belluzo, M. S., Ribone, M. E., and Lagier, C. M. (2008). Assembling amperometric biosensor for clinical diagnostics. *Sensor* **8** (3), 1366-1399.
- Benvidi, A., Rajabzadeh, N., Mazloum-Ardakani, M., Heidari M. M., and Mulchandani, A. (2014). Simple and label-free electrochemical impedence Amelogenin gene hybridization biosensing based on reduced graphene oxide. *Biosensor of Bioelectronics* **58**,145–152.
- Bergantin, J. H., and Sevilla, F III. (2010). Quartz crystal microbalance biosensor for saxitoxin based on immobilized sodium channel receptors. *Analytical Letters* **43** (3), 476–486.
- Berggren, C., Biarnason, B., and Johansson, G. (2001). Capacitive biosensors. *Electroanalysis* **13** (3), 173-180.
- Bernstein, R. (1985). Improving the accuracy of blood glucose meters that use enzymatic reagent strips. *Diabetes Care* **8** (1), 101-102.
- Bianco, A., Cheng, H.-M., Enoki, T., Gogotsi, Y., Hurt, R. H., Koratkar N., Kyotani T., et al. (2013). All in the graphene family—A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon* **65**, 1–6.
- Bier, F. F., and Schmid R. D. (1994). Real time analysis of competitive binding using grating coupler immunosensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics* **9**, 125-130.

- Bier, F. F., Jockers, R., and Schmid, R. D. (1994). Integrated optical immunosensor for s-triazine determination: regeneration, calibration and limitations. *Analyst* **119**, 437-441.
- Bloom, M, Evans E., and Mouritsen, O. G. (1991). Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* **24** (3), 293-397.
- Bo, Z., Yang, Y., Chen, J., Yu, K., Yana, J., and Cena, K. (2013). Plasma-enhanced chemical vapor deposition synthesis of vertically oriented graphene nanosheets. *Nanoscale* **5** (12), 5180-5204.
- Boggs, J. M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochimica et Biophysica Acta* **906** (3), 353-404.
- Borochoy-Neori, H., Yavin, E., and Montal, M. (1984). Tetanus toxin forms channels in planar lipid bilayers containing gangliosides. *Biophysical Journal* **45** (1), 83–85.
- Bouse, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **34**, (1-3), 270-275.
- Brade, H., Opal, S. M., Vogel, S. N. and Morisson, D. C. (1999). *Endotoxin in Health and Disease*. Markel Dekker, Inc. New York.
- Bratakou, S., Nikoleli, G-P., Nikolelis, D. P., and Psaroudakis, N. (2015). Development of a potentiometric chemical sensor for the rapid detection of carbofuran based on air stable lipid films with incorporated calix[4]arene phosphoryl receptor using graphene electrodes. *Electroanalysis* **27** (11), 2608–2613.
- Bratakou, S., Nikoleli, G-P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., and Tzamtzis, N. (2016). Electrochemical biosensor for naphthalene acetic acid in fruits and vegetables based on lipid films with incorporated auxin-binding protein receptor using graphene electrodes. *Electroanalysis* **28**, 2171–2177.
- Bratakou, S., Nikoleli, G-P., Siontorou, G. C., Nikolelis, D. P., Karapetis, S., and Tzamtzis, N. (2017). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of saxitoxin based on air stable lipid films with incorporated Anti-STX using graphene electrodes. *Electroanalysis* **29** (4), 990–997
- Brennan, J. D, Nikolelis D. P., and Krull U. J. (1993b). Physical Processes of Signal Transduction by Lipid Membranes: Analytical Applications in Biosensor Technology. In: *Current Topics in Biophysics*, Frangopol, P. T. (ed.), vol. **2**, pp. 139-198. A.I. Cuza University Press, Iasi, Romania.
- Bright, F. V., Betts, T. A., and Litwiler, K. S. (1990). Regenerable fiber-optic-based immunosensor. *Analytical Chemistry* **62** (9), 1065-1069.
- Buck, R. P. (1990). Sensor issues for the 1990s: Physical an introduction to the North Carolina Section American Chemical Society Symposium on biosensors. In: *Biosensor technology: Fundamentals and applications*, R. P. Buck, W. H.
- Buck, R. P., and Lindner, E. (1994). Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry* **66** (12), 2527–2536.
- Buenger, D., Topuz, F., and Groll, J. (2012). Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science* **37**, 1678-1719.
- Burns, D. T., Danzer, K., and Townshend, A. (2002). Use of the terms «recovery» and «apparent recovery» in analytical procedures. *Pure and Applied Chemistry* **74** (11), 2201-2205.
- Buryakov, I. A., Buryakov I. T., and Matsayev, V. T. (2016). Electrical, electrochemical, and thermometric sensors for the detection of explosives. *Journal of Analytical Chemistry* **71** (3), 234-242.
- Butwong, N., Zhou, L., Ng-eontae, W., Burakham, R., Moore, E., Srijaranai, S., Luong, J. H. T., and Glennon, J. D. (2014). A sensitive nonenzymatic hydrogen peroxide sensor using cadmium oxide

nanoparticles/multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **717-718**, 41-46.

Cammann, K., Guibault, E. A., Hall, H., Kellner, R., and Wolfbeis, O. S. (1996). The Cambridge Definition of Chemical Sensors. In: *Proceedings of the Cambridge Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*. Cambridge University Press, New York.

Campbell, K., McGratha, T., Sjölanderb, S., Hansonb, T., Tidareb, M., Janssonb, Ö., Mobergb, A., et al. (2011). Use of a novel micro-fluidic device to create arrays for multiplex analysis of large and small molecular weight compounds by surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 3029–3036.

Cao, Z-Y., Sun, L-H., Mou, R-X., Zhang, L-P., Lin, X-Y., Zhu, Z-W., and Chen, M-X. (2016). Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1451**, 67–74.

Carr, J. J. (1993). *Sensors and Circuits: Sensors, transducers, and supporting circuites for electronic instrumentation, measurement and control*. PTR Prentice Hall.

Carr, P. W., and Bowers, L. D. (1980). *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*. John Wiley, New York.

Castellana, E. T., and Cremer, P. S. (2006). Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* **61** (10), 429–444.

Cestele, S., and Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **82** (9-10), 883-892.

Chan, Y-H. M., and Boxer, S. G. (2007). Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **11** (6), 581–587.

Chen, H., Kim, Y. S., Keum, S. R., Kim, S-H., Choi, H-J., Lee J., An, W. G., and Koh, K. (2007). Surface Plasmon Spectroscopic Detection of saxitoxin. *Sensors* **7**, 1216–1223.

Ciesielskia, A., and Samori, P. (2014). Graphene via sonication assisted liquid-phase exfoliation. *Chemical Society Reviews* **43**, 381-398.

Clark, L. C., and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29-45.

Cogal, S. (2018). Electrochemical determination of dopamine using a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-reduced graphene oxide-modified glassy carbon electrode. *Analytical Letters* **51** (11), 1666-1679.

Coronado, R., and Latorre, R. (1983). Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. *Biophysical Journal* **43**, 231–236.

Cusick, K. D., and Sayler, G. S. (2013). An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs* **11** (4), 991-1018.

Damborsky, P., Svitel, J., and Katrlík, J. (2016). Optical biosensor. *Essays in Biochemistry* **60** (1), 91-100.

Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., and Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: Coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews* **100** (7), 2705–2738.

Davies, M. L., Hamilton, C. J., Murphy, S. M., and Tighe, B. J. (1992). Polymer membranes in clinical sensor applications I. An overview of membrane. *Biomaterials* **13** (14), 971-978.

De Boevere, C., and Van Peteghem, C. (1993). Development of an immunoaffinity column and an indirect immunoassay with a biotin-streptavidin detection system for aflatoxin M in milk. *Analytica Chimica Acta* **275**(1-2), 341-345.

- De Castillo, J., Rodriguez, A., Romero, C. A., and Sanchez, V. (1966). Lipid films as transducers for detection of antigen-antibody and enzyme-substrate reactions. *Science* **153** (3732), 185-188.
- Deng, Z-P, Sun, Y., Wang, Y-C., and Gao, J-D. (2018). A NiFe alloy reduced on graphene Oxide for electrochemical nonenzymatic glucose sensing. *Sensors* **18** (11), 3972-3975.
- Dey, D., and Goswami, T. (2011) Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**:348218. doi: 10.1155/2011/348218
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J., Jürgens, G., and Estelle, M. (2005). Plant deveopement is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* **9** (1), 109-119.
- Dimitriou, E., Karaouzas, I., Sarantakos, K., Zacharias, I., Bogdanos, K., and Diapoulis, A. (2008). Groundwater risk assessment at a heavily industrialised catchment and the associated impacts on a peri-urban wetland. *Journal of Environmental Management* **88** (3), 526-538.
- Dimitrov, D. S., and Jain, R. K. (1984). Membrane stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **779**, 437-468.
- Doktorova, M., Heberle, F. A., Eicher, B., Standaert, R. F., Katsaras, J., London, E., Pabst, G., and Marquardt, D. (2018). Preparation of asymmetric phospholipid vesicles for use as cell membrane models. *Nature Protocols* **13**, 2086-2101.
- Du, L., and Xu, Q. (2002). Study on the direct determination of auxins by gas chromatography. *Chinese Journal of Chromatography* **18**, 160-161.
- Dua, J., Rana, A., and Bhandari, A. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* **3**, 14–20.
- Duan, C-Q., Zhang, Y-M., and Gaoa, Z-N. (2012). Electrochemical behavior and electrochemical determination of 1-naphthaleneacetic acid at an ionic liquid modified carbon paste electrode. *Croatica Chemica Acta* **85** (1), 27-32.
- Duran-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzman, J., and Correa-Basurto, J. (2016). Docking simulation of the binding interactions of saxitoxin analogs produced by the marine dinoflagellate *Cymnodinium catenatum* to the voltage-gated sodium channel Na_v 1.4. *Toxins* **8** (5), 129-145.
- Durst, R. A., Baumner, A. J., Murray, R. W., Buck, R. P., and Andrieux, C. P. (1997). Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. *Pure and Applied Chemistry* **69** (6), 1317-1323.
- EFSA (2009). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish– saxitoxin group. *European Food Safety Authority- EFSA* **1019**, 1-76.
- Engel, A., and Muller, D. J. (2000). Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural Biology* **7** (9), 715-718.
- Ensafi, A. A., Jafari-Asl, M., and Rezaei, B. (2013). A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide–Co₃O₄ nanocomposite. *Talanta* **103**, 322-29.
- Esteves-Villanueva, J. O., Trzeciakiewicz, H., and Martic, S. A. (2014). Protein-based electrochemical biosensor for detection of tau protein, a neurodegenerative disease biomarker. *Analyst* **139**, 2823–2831.

- Fang, X., Fan, X., Tang, Y., Chen, J., and Lu, J. (2004). Liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish. *Journal of Chromatography A*, **1036**, 233–237.
- Fernandez-Arguelles, M. T., Canabate, B., Segura, A., Costa, J. M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., and Fernandez, A. (2005). Flow-through optosensing of 1-naphthaleneacetic acid in water and apples by heavy atom induced-room temperature phosphorescence measurements. *Talanta* **66** (3), 696-702.
- Fisher, K. and Branton, D. (1974). Application of the freeze-fracture technique to natural membranes. *Methods in Enzymology* **32**, 35-44.
- Fishman, P. H. (1986). Recent advances in identifying the functions of gangliosides. *Chemistry and Physics of Lipids* **42**(1-3), 137-151.
- Fonfria, E. S., Vilarino, N., Campbell, K., Elliot, C., Haughey, S. A., Ben-Gigirey, B., Vieites, J. M., et al. (2007). Paralytic shellfish poisoning detection by surface plasmon resonance-based biosensors in shellfish matrixes. *Analytical Chemistry* **79** (16), 6303-6311.
- Fraden, J. (2010). *Handbook of Modern Sensors: Physics, Designs, and Applications*. Fourth edition, Ch. 2 pp. 17, 25, 31-38, 41-51 & Ch. 7, pp. 575-581. New York, Springer, New York.
- Frasconi, M., Favero, G., Di Fusco, M., and Mazzei, F. (2009). Polyazetidene-based immobilization of redox proteins for electron-transfer-based biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **24** (5), 1424-1430.
- Garcia Camacho, F., Gallardo Rodríguez, J., Sánchez Mirón, A., Cerón García M. C., Belarbi, E. H., Chisti, Y., and Molina Grima E. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances* **25**, 176–194.
- Garibo, D., Campbell, K., Casanova, A., De La Iglesia, P., Fernández-Tejedor M., Diogène, J., Elliott, C. T., and Campàs, M. (2014). SPR immunosensor for the detection of okadaic acid in mussels using magnetic particles as antibody carriers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **190**, 822–828.
- Geim, A. K., and Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature materials* **6**, 183–191.
- Gholivad, M. B., and Khodadadian, M. (2014). Amperometric cholesterol biosensor based on the direct electrochemistry of cholesterol oxidase and catalase on a graphene/ionic liquid-modified glassy carbon electrode. *Biosensor and Bioelectronics* **53**, 472-478.
- Goldblat, J. (1997). The biological weapons convention-An overview. *International Review of the Red Cross*, No 318.
- Goñi, F. M., Alonso, A., Bagatolli, L. A., Brown, R. E., Marsh, D., Prieto, M., and Thewalt, J. L. (2008). Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 665–684.
- Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlenger, R., Buld, G., Savapol, T. et al., (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex. *Nature* **419**, 484-487.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., and Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **8**, 1400-1458.
- Gu, B. X., Xu, C. X., Zhu, G. P., Liu, S. Q., Chen, L. Y., and Li, X. S. (2009). Tyrosinase immobilization on ZnO nanorods for phenol detection. *The Journal of Physical Chemistry B* **113** (1), 377–381.
- Gui, O., Lawson, T., Shan, S., Yan, L., and Liu, Y. (2017). The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics. *Sensor* **17** (7), 1623-<https://doi.org/10.3390/s17071623>
- Guo, C., Wang, J., Chen, X., Li, Y., Wu, L., Zhang, J., and Tao, C-an. (2019). Construction of a biosensor based on a combination of cytochrome c, graphene, and gold nanoparticles. *Sensors* **19** (1), 40- <https://doi.org/10.3390/s19010040>

- Gussakovskaya, M. A., and Blintsov, A. N. (2007). A new method for differential determination of basic natural forms of indolyl-3-acetic acid. *Biochemistry* **72** (3), 339–344.
- Gustafson, I. (2004). *Phospholipid membranes in biosensor applications: Stability, activity and kinetics of reconstituted proteins and glycolipids in supported membranes* (Thesis). Umea University, Department of Biochemistry, Umeå, Sweden and Swedish Defence Research Agency Division of NBC Defence Umea, Sweden.
- Gutsmann, T., Heimburg, T., Keyser, U., Mahendran, K. P., and Winterhalter, M. (2015). Protein reconstitution into freestanding planar lipid membranes for electrophysiological characterization. *Nature Protocols* **10**, 188-198.
- Ha, S.-J., Park, J.-H., Lee, B., and Kim, M. G. (2019). Label-free direct detection of saxitoxin based on a localized surface plasmon resonance aptasensor. *Toxins* **11** (5), 274. <https://doi.org/10.3390/toxins11050247>
- Hąc-Wydro, K., and Flasiński, M. (2015). The studies on the toxicity mechanism of environmentally hazardous natural (IAA) and synthetic (NAA) auxin--The experiments on model *Arabidopsis thaliana* and rat liver plasma membranes. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **130**, 53-60.
- Halme, M., Rapinoja, M. L., Karjalainen, M., and Vanninen P. (2012). Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* **880** (1), 50-57.
- Hamai, G., Yang, T., Kataoka, S., Cremer, P. S., and Musser, S. M. (2006). Effect of average phospholipid curvature on supported bilayer formation on glass by vesicle fusion. *Biophysical Journal* **90** (4), 1241-1248.
- Hammond, J. L., Formisano, N., Estela, P., Carrara, S., and Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry* **60** (1), 69-80.
- Hardy, J. (2011). State provisional recreational guidance for cylindrospermopsin and saxitoxin. *Final Report, DOH 332–118*, pp.1-36. Washington State Department of Health.
- Harju, K., Rapinoja, M.-L., Avondet, M.-A., Arnold, W., Schär, M., Burrell, S., Luginbühl, W. et al., (2015). Optimization of sample preparation for the identification and quantification of saxitoxin in proficiency test mussel sample using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxins* **7**, 4868–4880.
- Harsányi, G. (2000). *Sensors in Biomedical Applications: Fundamentals, Technology and Applications*. Ch.1, pp.1-6. CRC Press LLC, New York, USA.
- Hedden, P. (1993). Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones. *Annual Review of Plant Physiology* **44**, 107–129.
- Heimburg, T. (2012). The capacitance and electromechanical coupling of lipid membranes close to transitions: The effect of electrostriction. *Biophysical Journal* **103** (5), 918–929.
- Heitz, B. A., Jones, I W., Hall, Jr. H. K., Aspinwall, C. A., and Saavedra, S. S. (2010). Fractional polymerization of a suspended planar bilayer creates a fluid, highly stable membrane for ion channel recordings. *Journal of the American Chemistry Society* **132** (20), 7086-7093.
- Henao-Escobar, W., del Torno-de Roman, L., Dominguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M., and Arcos-Martinez, M. (2016). Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine. *Food Chemistry* **190**, 818-823.
- Henrich, F., Krupke, R., Arnold, K., Stutz, J. A. R., Lebedkin, S., Koch, T., Schimmel, T., and Kappes, M. M. (2007). *The Journal of Physical Chemistry B* **111** (8), 1932-1941.
- Hertel, R., Thomson, K., and Russo, V. E. A. (1972). In – vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* **107** (4), 325-340.

- Hianik, T., Passechnik, V. I., Sargent, D. F., Dlugopolsky, J., and Sokolikova, L. (1995). Surface potentials and solvent redistribution may explain the dependence of electrical and mechanical properties of supported lipid bilayers on applied potential and bilayer history. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **37** (1), 61–68.
- Hirano-Iwata, A., Niwano, M., and Sugawara, M. (2008). The design of molecular sensing interfaces with lipid-bilayer assemblies. *TrAC Trends Analytical Chemistry* **27** (6), 512–520.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* **117**, 500–544.
- Hope, M. J., Nayar, R., Mayer, L. D., and Cullis, P. R. (1993). Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques. *Liposome Technology* **1**, 123–139.
- Hou, L., Jiang, L., Song, Y., Ding, Y., Zhang, J., Wu, X., and Tang, D. (2016). Amperometric aptasensor for saxitoxin using a gold electrode modified with carbon nanotubes on a self-assembled monolayer, and methylene blue as an electrochemical indicator probe. *Microchimica Acta* **183** (6), 1971-1980.
- Hu, S. L., and Kao, C. Y. (1991). Interactions of neosaxitoxin with the sodium channel of the frog skeletal muscle fiber. *Journal of General Physiology* **97** (3), 561-578.
- Hulanicki, A., Geab, S., and Ingman, O. (1991). Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **63** (9), 1247-1250.
- Hulanicki, A., Glab, S., and Ingman, F. (1991). Chemical sensor definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **63** (9), 1247-1250.
- Humpage, A., Magalhaes, V., Froscio, S. (2010). Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397** (5), 1655-1671.
- International Organization for Standardization. (2017). ISO/TS 80004-13:2017. Nanotechnologies-Vocabulary-Part 13: *Graphene and related two-dimensional (2D) materials ISO/TS*. ISO, Switzerland: Geneva, Switzerland.
- Israr, M. Q., Sadaf, J. R., Asif, M. H., Nur, O., Willander, M., and Danielsson, B. (2010). Potentiometric cholesterol biosensor based on ZnO nanorods chemically grown on Ag wire. *Thin Solid Films* **519**, 1106–1109.
- Istrate, A. O-M., Rotariu, L., Marinescou, V. E., and Bala, C. (2016). NADH sensing platform based on electrochemically generated reduced graphene oxide-gold nanoparticles composite stabilized with poly(allylamine hydrochloride). *Sensors and Actuators B: Chemical* **223**, 697-704.
- Istrate, O. M., Rotariu, L., and Bala, C. (2016). Electrochemical determination of NADH using screen printer carbon electrodes modified with reduced graphene oxide and poly(allylamine hydrochloride). *Microchimica Acta* **183** (1), 57-65.
- Izyskaya, N., Tahira, A., Idupoto, Z. H., Lewinski, N., Avrutin, V., Ozgur, U., Topsakal, E., et al. (2017). Review-Electrochemical biosensor based on ZnO nanostructures. *ECS Journal of Solid State Science and Technology* **6**(8), Q84-Q100.
- Jaffrezic-Renault, N., and Dzyadevych, S. V. (2008). Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors* **8** (4), 2569-2588.
- Janata, J., and Bezegh, A. (1988). Chemical sensors. *Analytical Chemistry* **60** (12), 62-74.
- Janata, J., Josowicz, M., Vanysek, D., and De Vaney, M. (1998). Chemical sensor. *Analytical Chemistry* **70** (12), 179-208.
- Jerónimo, P. C. A., Araujo, A. N., and Montenegro, M. C. B. S. M. (2007). Optical sensors and biosensors based on sol-gel films. *Talanta* **72**, 13-27.

- Johnson, D.W., Dobson, B. P., and Coleman, K. S. (2015) A manufacturing perspective on graphene dispersions. *Current opinion in colloid & interface science* **20** (5-6), 367-382.
- Kalantar-zadeh, K., and Fry, B. (2008). *Nanotechnology-Enabled Sensors*. Ch. **2**, pp.13-19. Springer, New York, USA.
- Kalb, E., Frey, S., and Tamm, L. K. (1992). Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1103**, 307- 316.
- Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I. A., Liu, J., and Lin, Y. (2009). Glucose oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics* **25** 901–905.
- Karapetis, S., Nikoleli, G-P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., Tzamtzis, N., and Psaroudakis, N. (2016). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of cholera toxin based on air stable lipid films with incorporated ganglioside GM1 using graphene electrodes. *Electroanalysis* **28** (7), 1584–1590.
- Karuppiah, C., Palanisamy, S., Chen, S., Veeramani, V., and Periakaruppan, P. (2014). A novel enzymatic glucose biosensor and sensitive non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on graphene and cobalt oxide nanoparticles composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B* **196**, 450–456.
- Kelley, K. B., and Riechers, D. E. (2007). Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **89**, 1-11.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). Plan development: auxin in loops. *Current Biology* **15** (16), R208-R210.
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Kiessling, V., Crane, J. M., and Tamm, L. K. (2006). Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. *Biophysical Journal* **91** (9), 3313-3326.
- Kim, D., Lee, S., and Piao, Y. (2017). Electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using activated graphene-Nafion modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **794**, 221-228.
- Kim, J. Y., Jo, S-Y., Sun, G. J., Katoch, A., Choi, S-W., and Kim, S. S. (2014). Tailoring the surface area of ZnO nanorods for improved performance in glucose sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **192**, 216–220.
- Kim, Y-R., Bong, S., Kang, Y-J., Yang, Y., Mahajan, R. K., Kim, J. S., and Kim, H. (2010). Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes. *Biosensors and bioelectronics* **25**, 2366-2369.
- Kochana, J., Gala, A., Parczewski, A., and Adamski, J. (2008). Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391** (4), 1275-1281.
- Kramar, P., Miklavcic, D., Kotulska, M., Lebar, A. M. (2010). Voltage- and current-clamp methods for determination of planar lipid bilayer properties. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Ales Iglic (ed.). Vol. **11** Ch. 2, pp. 29–66. Academic Press, USA.
- Krull, U. J. (1987). Ion-current signal optimization for lipid membrane-based biosensors. *Analytica Chimica Acta* **192**, 321-326.
- Krull, U. J. (1987). Planar artificial biomembranes optimized for biochemical assay. *Analytica Chimica Acta* **197**, 203-215.

- Krull, U. J., and Thompson, M. (1985). The lipid membrane as selective transducer. *IEEE Transactions on Electron Devices* **32** (7), 1180-1184.
- Kuila, T., Bose, S., Khanra, P., Mishra, A. K., Kim, N. H., and Lee, J. H. (2011). Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors of Bioelectronics* **26**, 4637–4648.
- Kwak, Y. H., Choi, D. S., Kim, Y. N., Kim, H., Yoon, D. H., Ahn, S-S., Yang, J-W., et al. (2012). Flexible glucose sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor. *Biosensors and Bioelectronics* **37** (1), 82-87.
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* **16** (7), 307-321.
- Lazarovici, P., Yanai, P., and Yavin, E. (1987). Molecular interactions between micellar polysialogangliosides and affinity-purified tetanotoxins in aqueous solution. *Journal Biological Chemistry* **262**, 2645-2650.
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., and Hone, J. (2008). Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* **321** (5887), 385-388.
- Lee, D. H., Park, C.H., Yeo, J. M., and Kim, S. W. (2006). Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **12**, 777-782.
- Lee, H., Choi, T. K., Lee, Y. B., Cho, H. R., Ghaffari, R., Wang, L., Choi, H.J., et al. (2016). A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy. *Natural Nanotechnology* **11** (6), 566–572.
- Lee, H., Hong Y. J., Baik, S., Hyeon, T., and Kim, D-H. (2018). Enzyme-based glucose sensor: From invasive to wearable device. *Advanced HealthCare Materials* **7** (8), 1-14.
- Lefebvrea, K. A., Quakenbush, L., Frame, E., Burek Huntington, K., Sheffield, G., Stimmelmayer, R., Bryan, A., and et al., (2016). Prevalence of algal toxins in Alaskan marine mammals foraging in a changing arctic and subarctic environment. *Harmful Algae* **55**, 13-24.
- Lenz, J., and Edelstein, A. S. (2006). Magnetic sensors and their applications. *IEEE Sensors Journal* **6** (3), 631-649.
- Li, D., Zhang, W., Yu, X., Wang, Z., Su, Z., and Wei G. (2016). When biomolecules meet graphene: From molecular level interactions to material design and applications. *Nanoscale* **8**, 19491–19509.
- Li, G., Liu, S., Sun, Z., Xia, L., Chen, G., and You, J. (2015). A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labelling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples. *Food Chemistry* **170**, 123-130.
- Li, X., La Motte, C. E., Stewart, C. R., Cloud, N. P., Wear-Bagnall, S., Jiang, C-Z. (1992). Determination of IAA and ABA in the same plant sample by a widely applicable method using GC-MS with selected ion monitoring. *Journal of Plant Growth Regulation* **11**, 55–65.
- Lin, W. C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V., and Longo, M. L. (2006). Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: A combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophysical Journal* **90** (1), 228–237.
- Liu, B -F., Zhong, X-H., and Lu, Y-T. (2002). Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *Journal Chromatography* **945**, 257-263.
- Liu, F., Choi, J. Y., and Seo, T. S. (2010a). Graphene oxide arrays for detecting specific DNA hybridization by fluorescence resonance energy transfer. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 2361–2365.
- Liu, H., Gao, J., Xue, M. Q., Zhu, N., Zhang, M. N., and Cao, T. B. (2009). Processing of graphene for electrochemical application: noncovalently functionalize graphene sheets with water-soluble electroactive methylene green. *Langmuir* **25** (20), 12006-12010.

- Locascio-Brown, L., Plant, A. L., Horvath, V., and Durst, R. A. (1990). Liposome flow injection immunoassay: implications for sensitivity, dynamic range, and antibody regeneration. *Analytical Chemistry* **62** (23), 2587-2593.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaire, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L. S., et al. (2005). *Biologia Celular y Molecular* Part II, Ch. **6**, pp. 151-195. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Lotya, M., Hernandez, Y., King, P. J., Smith, R. J., Nicolosi, V., Karlsson, L. S., Blighe, F. M., et al. (2009). Liquid phase production of graphene by exfoliation of graphite in surfactant/water solutions. *Journal of the American Chemistry Society* **131**, 3611-3620.
- Lu, C. H., Yang, H. H., Zhu, C. L., et al. (2009a). A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 4785-87.
- Lukowiak, A., and Streck, W. (2009). Sensing abilities of materials prepared by sol-gel technology. *Journal of sol-gel science and technology* **50**, 201-215.
- Ma, Z., Ge, L., Lee, A. S., Yong, J. W., Tan, S. N., and Ong, E. S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytical Chimica Acta* **610** (2), 274-281.
- Mackenzie, L. A. (2010). In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as monitoring tool. *Current Opinion in Biotechnology* **21** (3), 326-331.
- Mackinnon, R. (2004). Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 4265-4277.
- Mager, M. D., Almquist, B. A., and Melosh, N. A. (2008). Formation and characterization of fluid lipid bilayers on alumina. *Langmuir* **24** (22), 12734-12737.
- Mallesha, M., Manjunatha, R., Nethravathi, C., Suresh, G. S., Rajamathi, M., Melo, J. S., and Venkatesha, T. V. (2011). Functionalized-graphene modified graphite electrode for the selective determination of dopamine in presence of uric and ascorbic acid. *Bioelectrochemistry* **81**, 104-108.
- Matsuda, F., Miyazawa, H., Wakasa, K., and Miyagawa, H. (2005). Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 778-783.
- McQuade, D.T., Pullen, A. E., and Swager, T. M. (2000). Conjugated polymer-based chemical sensors. *Chemical Reviews* **100**, 2537-2574.
- Mehrota, P. (2016). Biosensors and their applications-A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6** (2), 153-159.
- Mehvar, M., and Abdi, M. (2004). Recent developments characteristic and potential application of electrochemical biosensor. *Analytical Sciences* **20**, 113-1126.
- Miller, J. R., Outlaw, R. A., and Holloway, B. C. (2010). Graphene double-layer capacitor with ac line-filtering performance. *Science* **329** (5999), 1637-1639.
- Misawa, N., Osaki, T., and Takeuchi, S. (2018). Membrane protein-based biosensors. *Journal of the Royal Society Interface* **15** (141), 2-17. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0952>
- Mishra, C. K., Barfidokht, A., Tehrani, F and Mishra, R. K. (2018). Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods* **7**, 141 doi:10.3390/foods7090141
- Mishra, G. K., Sharma, A., Deshpande, K., and Bhand, S. (2014). Flow injection analysis biosensor for urea analysis in urine using enzyme thermistor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **174** (3), 998-1009.

- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. Z., Huyop, F., and Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment* **29** (2), 205-220.
- Mohd Yazid, S. N. A., Isa, I. M., Bakar, S. A., Hashim, N., and Sazeli, A. G. (2014). A review of glucose biosensors based on graphene/metal oxide nanomaterials. *Analytical Letters* **47** (1), 1821-1834.
- Montal, M., and Mueller, P. (1972). Formation of biomolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **69** (12), 3561-3566.
- Morshed, H., Hossain, M. S., Islam, U. A., Ali, U., Ibrahim, MD., Islam, M. S., and Aslam, M. A. (2005). Toxicity of four synthetic plant hormones IAA, NAA, 2, 4-D and GA against *Artemia salina* (Leach). *International Journal of Agriculture and Biology* **7** (2), 240-242.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. J. (1963). Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* **67** (2), 534-535.
- Mujahid, L. A., and Dickert, F. L. (2017). Surface acoustic wave (SAW) for chemical sensing applications of recognition. *Sensors* **17**, 2716-2742.
- Munday, R., Thomas, K., Gibbs, R., Murphy, C., and Quilliam, M. A. (2013). Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautotoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon* **76**, 77-83.
- Nagl, S., and Wolfbeis, O. S. (2015). Classification of chemical sensors and biosensors based on fluorescence and phosphorescence. In: *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurement I*, O. S. Olfbeis (ed.), pp. 325-346. Springer.
- Napier, R. M. (1995). Towards an understanding of ABP1. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1787-1795.
- Napier, R. M., David, K. M., and Perrot-Rechenmann, C. (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Molecular Biology* **49**, 339-348.
- Naumowicz, M., Figaszewski, Z. A., and Póltorak, L. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy as a useful method for examination of the acid-base equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine bilayer. *Electrochimica Acta* **91**, 367-372.
- Ngoepe, M., Choonara Y. E., Tyagi C., Tomar L. K., du Toit L. C., Kumar, P., Ndesendo V. M. K., et al., (2013). Integration of biosensors and drug delivery technologies for early detection and chronic management of illness. *Sensors* **13** (6), 7680-7713.
- Nicolson, G. L. (2013). Update of the 1972 Singer-Nicolson fluid mosaic model of membrane structure. *Discoveries Journal* **1** (1):e3- DOI: 10.15190/d.2013.3
- Nikoleli, G. P., Ibutoto, Z. H., Nikolelis, D. P., Likodimos, V., Psaroudakis, N., Tzamtzis, N., Willander, M., and Hianik, T. (2013). Potentiometric cholesterol biosensing application of graphene electrode with stabilized polymeric lipid membrane. *Central European Journal of Chemistry* **11** (9), 1554 - 1561.
- Nikoleli, G. P., Nikolelis, D. P., and Tzamtzis, N. (2011). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of Cholera toxin using air stable lipid films with incorporated Ganglioside GM1. *Electroanalysis* **23**, 2182-2187.
- Nikoleli, G., Nikolelis, D. P., Tzamtzis, N., and Psaroudakis, N. A. (2014). Selective Immunosensor for D-dimer based on antibody immobilized on a graphene electrode with incorporated lipid films. *Electroanalysis* **26**, 1522-1527.

- Nikoleli, G-P., Idupoto, Z. H., Nikolelis, D. P., Licodimos, V., Psaroudakis, N., Tzamtzis, N., Willander, M., et al. (2013). Potentiometric cholesterol biosensing application of graphene electrode with stabilized polymeric lipid membrane. *Central European Journal of Chemistry* **11** (9), 1554-1561.
- Nikoleli, G-P., Israr, M. Q., Tzamtzis, N., Nikolelis, D. P., Willander, M., and Psaroudakis, N. (2012). Structural characterization of graphene nanosheets for miniaturization of potentiometric urea lipid film based biosensors. *Electroanalysis* **24**, 1285–1295.
- Nikoleli, G-P., Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., and Karapetis, S. K. (2018a). Lipid membrane nanosensors for environmental monitoring: The art, the opportunities, and the challenges. *Sensors* **18** (1), 284- doi: 10.3390/s18010284
- Nikoleli, G-P., Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Karapetis, S. K., and Nikoleli, M-T. (2018b). Application of biosensors based on lipid membranes for the rapid detection toxins. *Biosensors* **8** (3), 61- doi: 10.3390/bios8030061
- Nikoleli, G-P., Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Nikoleli, M-T., and Karapetis, S. K. (2018c). The application of lipid membranes in biosensing. *Membranes* **8** (4), 108- doi: 10.3390/membranes8040108
- Nikoleli, G-P., Siontorou, C., Nikolelis, D., Bratakou, S., Karapetis, S., and Tzamtzis, N. (2017). Biosensors based on lipid modified graphene microelectrodes. *Journal of Carbon Research* **3** (1), 9- doi:10.3390/c3010009
- Nikolelis, D. P. Chaloulakos, T-I., Nikoleli, G.-P., and Psaroudakis, N. (2008b). A portable sensor for the rapid detection of naphthalene acetic acid in fruits and vegetables using stabilized in air lipids films with incorporated auxin-binding protein 1 receptor. *Talanta* **77** (2), 786-792.
- Nikolelis, D. P., and Krull, U. J. (1992b). Reliable and facile method for preparation of solventless bilayer lipid membranes for electroanalytical investigations. *Talanta* **39** (8), 1045-1049.
- Nikolelis, D. P., and Mitrokotsa, M. (2002). Stabilized lipid film based biosensor for atenolol. *Biosensor and Bioelectronics* **17**, 565–572.
- Nikolelis, D. P., Brennan, J. D., Brown, R. S., and Krull, U. J. (1992). Control of ion transport across bilayer lipid membranes by adjustment of surface charge associated with phase domain structures. *Analytica Chimica Acta* **257** (1), 49-57.
- Nikolelis, D. P., Drivelos, D. A., Simantiraki, M. G., and Koinis, S. (2004). An optical spot test for the detection of dopamine human urine using stabilized in air lipid films. *Analytical Chemistry* **76**, 2174–2180.
- Nikolelis, D. P., Drivelos, D. A., Simantiraki, M. G., and Koinis, S. (2004). An optical spot test for the detection of dopamine in human urine using stabilized in air lipids films. *Analytical Chemistry* **76**, 2174-2180.
- Nikolelis, D. P., Hianik, T., and Krull, U. J. (1999). Biosensors based on thin lipid films and liposomes. *Electroanalysis* **11** (1), 7-15.
- Nikolelis, D. P., Ntanos N., Nikoleli, G.-P., and Tampouris, K. (2008a). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of naphthalene acetic acid in fruits by using air stable lipids films with incorporated auxin-binding protein 1 receptor. *Protein and Peptide Letters* **15** (8), 789-794.
- Nikolelis, D. P., Psaroudakis, N., and Ferderigos, N. (2005). Preparation of selective receptor for ephedrine for the development of an optical spot test for the detection of ephedrine in human urine using stabilized in air lipid films with incorporated receptor. *Analytical Chemistry* **77** (10), 3217-3221.
- Nikolelis, D. P., Psaroudakis, N., and Ferderigos, N. S. (2005). Preparation of a selective receptor for ephedrine for the development of an optical spot test for the detection of ephedrine in human

urine using stabilized in air lipid films with incorporated receptor. *Analytical Chemistry* **77**, 3217-3221.

Nikolelis, D. P., Raftopoulou, G., Chatzigeorgiou, P., Nikoleli, G.-P., and Viras, K. (2008). Optical portable biosensors based on stabilized lipid membrane for the rapid detection of doping materials in human urine. *Sensors and Actuators B (Chemical)* **130**, 577–582.

Nikolelis, D. P., Raftopoulou, G., Chatzigeorgiou, P., Nikoleli, G.-P., and Viras, K. (2008). Optical portable biosensors based on stabilized lipid membrane for the rapid detection of doping materials in human urine. *Sensor and Actuators B: Chemical* **130** (2), 577-582.

Nikolelis, D. P., Raftopoulou, G., Nikoleli, G.-P., and Simantiraki, M. (2006). Stabilized lipid membrane based biosensors with incorporated enzyme for repetitive uses. *Electroanalysis* **18** (24), 2467–2474.

Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G. (1996). Flow injection monitoring and analysis of mixtures of simazine, atrazine, and propazine using filter-supported bilayer lipid membranes (BLMs). *Electroanalysis* **8**, 907-912.

Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Andreou, V. G., and Krull, U. J. (1995). Stabilized bilayer-lipid membranes for flow-through experiments. *Electroanalysis* **7** (11), 531-536.

Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Andreou, V. G., Kyriakos, G., and Krull, U. J. (1995). Bilayer lipid membranes as electrochemical detectors for flow injection immunoanalysis. *Electroanalysis* **7** (11), 1082-1089OΛ9OΛ.

Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Andreou, V. G., Viras, K. G., and Krull, U. J. (1995). Bilayer lipid membranes as electrochemical detectors for flow injection immunoanalysis. *Electroanalysis* **7**, 1082–10895.

Nikolelis, D. P., Siontorou, C. G., Krull, U. J., and Katrivanos, P. L. (1996a). Ammonium ion minisensors from self-assembled bilayer lipid membranes using gramicidin as an ionophore-modulation of ammonium selectivity by platelet-activating factor. *Analytical Chemistry* **68**, 1735-1741.

Nikolelis, D., Ntanos, N., Nikoleli, G.-P., and Tampouris, K. (2008a). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of naphthalene acetic acid in fruits by using air stable lipid films with incorporated auxin-binding protein 1 receptor. *Protein Peptide Letters* **15**, 789–794.

Nullin, D., and Robin, I. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* **80** (2), 269-278.

Orrit, M. (2009). From Langmuir–Blodgett films to single molecules. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* **74** (2), 394-400.

Osaki, T., and Takeuchi, S. (2017). Artificial cell membrane systems for biosensing applications. *Analytical Chemistry* **89**, 216–231.

Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W., Stenger, D. A. (1999). Development and application of cell based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering* **27** (6), 697-711

Pena-Bahamonde, J., Nguyen, H. N., Fanourakis, S. K., and Rodrigues, D. F (2018). Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. *Journal of Nanobiotechnology* **16**, 75.

Pengelly, W., and Meins, J. F. A. (1997). Specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta* **136**, 173–180.

Pereira, M. J., Eleutério, T., Canhoto, J. M. (2015). The influence of cytokinin and auxin types and their concentration on the proliferation and rooting of *Viburnum treleasei* seedling explants. *Acta Horticulturae* **1083**, 311–318.

- Pohanka, M. (2017). The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. *International Journal of Electrochemical Science* **12**, 496 – 506.
- Polak, A., Mulej, B., and Kramar, P. (2012). System for measuring planar lipid bilayer properties. *Journal of Membrane Biology* **245** (10), 625–632.
- Proft, T., (Ed). (2009). *Microbial Toxins: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, Wymondham United Kingdom.
- Psychoyios, V. N., Nikoleli, G-P., Tzamtzis, N., Nikolelis, D.P., Psaroudakis, N., Danielsson, B., Israr, M. Q., and Willander, M. (2013). Potentiometric cholesterol biosensor based on ZnO nanowalls and stabilized polymerized lipid film. *Electroanalysis* **25**, 367–372.
- Pumera, M. (2011). Graphene in biosensing. *Materials Today* **14** (7-8), 308-315.
- Purrucker, O., Hillebrandt, H., Adlkofer, K., and Tanaka, M. (2001). Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **47** (5), 791–798.
- Puu, G., Gustafson, I., Artursson, E., and Ohlsson, P. Å. (1995). Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support. *Biosensors and Bioelectronics* **10**, 463-476.
- Qian, G. S., Yasei, P., and Yang, G. C. (1984). Rapid extraction and detection of aflatoxin M1 in cow's milk by performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *Analytical Chemistry* **56**(12), 2079-2080.
- Ramanathan, K., and Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronic* **16** (6), 417-423.
- Ramesh, P., Suresh, G. S., and Sampath, S. (2004). Selective determination of dopamine using unmodified exfoliated graphite electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **561**, 173-180.
- Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhorn, S. E. (1992). *Biology of Plants*. New York, Worth. pp. 545-572.
- Rayan, K. J., and Ray, G. C., (Eds). (2004). *SHERRIS Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. 4th edition. McGraw-Holl, Medical Publishing Division, New York.
- Reddy, D., Hussain, O. M., Gopal, D. V. R. S., Rao, D., and Sastry, K. S. (2013). *Biosensors and Bioelectronics*. Firth edition, Ch. 2, pp. 31. I. K. International Publishing House, Pvt. Ltd, New Delhi.
- Reed, R. A., Mattai, J., and Shipley, G. G. (1987). Interaction of cholera toxin with ganglioside GM1 receptors in supported lipid monolayers. *Biochemistry* **26**(3), 824-832.
- Reimhult, E., Hook, F., and Kasemo, B. (2003). Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicles size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* **19** (5), 1681-1691.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J., and Barceló, D. (2006). Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 1025–1041.
- Roggo, C., and Van de Meer, J. R. (2017). Miniaturized and integrated whole cell living bacterial sensors in field applicable autonomous devices. *Current Opinion in Biotechnology* **45**, 24-33.
- Rowley-Neale, S. J., Pandviir, A. S., Dena A. S. A., and Banks, C. E. (2018). An overview of recent application of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms. *Applied Materials Today* **10**, 218-226.
- Rundberget, T., Sandvik, M., Larsen, K., Pizarro, G. M., Reguera, B., Castberg, T., Gustad, E., et al., (2007). Extraction of microalgal toxins by large - scale pumping of seawater in Spain and Norway, and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2. *Toxicon* **50**, 960-970.

- Sadana, A., and Sadana, N. (2010). *Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics*. Elsevier Science. (Ch. 14, pp. 389–418).
- Sadik, O. A., and Yan, F. (2004). Novel Biosensor for Pathogenic Toxins using Fluorescent Cyclic Polypeptide Conjugate. *Chemical Communications* **7**, 1136-1137.
- Salisbury, F. B., and Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth, pp. 357-407 & 531-548.
- Sang, S., Wang, Y., Feng, Q., Wei, Y., Ji, J., and Zhang, W. (2015). Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**, 1–17.
- Schild, L., and Moczydlowski, E. (1991). Competitive binding interaction between Zn^{2+} and saxitoxin in cardiac Na^+ channels. Evidence for a sulfhydryl group in the Zn^{2+} /saxitoxin binding site. *Biophysical Journal* **59** (3), 523–537.
- Schultz, P. G. (1988). The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysts. *Science* **240**, 426-233.
- Seitz, B., Campos Rivera, N., Gray, R., Powell, A., and Thomson, F. (2017). Radiation sensor for medical, industrial and environmental applications: how to engage with schools and the general public. *Physics Education* **53** (1), 014001 pp.13.
- Shan, C., Yang, H., Han, D., Zhang, Q., Ivaska, A., and Niu, L. (2010) Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **25** (5), 1070-1074.
- Shan, C., Yang, H., Song, J., Han, D., Ivaska, A., and Niu, L. (2009). Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene. *Analytical Chemistry* **81** (6), 2378–2382.
- Shang, N.G., Papakonstantinou, P., McMullan, M., Chu, M., Stamboulis, A, Potenza, A., Dhesi, S. S., and Marchetto, H. (2008). Catalyst-free efficient grow orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes. *Advanced Functional Materials* **18**, 3506-3514.
- Shao, Y., Wang J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A., and Lina, Y. (2010). Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **22** (10), 1027 – 1036.
- Sharma, S., Byrne, H., and O’Kennedy, R. J. (2016). Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays Biochemistry* **60** (1), 9-18.
- Shishova, M., and Lindberg, S. (2110). A new perspective on auxin perception. *Journal of Plant Physiology* **167** (6), 417-422.
- Sin, M. L. Y., Mach, K. E., Wong, P. K., and Liao, J. C. (2014). Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **14**, 225-244.
- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** (4023), 720-731.
- Siontorou, C. G., and Batzias, F. A. (2010). Innovation in biotechnology: Moving from academic research to product development—The case of biosensors. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**, 79–98.
- Siontorou, C. G., Andreou, V. G., Nikolelis, D. P., and Krull, U. J. (2000). Flow injection monitoring of aflatoxin M1 in cheese using filter-supported bilayer lipid membranes (BLMs) with incorporated DNA. *Electroanalysis* **12** (10), 747-751.
- Siontorou, C. G., Nikoleli, G-P, Nikolelis, D. P., and Karapetis, S. K. (2017). Artificial lipid membranes: past, present, and future. *Membranes* **7** (3), 38- doi: 10.3390/membranes7030038
- Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., Miernik, A., and Krull, U. J. (1998). Rapid methods for the direct detection of aflatoxin M1 based on electrochemical transduction by self-assembled metal-

- supported bilayer lipid membranes and on Interferences with transduction of DNA hybridization. *Electrochimica Acta*, **43** (23), 3611-3617.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. F., and Crouch, S. R. (2004). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Eighth edition, Belmont: Brooks/Cole, USA.
- Song, Y., Liu, H., Wan, L., Wang, Y., Hou, H., Wang, L. (2013). Direct electrochemistry of cytochrome c based on poly (diallyldimethylammonium chloride)-graphene nanosheets/gold nanoparticles hybrid nanocomposites and its biosensing. *Electroanalysis* **25**, 1400–1409.
- St. Clair, J. R., Wang, Q., Li, G., and London, E. (2017). Preparation and physical properties of asymmetric model membranes vesicles. In: *The Biophysics of Cell Membranes*, R. M. Epand and J. M. Ruyschaert (eds), vol. **19**, 1-27. Springer, Singapore.
- Steffens, B., and Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology* **170**, 603–617.
- Steltenkamp, S., Muller, M. M., Deserno, M., Hennessthal, C., Steinem, C., and Janshoff, A. (2006). Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **91** (1), 217-226.
- Stoller, M. D., Park, S. J., Zhu, Y. W., An, J. H., and Ruoff, R. S. (2008). Graphene-based ultracapacitors. *Nano Letters* **8** (10), 3498-3502.
- Stradiotto, N. R., Yamanaka, H., and Zanoni, M. V. B. (2003). Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **14** (2), 159-173.
- Stuepp, C. A., Wendling, I., Trueman, S. J., Koehler, H. S., and Zuffelato-Ribas, K. C. (2017). The use of auxin quantification for understanding clonal tree propagation. *Forest* **8** (1), 27-42.
- Suvarnaphaet, P., and Pechprasan, S. (2017). Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors* **17** (10), 2161-2168.
- Sydenham, P. H. (2014). Static and dynamic characteristic of instrumentation. In: *The Measurement Instrumentation, and Sensors Handbook: Spatial, Mechanical, Thermal, and Radiation Measurement*, J. G. Webster and Eren, H. (Eds.), Second edition, Part I, Ch. 4., pp. 4-18. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Szoke, A. F., Turdean, G. L., atona, G., and Muresan, L. M. (2016). Electrochemical determination of dopamine with graphene-modified glassy carbon electrodes. *Studia Ubb Chemia*, **LXI 3**, Tom I, 135-144.
- Tadyszak, K., Wychowaniec, J. K., and Litowczenko, J. (2018). Biomedical applications of graphene-based structures. *Nanomaterials* **8**, 944-951.
- Taitt, C. R., Anderson, G. P., and Ligler, F. S. (2015). Evanescent wave fluorescence biosensors: advances of the last decade. *Biosensors and Bioelectronics* **76**, 103–111.
- Tamm, L. K., and McConnell, H. M. (1985). Supported phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal* **47**, 105-113.
- Tanaka, M., and Sackmann, E. (2005). Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **437**, 656-663.
- Tang, L., Wang, Y., Li, Y., Feng, H., Lu, J., and Li, J. (2009). Preparation, structure, and electrochemical properties of reduced graphene sheet films. *Advanced Functional Materials* **19**, 2782–2789.
- Thakur, M. S., and Ragavan, K. V. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology* **50** (4), 625-641.
- Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., and Wilson G. S. (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **71** (12), 2333–2348.

- Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., and Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification *Biosensors Bioelectronics* **16**, (1-2), 121-131.
- Thompson, M., and Krull, U. J. (1983). Lipid membrane dipole perturbation and chemoreception as models for selective chemical sensing. *Analytica Chimica Acta* **147**, 1-21.
- Thompson, M., and Krull, U. J. (1984). Biosensors and bioprobes. *Trends in Analytical Chemistry* **3** (7), 173-178.
- Thompson, M., Lennox, R. B., and McClelland, R. A. (1982). Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. *Analytical Chemistry* **54**, 76-81.
- Tivendale, N. D., and Cohen, J. D. (2015). Analytical history of auxin. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**, 708–722.
- Tobi, D., and Bahar, I. (2005). Structural changes involved in protein binding correlate with intrinsic motions of proteins in the unbound state. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*. **102** (52), 18908-18913.
- Toghill, K. E., and Compton, R. G. (2010). Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. *International Journal of Electrochemistry Science* **5** 1246–1301.
- Toro-Goyco, E., Rodriguez, E. A., and de Castillo, D. (1966). Detection of anti-insulin antibodies with a new electrical techniques: Lipid membrane conductometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **23** (3), 341-346.
- Tripathy, N., and Kim, D-H. (2018). Metal oxide modified ZnO for biosensor applications. *Nano Convergence* **5**, 27-<https://doi.org/10.1186/s40580-018-0159-9>.
- Turner, A.P.F. (2000). Biochemistry: Biosensors-sense and sensitivity. *Science* **290** (5495), 1315–1317.
- U.S. EPA. (2007). United States Environmental Protection Agency, Environmental Reregistration Eligibility Decision (RED). Naphthaleneacetic Acid, Its Salts, Ester, and Acetamide. **EPA 738-R-07-07017**.
- Usleber, E., Schneider, E., Terplan, G., and Laycock, M. V. (1995). Two formats of enzyme immunoassay for the detection of saxitoxin and other paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Additive and Contaminants* **12** (3), 405-513.
- Venis, M. A. (1977). Solubilisation and partial purification of auxin-binding sites of corn membranes. *Nature* **266**, 268-269.
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumar, B., and Prakash, H. (2016). Recent advances in biosensor technology for potential applications-An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **4**, 11 -<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
- Wang, D., Xu, F., Hu, J., and Lin, M. (2016). Phytic acid/graphene oxide nanocomposites modified electrode for electrochemical sensing of dopamine. *Materials Science and Engineering: C* **71**, 1086-1089.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., et al. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta* **347**, (1-2), 1-8.
- Wang, J. (2006). Electrochemical Biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* **21** (10), 1887-1892.
- Wang, L., Wu, T., Wu, H., Zhong, J., Wang, N., Wang, R. (2018). A novel non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on Co:ZnO modified electrodes. *Progress in Natural Science: Materials International* **28** (1), 24-27.

- Wang, M. Y., Huang, J. R., Wang, M., Zhang, D., and Chen, J. (2014). Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **151**, 191-197.
- Wang, Q., Fang, J., Cao, D., Li, H., Su, K., Hu, N., and Wang, P. (2015). An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor. *Biosensor and Bioelectronics* **72**, 10-17.
- Wang, X., Lu, H., and Chen, J. (2014). Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **2**, 25-32.
- Wang, Y., Shao, Y., Matson, D. W., Li, J., and Lin, Y. (2010). Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing. *ACS Nano*, **4** (4), 1790-1798.
- Wang, Y., Li, Y., Tang, L., Lu, J., and Li, J. (2009). Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. *Electrochemistry Communications* **11** (4), 889-892.
- Wang, Z., Zhou, X., Zhang, J., Boey, F., and Zhang, H. (2009). Direct electrochemical reduction of single-layer graphene oxide and subsequent functionalization with glucose oxidase. *The Journal of Physical Chemistry C* **113**, 14071–14075.
- Warshaviak, D. T., Muellner, M. J., and Chachisvilis, M. (2011). Effect of membrane tension on the electric field and dipole potential of lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808** (10), 2608–2617.
- Weber, S. G. (1992). Internal volume of competitive-binding biosensors controls sensitivity – equilibrium theory. *Analytical Chemistry* **64** (3), 330-332.
- Wisnieski, B. J., and Bramhall, J. S. (1981). Photolabelling of cholera toxin subunits during membrane penetration. *Nature* **289**(5795), 319-321.
- Wolfbeis, O. S. (1990). Chemical sensor - Survey and trends. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **337** (5), 522-527.
- Wu, H., Wang, J., Kang, X., Wang, C., Wang, D., Liu, J., Aksay, I., and Lin, Y. (2009). Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film. *Talanta* **80**, 403–406.
- Wu, O., Hou, Y., Zhang, H., Hou, X., Xu, L., Wang, N., Wang, J., and Huang, W. (2016). Amperometric cholesterol biosensor based on Zinc oxide films on a silver nanowire-graphene oxide modified electrode. *Analytical Methods* **8**, 1806-1812.
- Xiao, F., Wang, L., and Duan, H. (2016). Nanomaterial based electrochemical sensors for in vitro detection of small molecule metabolites. *Biotechnology Advances* **34** (3), 234-249.
- Yakes, B. J., Prezioso, S., Haughey, S. A., Campbell, K., Elliott, C. T., and DeGrasse, S. L. (2011). An improved immunoassay for detection of saxitoxin by surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B Chemical* **156** (2), 805–811.
- Yang, S., Ding, S., Li, L., Sun, Q., Yang, J., and Cao, Q. (2017). Hydrogen peroxide biosensor based on graphene -toluidine blue/HRP-poly (toluidine blue). *International Journal of Electrochemical Science* **12**, 10838–10849.
- Yang, Z., and Dou, X. (2016). Emerging and future possible for enhancing 1D inorganic nanomaterials? Based electrical sensors towards explosives vapors detection. *Advanced Functional Materials* **26** (15), 2406-2425.
- Yeagle, P. L. (2012). Membrane proteins. In: *The Structure of Biological Membranes*, P. L. Yeagle (ed.). Third edition, Ch. **1**, pp. 1-6, Ch. **2**, pp. 7-11 & Ch. **3**, pp. 13 – 17. CRC Press, Taylor and Francis Group, N. Y.

- Yeagle, P. L. (2012). Membrane proteins. In: *The Structure of Biological Membranes*, P. L. Yeagle (ed.). Third edition, Ch. 2, pp. 7-13, & Ch. 3: *Introduction to lipid-protein interactions in biological membranes*, pp. 13-19. CRC Press, Taylor and Francis Group, N. Y.
- Yogeswaran, U., and Chen, S. M. (2008). A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. *Sensors* **8**, 290-313.
- Zagnoni, M. (2012). Miniaturized technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab on a Chip* **12**, 1026-1039.
- Zhang, X., and Zhang, Z. (2012). Capillary electrophoresis-based immunoassay with electrochemical detection as rapid method for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish samples. *Journal of Food Composition and Analysis* **28**, (1), 61-68.
- Zhao, A., Zhang, Z., Zhang, P., Xiao, S., Wang, L., Dong, Y., Yuan, H., et al., (2016). 3D nanoporous gold scaffold supported on graphene paper: Freestanding and flexible electrode with high loading of ultrafine PtCo alloy nanoparticles for electrochemical glucose sensing. *Analytical Chimica Acta* **938**, 63–71.
- Zhou, M., Zhai, Y., and Dong, S. (2009). Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide. *Analytical Chemistry* **81**, 5603–5613
- Zhu, K., Dietrich, R., Didier, A., Doyscher, D., and Martlbauer, E. (2014). Recent developments in antibody-based assays for the detection of bacterial toxins. *Toxins* **6** (4), 1325-1346.
- Zhu, R., Wang, X., and Wang, P. L. (2005). Application of functional group modified substrate in room temperature phosphorescence, II-heavy atom-chelated filter paper for selective determination of alpha-naphthalene acetic acid. *Luminescence* **20**(4-5) 389-394.
- Zou, L., Wu, C., Wang, O., Zhou, J., Su, K., Li, H., Ning H and Wang, P. (2015). An improved sensitive assay for the detection of PSP toxins with neuroblastoma cell-based impedance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **67**, 458-464.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γηρούση, Σ. (2015). Βιοαισθητήρες. Σύγγραμμα *Βιοαναλυτική Χημεία*, από Γ. Θεοδωρίδης (κύριος συγγραφέας), Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α-Σ. Ζώτου και Β. Σαμανίδου (συνεργάτες). Κεφ. 7. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.

Νικολέλη, Γ. (2015). *Ανάπτυξη χημικών αισθητήρων για την ανίχνευση τοξικών ουσιών*. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο.

Προδρομίδης, Μ. (2014). Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες. Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα.

Σοφικίτη, Ν. Γ. (2009). *Ανάπτυξη Χημικών Αισθητήρων και Βιοαισθητήρων σε Ετεροδομές και Νανοδομές III-Νιτριδίων*. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

I. ΚΥΡΙΑ ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ
ABP1	Auxin-binding protein 1	Πρωτεΐνη με δεσμευμένη Αυξίνη 1
AFM	Atomic Force Microscopy	Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης
AIBN	(Azobisisobutyronitrile	2,2'-αζωδισοβουτύρονιτρίλιο
ABP1	Auxin-binding protein 1	Πρωτεΐνη με δεσμευμένη Αυξίνη 1
ChOx	Cholesterol Oxidase	Οξειδάση της Χοληστερόλης
CT	Cholera Toxin	Τοξίνη της Χολέρας
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin	Διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays	Δοκιμασίες Ενζυμικής Ανοσοαπορρόφησης
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	Νουκλεοτίδιο Αδενίνης Φλαβίνης
FIA	Flow Injection Analysis	Ανάλυση με Έγχυση σε Ροή
GCE	Glass Carbon Electrode	Υαλώδες Ηλεκτρόδιο Άνθρακα
GO	Graphene Oxide	Οξείδιο Γραφενίου
GOD	Glucose Oxidase	Οξειδάση της Γλυκόζης
GP	Graphene Paper	Χάρτης Γραφενίου
GQDs	Graphene-Based Quantum Dots	Κβαντικές Τελείες βασισμένες σε Γραφένιο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
IAA	Indole-3-acetic acid	Ινδολο-3-οξικό οξύ
LUV	Large Unilamellar Vesicles	Μεγάλα Μονοστρωματικά Κυστίδια
NAA	Naphthyl acetic acid	Ναφθαλενικό οξικό οξύ
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουλεοτίδιο
NPG	Nanoporous Gold	Νανοπορώδης Χρυσός
NPs	Nanoparticles	Νανოსωματίδια
RGO	Reduced Graphene Oxide	Ανηγμένο Οξείδιο Γραφενίου
SAW	Surface Acoustic Wave	Επιφανειακό Ακουστικό Κύμα
SPR	Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
STX	Saxitoxin	Σαξιτοξίνη
SUV	Small Unilamellar Vesicles	Μικρά Μονοστρωματικά Κυστίδια
TIR1	Transport Inhibitor Response 1	Απόκριση Αναστολέας Μεταφοράς 1

II. ΤΙΤΛΟΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ & ΠΙΝΑΚΩΝ

Σχήμα 1.1.	Σχηματική αναπαράσταση χημικού αισθητήρα.....	5
Σχήμα 1.2.	Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών που συμβαίνουν στους αισθητήρες, 1) ο αναλύτης προσελκύεται στις θέσεις του υποδοχέα από το αισθητήριο στοιχείο, 2) ακολουθεί χημική αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και υποδοχέα με παραγωγή ηλεκτρικού σήματος 3) ο μεταλλάκτης μετατρέπει στον επεξεργαστή το ηλεκτρικό σήμα σε αναλυτικό σήμα.....	6
Σχήμα 1.3.	Λειτουργία επεξεργασίας του εξερχόμενου από τον αισθητήρα ηλεκτρικού σήματος.....	6
Σχήμα 1.4.	Ιδανική καμπύλη και σφάλμα ευαισθησίας. Το σφάλμα ευαισθησίας (που παρουσιάζεται ως διακεκομμένη καμπύλη στο σχήμα) είναι μια απόκλιση από την ιδανική κλίση της χαρακτηριστικής καμπύλης (Carr, 1993).	9
Σχήμα 1.5.	Σφάλμα καμπύλης υστέρησης.	11
Σχήμα 1.6.	(a) ορισμός χρόνου ανύψωσης, (b) ορισμός χρόνου πτώσης (Carr, 1993).	12
Σχήμα 1.7.	Σφάλμα μη γραμμικότητας της καμπύλης.....	13
Σχήμα 1.8.	Κυματομορφές του σήματος εισόδου.	14
Σχήμα 1.9.	Καμπύλη απόκρισης $c(t)$ για σταθερές χρόνου $T_1 > T_2 > T_3$	16
Σχήμα 1.10.	Χρονική απόκριση 2ης τάξης σε διέγερση μοναδιαίας βηματικής συνάρτησης για διάφορες τιμές ζ του συντελεστή απόσβεσης.....	17
Σχήμα 2.1.	Το μοντέλο κυτταρικής μεμβράνης Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Membrane τρισδιάστατης απεικόνισης όπως προτάθηκε το 1972. Στην εικόνα αυτή της κυτταρικής μεμβράνης τα στερεά σώματα με διαγραμμισμένες επιφάνειες κοπής αντιπροσωπεύουν σφαιρικές ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης, τυχαία κατανεμημένες στο επίπεδο της μεμβράνης. Ορισμένες ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης, όπως φαίνεται στο σχήμα, σχηματίζουν συγκεκριμένα ολοκληρωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στην υγρή διπλοστοιβάδα λιπιδίων.	20
Σχήμα 2.2.	Ένας υποδοχέας ακετυλοχολίνης (πράσινο) σχηματίζει ένα δίαυλο με ιόντα στο πλάσμα μεμβράνης. Ο υποδοχέας αυτός είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης με ένα υδατικό πόρο που σημαίνει ότι, όταν είναι ανοικτός επιτρέπει τη διέλευση διαλυτών υλικών εγκάρσια στο πλάσμα της μεμβράνης. Όταν δεν υπάρχει εξωτερικό σήμα, ο πόρος είναι κλειστός (στο κέντρο). Όταν τα μόρια της ακετυλοχολίνης (μπλε) δεσμεύονται στον υποδοχέα, αυτό ενεργοποιεί μια προσαρμοστική αλλαγή, που ανοίγει τον υδατικό πόρο και επιτρέπει τη ροή των ιόντων (κόκκινο) μέσα στο κύτταρο.....	21
Σχήμα 2.3.	Σχηματικό διάγραμμα αρχής αισθητήρα που παράγει μια ηλεκτρική έξοδο σε απόκριση της παρουσίας μιας ποσότητας εισόδου.	23
Σχήμα 2.4.	Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα.	26
Σχήμα 2.5.	Σχηματικό διάγραμμα συνοπτικής περιγραφής των εφαρμογών βιοαισθητήρων.	28
Σχήμα 2.6.	Σχηματικό διάγραμμα αναλυτικής περιγραφής των εφαρμογών βιοαισθητήρων.	28

Σχήμα 2.7.	Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης ενζύμων α) με προσρόφηση β) ενθυλάκωση γ) παγίδευση και δ) διασταυρούμενη σύνδεση (Προδρομίδης, 2014).	34
Σχήμα 2.8.	Αρχή λειτουργίας ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων.	37
Σχήμα 2.9.	Διαγραμματική αναπαράσταση ποτενσιομετρικού αισθητήρα.....	38
Σχήμα 2.10.	Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα.....	39
Σχήμα 2.11.	Διαγραμματική αναπαράσταση οπτικού βιοαισθητήρα.....	40
Σχήμα 2.12.	Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο εμφανίζεται α) όταν δημιουργείται τάση λόγω μηχανικής παραμόρφωσης και β) όταν η μηχανική παραμόρφωση αρχίζει από εφαρμοζόμενη τάση.....	42
Σχήμα 3.1.	Αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα.....	47
Σχήμα 3.2.	Σχηματική αναπαράσταση του κρυσταλλικού πλέγματος του γραφενίου αποτελούμενου από άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε κυψελωτή διδιάστατη διάταξη. Οι δεσμοί sp^2 (γκρι απόχρωση) που δημιουργούν τα γειτονικά άτομα άνθρακα στο κρυσταλλικό πλέγμα του γραφενίου και τα τροχιακά $2p_z$ στα οποία κινείται το τέταρτο ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου άνθρακα.....	48
Σχήμα 3.3.	Ένα σχήμα που παρουσιάζει τους διάφορους τρόπους παραγωγής γραφενίου και παρασκευές υλικών που βασίζονται στο γραφένιο. CRGO= χημικώς ανηγμένο οξειδίο γραφενίου, TRGO= θερμικώς ανηγμένο οξειδίο του γραφενίου, ERGO= ηλεκτροχημικώς ανηγμένο οξειδίο του γραφενίου.....	48
Σχήμα 3.4.	Το γραφένιο αριστερά τυλίσσεται δημιουργώντας φουλερένιο 0D, στο κέντρο διπλώνεται δημιουργώντας νανοσωλήνα άνθρακα 1D και δεξιά στοιβάζεται δημιουργώντας γραφίτη 3D.	49
Σχήμα 3.5.	Οι δομές υλικών με βάση το γραφένιο (α) παρθένο γραφένιο με sp^2 - υβριδοποιημένα άτομα άνθρακα, και το χημικώς τροποποιημένο γραφένιο που περιλαμβάνει (β) το οξειδίο γραφενίου (GO), (γ) το ανηγμένο οξειδίο γραφενίου (RGO) και (δ) το γραφένιο που βασίζεται σε κβαντικές τελείες (GQD).....	51
Σχήμα 3.6.	Σχηματική απεικόνιση των τριών γενεών βιοαισθητήρων που βασίζονται στην οξειδάση της γλυκόζης.....	54
Σχήμα 3.7.	Ηλεκτροχημική ανίχνευση βιοαισθητήρα DNA που βασίζεται σε νανοϋλικά με βάση το γραφένιο.	61
Σχήμα 3.8.	Στάδια παρασκευής βιοαισθητήρα NADH από εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα (SPE) με την προσθήκη νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) σε μείγμα οξειδίου του γραφενίου (GO) και πολύ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη, PAH).	65
Σχήμα 4.1.	Φωσφολιπίδιο κυτταρικής διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης με ενσωματωμένα μόρια πρωτεΐνης που επιτρέπουν την εκλεκτική διέλευση ιόντων και μορίων μέσω της μεμβράνης.....	70
Σχήμα 4.2.	Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα που βασίζεται σε λιπιδική μεμβράνη.....	73
Σχήμα 4.3.	Σχηματική απεικόνιση μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας που εκτείνεται στην οπή του διαφράγματος Teflon που παρεμβάλλεται μεταξύ δύο υδατικών διαλυμάτων. Η διπλοστοιβάδα σχηματίζεται κατά μήκος αυτής της οπής, διαχωρίζοντας τους δύο θαλάμους και μπορεί να είναι χρωματισμένη ή μη. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της διπλής στοιβάδας μπορούν να μετρηθούν τοποθετώντας ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς σε κάθε πλευρά του θαλάμου.....	80

Σχήμα 4.4.	Οι δύο μέθοδοι κατασκευής διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών: άνω η τεχνική Montal-Mueller παράγει ένα επίθεμα μεμβράνης επάνω στην οπή της ταινίας Teflon σε μια σειρά βημάτων (Α-Ε), κάτω η τεχνική σιφωνίου (1-6 βήματα) δημιουργεί μια μεμβράνη πάνω από την άκρη μιας πιπέτας που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του νερού.....	81
Σχήμα 4.5.	Σχηματικό διάγραμμα κατασκευής των μεμβρανών Langmuir-Blodgett.....	82
Σχήμα 4.6.	Κοινές τεχνικές για τον σχηματισμό υποστηριζόμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων: (α) Η τεχνική Langmuir-Blodgett διεξάγεται πρώτα με έλξη ενός υδρόφιλου υποστρώματος διαμέσου μιας λιπιδικής μονοστοιβάδας και διαδοχικά ώθηση της οριζόντιας μονοστοιβάδας μέσω μιας άλλης λιπιδικής μονοστοιβάδας, (β) Τα λιποσώματα στο διάλυμα προσροφούν και αυθόρμητα συντήκονται στην επιφάνεια για να σχηματίσουν μια στερεά υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα, (γ) Ένας συνδυασμός των διαδικασιών σύντηξης Langmuir-Blodgett και λιποσώματος.	85
Σχήμα 4.7.	Σχηματική παράσταση της μεθόδου σύντηξης λιπιδίων. Τα προσροφημένα κυστίδια παραμορφώνονται και διασπώνται ή συγχωνεύονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα κυστίδια, τα οποία με τη σειρά τους διαρύνονται για να σχηματίσουν μια συνεχή υποστηριζόμενη λιπιδική μεμβράνη.	87
Σχήμα 4.8.	Τεχνικές συναρμολόγησης υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών (δ.λ.μ.):	88
Σχήμα 4.9.	Σχηματικό διάγραμμα μιας στερεάς υποστηριζόμενης διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίου. Η μεμβράνη διαχωρίζεται από το υπόστρωμα με νερό πάχους 10-20 Å.....	90
Σχήμα 4.10.	Μηχανισμός πολυμερισμού (σχηματισμός σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης). Το μεθακρυλικό οξύ είναι το μονομερές προς πολυμερισμό, η διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη είναι ο διαδουκτωτής (crosslinker) και το 2,2'-αζωδιισοβουτύρονιτρίλιο (Azobisisobutyronitrile, AIBN) είναι ο εκκινητής (initiator).....	94
Σχήμα 4.11.	Σχηματική παράσταση ορισμένων βιοχημικών συστημάτων για τη δημιουργία βιοαισθητήρων που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες με υποδοχείς (α) ένζυμα και (β) αντισώματα προσροφημένα στην επιφάνεια της μεμβράνης με στόχο ουσία/αναλύτη και αντίσωμα αντίστοιχα.	96
Σχήμα 4.12.	Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα διστρωματικής λιπιδικής στοιβάδας. R_m =αντίσταση της μεμβράνης, R_e =αντίσταση φέροντος ηλεκτρολύτη, C_m =ολική χωρητικότητα της μεμβράνης	98
Σχήμα 4.13.	Σχηματική αναπαράσταση των κρυσταλλικών δομών ZnO. Εξαγωνική συμμετρία (wurtzite) και κυβική συμμετρία (Zinc blende).	100
Σχήμα 4.14.	Σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης της χοληστερόλης με τη χρήση βιοαισθητήρα (βιοηλεκτρόδιο) που αποτελείται από νανοσωλήνες ZnO, οξειδάση της χοληστερόλης (ChOx) και σύρμα Ag, με την πιθανή ηλεκτροχημική αντίδραση κοντά στο ηλεκτρόδιο εργασίας.....	101
Σχήμα 5.1.	Συντακτικός και στερεοχημικός τύπος της αυξίνης ινδολο-3-οξικό οξύ.	103
Σχήμα 5.2.	Η in vitro βιοδοκιμή απόδειξε την παρουσία του IAA ως τη κύρια φυσική ορμόνη των φυτών. Τμήμα (μπλοκ) άγαρ που περιέχει συγκέντρωση αυξίνης επηρεάζει την αναπτυξιακή κατεύθυνση ενός κολεόπτρου βρώμης, με τις	

	καμπυλώσεις των στελεχών να είναι ανάλογες με την ποσότητα της αυξητικής ουσίας στο άγαρ (δοκιμή καμπυλότητας avena).	104
Σχήμα 5.3.	Σχηματική παράσταση παραγωγής ινδολο-3-οξικού οξέος από τρυπτοφάνη.	105
Σχήμα 5.4.	Επίδραση της αυξίνης στην ανάπτυξη της φράουλας. Τα αχάινια παράγουν αυξίνη για την ανάπτυξη του καρπού. Όταν αφαιρεθούν η φράουλα δεν αναπτύσσεται. (Το αχάινιο είναι ένας μικρός και ξηρός αδιάρρηκτος καρπός που περικλείει μόνο ένα σπέρμα). (http://www.phytohormones.info/auxins.htm)	106
Σχήμα 5.5.	Χημικές δομές μερικών συνθετικών αυξινών και δομή του IAA.	107
Σχήμα 7.1.	Συντακτικός και στερεοχημικός τύπος ναφθαλινοξικού οξέος: Ονομασία κατά IUPAC: 2-(1-Naphthyl)acetic acid. Ιδιότητες: Χημικός τύπος C ₁₂ H ₁₀ O ₂ , μοριακή μάζα 186,210 g/mol, σημείο τήξεως 135 °C, οξύτητα (pKa) 4,24, διαλυτότητα στο ύδωρ 0,42 Kg/m ³	119
Σχήμα 7.2.	Η χημική δομή του φωσφολιπιδίου DPPC (διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη). Η DPPC αποτελείται από 2 μόρια παλμιτικού οξέος, που εστεροποιούνται με την 3-φωσφορική L-γλυκερίνη, η οποία περιέχει ένα μόριο χολίνης, προσδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό.....	123
Σχήμα 7.3.	Σχηματική αναπαράσταση ακινητοποίησης του λιπιδίου σε επιφάνεια φίλτρου με τη μέθοδο πολυμερισμού (Nikolelis et al., 2005).....	124
Σχήμα 7.4.	Φάσματα Raman του μείγματος κατασκευής της λιπιδικής μεμβράνης κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία Α) για 0 λεπτά, Β) 60 λεπτά, C) 120 λεπτά, D) 240 λεπτά, Ε) 300 λεπτά	126
Σχήμα 7.5.	Φωτογραφία του κατασκευασθέντος βιοαισθητήρα της αυξίνης (ABP1).....	127
Σχήμα 7.6.	Πειραματική διάταξη μετρήσεων βιοαισθητήρα ναφθαλινικού οξέος.	128
Σχήμα 7.7.	Σχηματική παράσταση της πειραματικής ρύθμισης και του επιφανειακού άκρου του βιοηλεκτροδίου.....	128
Σχήμα 7.8.	Η καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση του NAA χρησιμοποιώντας τον μικροσκοπικό ποτενσιομετρικό αισθητήρα με υποδοχέα αυξίνης (ABP1) ενσωματωμένο σε πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες πάνω σε νανόφυλλα γραφενίου. Πειραματικές συνθήκες: pH 7,0, θερμοκρασία 25 °C, περιοχή συγκέντρωσης NAA 50x10 ⁻⁹ M έως 10x10 ⁻⁶ M, λαμβανόμενες αποκρίσεις σε λειτουργία διακοπής ροής, ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Οι γραμμές στην καμπύλη αναφοράς, στον άξονα τετμημένων, υποδηλώνουν τυπική απόκλιση (n = 3).....	130
Σχήμα 7.9.	α) Κρυσταλλική δομή του υποδοχέα σύνδεσης της αυξίνης με πρωτεΐνη ABP1 σε σύμπλοκο με 1-NAA και β) χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας σε ανάλυση 1,9 Å με το 1-NAA συνδεδεμένο με ABP1.	131
Σχήμα 7.10.	Απόκριση αισθητήρα σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις NAA συγκέντρωσης 5x10 ⁻⁷ M, σε pH 7,0. Μετά από κάθε απόκριση, που καταγράφηκε σε λειτουργία διακοπής ροής 5 λεπτών, ο αισθητήρας αναγεννήθηκε σε ρυθμό ροής 2,0 mL/min για 6 λεπτά, πριν από την επόμενη έγχυση NAA.	134
Σχήμα 8.1.	Δομή σαξιτοξίνης (STX). Βασικά, είναι μια τετραϋδροπυρίνη τριαλκυλίου, με τις θέσεις 2 και 8 του δακτυλίου της πυρίνης να περιέχουν τις ομάδες αμίνης, οι οποίες σχηματίζουν δύο μονάδες γουανιδινίου. Έχει δύο τιμές pKa: 8,22 (για την ομάδα 7,8,9 γουανιδινίου) και 11,28 (για την ομάδα 1,2,3 γουανιδινίου). Σε pH 7, η ομάδα 1,2,3-γουανιδινίου είναι θετικά φορτισμένη και η ομάδα 7,8,9-γουανιδινίου είναι μερικώς αποπρωτονιωμένη.	140

Σχήμα 8.2.	Φωτογραφία του κατασκευασθέντος βιοαισθητήρα της σαξιτοξίνης.....	144
Σχήμα 8.3.	Σχηματική διαμόρφωση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα της σαξιτοξίνης και η επιφάνεια ακμής του βιοηλεκτροδίου.....	145
Σχήμα 8.4.	Καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση σαξιτοξίνης (STX) χρησιμοποιώντας μικροσκοπικό ποτενσιομετρικό αισθητήρα: καθαρισμένη IgG αντιτοξίνη-STX ορού κουνελιού είναι ενσωματωμένη σε πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες πάνω σε νανόφυλλα γραφενίου. Πειραματικές συνθήκες: pH 7,0 (PBS). Θερμοκρασία: 25 °C. Περιοχή συγκέντρωσης STX: 1×10^{-9} M έως 1×10^{-6} M. Αποκρίσεις που λαμβάνονται σε λειτουργία διακοπτόμενης ροής. Ηλεκτρόδιο αναφοράς: Ag/AgCl. Οι γραμμές σφαλμάτων δηλώνουν τυπική απόκλιση (n = 3).	148
Σχήμα 8.5.	Η απόκριση του μικροσκοπικού αισθητήρα για συγκέντρωση 5×10^{-8} M σαξιτοξίνης σε εύρος τιμών pH 5,8 - 8,0.....	149
Σχήμα 8.6.	Απόκριση αισθητήρα σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις με 5×10^{-8} M σαξιτοξίνης (pH = 7,0). Μετά από κάθε απόκριση (που καταγράφηκε σε λειτουργία διακοπτόμενης ροής) ο αισθητήρας αναγεννήθηκε με ρυθμό ροής 2,0 mL/min για 10 λεπτά πριν από την επόμενη έγχυση σαξιτοξίνης.....	150
Σχήμα 8.7.	Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης: (A) πολυμερές χωρίς το λιπίδιο, (B) πολυμερές μαζί με λιπίδιο, (C) πολυμερές μαζί με λιπίδιο μετά την ενσωμάτωση της Anti-STX, και (D) ίδιο με (C) μετά την απόθεση μιας σταγόνας τοξίνης πάνω στο φίλτρο.....	151
Πίνακας 2.1.	Εφαρμογές βιοαισθητήρων	27
Πίνακας 2.2.	Ταξινόμηση βιοαισθητήρων	31
Πίνακας 4.1.	Λιπιδικά μείγματα για την παρασκευή διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών (Brennan, et al. 1993a).....	77
Πίνακας 7.1.	Επίδραση των πιθανών παρεμποδίσεων στο βιοαισθητήρα.....	132
Πίνακας 7.2.	Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων φρούτων / λαχανικών με τον προτεινόμενο βιοαισθητήρα.....	134
Πίνακας 8.1.	Ιοντικές ενώσεις που ελέγχθηκαν ως πιθανοί παρεμποδιστές σε προσομοιωμένα δείγματα νερού λίμνης.....	146
Πίνακας 8.2.	Ανίχνευση της σαξιτοξίνης (STX) σε εμβολιασμένα δείγματα νερού λίμνης με ποτενσιομετρικό μικροαισθητήρα που στηρίζεται σε λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένη αντι-STX πάνω με νανόφυλλα γραφενίου.....	153
Πίνακας 8.3.	Ανίχνευση σαξιτοξίνης σε εμβολιασμένα δείγματα οστρακοειδών γλυκού νερού (με 8 nM τοξίνης), χρησιμοποιώντας τον ποτενσιομετρικό μικροαισθητήρα που στηρίζεται σε λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένη αντι-STX πάνω με νανόφυλλα γραφενίου.....	154
Πίνακας 9.1.	Σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους ανίχνευσης NAA.....	160
Πίνακας 9.2.	Σύγκριση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης της STX.....	160

III. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Electrochemical Biosensor for Naphthalene Acetic Acid in Fruits and Vegetables Based on Lipid Films with Incorporated Auxin-binding Protein Receptor Using Graphene Electrodes

Spyridoula Bratakou,^[a] Georgia-Paraskevi Nikoleli,^[a] Christina G. Siontorou,^[b] Stephanos Karapetis,^[a] Dimitrios P. Nikolelis,^{*[c]} and Nikolaos Tzamtzis^[d]

Abstract: The present work describes a miniaturized potentiometric naphthalene acetic acid (NAA) sensor on graphene nanosheets with incorporated lipid films. Auxin-binding protein 1 receptor immobilized on the stabilized lipid films provided adequate selectivity for detection over a wide range of hormone concentrations, fast response time of ca. 5 min, and detection limit of 10 nM.

Keywords: stabilized lipid films • biosensor • electrochemistry • auxin-binding protein 1 • naphthalene acetic acid

The proposed sensor is easy to construct and exhibits good reproducibility, reusability, selectivity, long shelf life and high sensitivity of ca. 56 mV/decade of hormone concentration. The reliability of the biosensor was successfully evaluated using a wide range of NAA-spiked fruits and vegetables.

1 Introduction

1-Naphthalene acetic acid (NAA) is a synthetic plant growth regulator (auxin) used by nursery growers to initiate root formation on vegetative cuttings. Although its toxicity is low [1], the degradation of NAA is still not clear [2]. EPA issued in 2007 an amendment of the 1981 registration standard for NAA, its salts, ester and acetamide tolerance limits, lowering ten-fold accepted residues in apple, pear and quince [3]. Applied as spray, the effective concentrations lie between 20–100 mg mL⁻¹, depending on plant type [4]. Plant-secreted auxins are usually around 1–100 ng g⁻¹ fresh weight [5,6]. Clearly, NAA levels in food, vegetables and fruits should be monitored and controlled.

There exist many analytical techniques for the analysis of NAA, including spectrophotometry [6], capillary micelle electrokinetic chromatography [7], room-temperature phosphorescence [4,8], gas chromatography [9], and high-performance liquid chromatography [10]. An evaluation of these analytical techniques has been recently reported [4].

Early studies on the interactions of NAA with lipid film immobilized auxin receptor protein extract from the corn coleoptile system [11,12] indicated insignificant membrane permeability changes and very slow NAA adsorption kinetics. Recent studies on phospholipid monolayers [2] showed only slight penetration of NAA into the polar lipid region owing to the steric properties of the naphthalene ring and more promising receptor binding properties for sensor construction.

Significant progress has recently been achieved in the design and stabilization of lipid bilayer platforms [13–15]

that afforded lipid film biosensors an adequate degree of ruggedness to permit field detection, e.g., of dopamine and ephedrine [14,15], and to facilitate manufacturability. These stabilized platforms have been used for the development of an electrochemical and an optical NAA biosensor [16,17]. These biosensors are the only biosensors for NAA that have appeared in the literature up to date. Unfortunately, accurate analysis of PGRs becomes a very challenging task. For example, PGRs in plants are present at very low concentrations against a background of a wide range of abundant primary and secondary metabolites. Thus, the analytical methods to quantitate these compounds simultaneously must be extremely selective

[a] S. Bratakou, G.-P. Nikoleli, S. Karapetis
Laboratory of Inorganic & Analytical Chemistry, School of Chemical Engineering, Dept 1, Chemical Sciences, National Technical University of Athens, 9 Iroon Polytechniou St., Athens 157 80, Greece

[b] C. G. Siontorou
Laboratory of Simulation of Industrial Processes, Department of Industrial Management and Technology, School of Maritime and Industry, University of Piraeus

[c] D. P. Nikolelis
Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, GR-15771 Athens, Greece
Tel: + + 302107274754
*e-mail: nikolelis@chem.uoa.gr

[d] N. Tzamtzis
Laboratory of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, GR-15771 Athens, Greece

and sensitive [10]. Thus there is a need to develop a NAA biosensor that can be portable and used for the in situ determination of this phytohormone.

The first auxin receptor was identified in the early 1970s in membrane fractions of *zea coleoptiles* [18], coined auxin-binding protein 1 (ABP1). Following decades of research on the molecular biology of auxins, some aspects of the relevant signaling pathway have been elucidated [19]. Besides ABP1 that initiates cell wall expansion, the transport inhibitor response 1 (TIR1) and the related auxin signaling F-box (AFB) proteins initiate the induction of gene expression [20–22]. Although ABP1 has been extensively studied [23,24] and is most likely an auxin receptor [20], the TIR1 signaling pathway is better established in its details [24]. Comparing ABP1 and SCF^{TIR1} binding data reveals some similarities and a few differences [24]. The affinity of ABP1 for 1-NAA is reported variously as being between 50 and 200 nM, whereas its affinity for the plant-produced indole-3-acetic acid (IAA) is much lower (5–10 μ M). On the contrary, TIR1 favors the natural ligand, indicating that the selectivity of the two binding sites differs; the affinity, however, that each site shows for their favored ligand is similar. Both proteins bind the strong auxin 2,4-D relatively weakly and none bind tryptophan or benzoic acid. Conversely, the binding characteristics of ABP1 and SCF^{TIR1} exhibit different pH-dependences. The binding of 1-NAA to ABP1 is acutely pH-dependent: the optimum is found between pH 5.0–5.5 and drops to a small fraction at pH 7.0 [25]. Studies on the binding of IAA to SCF^{TIR1} showed no such dependency [20,26]; yet, in each case, the pH at which high-affinity binding is found is appropriate for the compartments in which the receptors are reported to act: the nucleus (pH 7.2–7.5 for TIR1) and at the cell surface (pH 5.0–6.0 for ABP1). Therefore, the differences observed between the binding affinities and selectivities of the SCF^{TIR1} complex and of ABP1 are consistent with the diversity required for functioning in different compartments. The membrane bound ABP1 seems more suitable to serve a thin lipid film biosensing platform.

The present work describes a miniaturized potentiometric naphthalenic acid (NAA) sensor on graphene nanosheets with incorporated stabilized lipid films. The ABP1 receptor was immobilized on the stabilized lipid films and provided adequate selectivity for detection of this phytohormone. The lipid films were formed on glass fiber microporous filters by UV polymerization; methacrylic acid was the functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate was the crosslinker and 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile) was the initiator. Results indicated that the natural receptor, incorporated in the lipid mixture prior to polymerization, retains its bioactivity within the lipid platform. A flow-through assay system was used for NAA detection in order to increase the number of analyses per sensor. The method was successfully implemented for the determination of NAA in fruits, fruit juices and vegetables. The proposed technique can be

complimentary to established HPLC methods and can be developed into a portable device for the on site rapid screening of fruits and vegetables by non-skilled personnel.

2 Experimental

2.1 Materials and Solutions

Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) was purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). DPPC was used as lipid for the formation of the films supported on a polymer. The functional monomer, methacrylic acid, and the crosslinker, ethylene glycol dimethacrylate, were both supplied by Aldrich (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany). The initiator, 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile) (AIBN), was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Water was purified by passage through a Milli-Q cartridge filtering system (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, USA) and had minimum resistivity of 18 M Ω cm. All other chemicals were of analytical-reagent grade. The filters and (nominal) pore sizes used were glass microfiber (0.7 and 1.0 μ m, Whatman Scientific Ltd., Kent, UK). All other chemicals were purchased from Sigma. All experiments were performed at 25 \pm 1 $^{\circ}$.

The procedure for the collection, isolation, and purification of the receptor has been described in detail [27]. The solution containing the purified receptor was lyophilized in 100 μ L aliquots and stored dry at 4 $^{\circ}$ C until needed. Each aliquot was reconstituted in 100 μ L of distilled water. Volumes of 10 μ L were used for the preparation of the stabilized lipid films with incorporated receptor.

2.2 Fabrication of the Lipid-based Sensor Electrode with Incorporated Receptor on a Graphene Electrode

The graphene electrode has been prepared as previously described [28,29]. A homogeneous graphene dispersion (ca. 0.4 mg/mL) has been obtained in N-methyl-pyrrolidone (NMP) through mild sonication (using a Bandelin SONOREX Digital 10P sonicator, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) for 180 hours and centrifugation at 700 rpm for 2 h [28,29]. It has been noticed that this increased sonication time is required because the size of the flakes, a critical parameter for several applications, is severely reduced [30,31]. In addition, prolonged sonication may affect the quality of graphene, i.e., the number and position of broken-conjugation areas in graphene (atomic- or point-defects) that govern the electronic properties of graphene; these defects are predominantly located at the edges of the graphene flakes, and the basal plane of the flakes is relatively defect free [32]. This graphene suspension has been poured onto a copper wire (d=0.25 mm) mounted on a glass fiber filter; the evaporation of the organic solvent was carried out using a fan heater. This copper wire has been utilized to establish the

connection for the extraction of voltage signals for the calibration curve.

Stabilized lipid films were prepared by polymerization as previously described in literature [13,15,28,29,33,34]. The polymerization could take place either by using UV irradiation or thermal polymerization; 5 mg of DPPC were added to a mixture of 0.070 mL of methylacrylic acid, 0.8 mL of ethylene glycol dimethacrylate, 8 mg of 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile), 1.0 mL of acetonitrile and 0.29 mg of the auxin receptor. The mixture was sparged with nitrogen for about 1 min and sonicated for 30 min. For the preparation of the stabilized lipid films, 0.15 mL of this mixture was spread on the microfilter. The filter with the mixture was then irradiated using the UV deuterium lamp. Raman spectrometry was used to monitor the kinetics of the process of polymerization [33,34]. The polymerization was completed within 4 hours. Alternatively, the polymerization could take place by thermal polymerization in 80 °C, but the time of polymerization is longer. These membranes were stable in air, for repetitive uses, for periods of more than two months.

ABP1 was incorporated in bilayer lipid membranes (BLMs) during polymerization by spreading 10 μ L of the receptor suspension along with the polymerization mixture (i.e., for the preparation of the ABP1-incorporated lipid films, the microfilter was spread with 0.15 mL of the polymerization mixture and 10 μ L of receptor suspension). These sensing platforms could be used once (and then disposed of) or repetitively (after regenerated – see below). When not in use, they were kept at 4 °C; shelf-life was routinely >2 months.

The preparation of the potentiometric biosensor has been finalized by encapsulation of the filter-supported polymerized lipid film onto copper wire containing graphene nanosheets (Fig. 1).

2.3 Electrochemical Measurements

A two electrode system, i.e., the working bioelectrode: stabilized polymeric lipid membrane/graphene with incorporated ABP1, and the reference electrode: (homemade) standard Ag/AgCl, used to measure the potentiometric electrochemical response of the fabricated NAA biosensor using a Keithley Electrometer Model 614 (in the voltage mode); the voltage was measured against the reference electrode (Figure 1). Figure 1 contains in detail the working bioelectrode.

Sensor calibration performed in a stopped-flow mode: NAA solutions, at 10- μ L or 20- μ L aliquots, were injected into the carrier electrolyte (pH=7.0) inflow; the flow stopped for 5 min (adequate time to record the response) and then re-started for sensor regeneration. The flow rate used was 2.0 mL/min.

2.4 Sample Preparation

Fruits, fruit juices and vegetables, purchased from the local market, were kept refrigerated (2–8 °C) until analyzed. The following juices were included in this study: apple juice (50% fruit by volume), cherry juice (30% fruit by volume), cherry syrup (20% fruit by volume), grapefruit juice (50% fruit by volume), orange juice (100% fruit by volume), peaches juice (50% fruit by volume), pineapple juice (30% fruit by volume) and strawberry juice (50% fruit by volume). Samples were treated according to the protocol described in [17,18,35]. After washing, fruits and vegetables (the edible parts) were cut into small pieces; 10-g samples were exactly weighed, mixed with 50 mL electrolyte and homogenized in a stainless steel blender (pulp samples). Fruit juices (50-mL aliquots) were used as purchased.

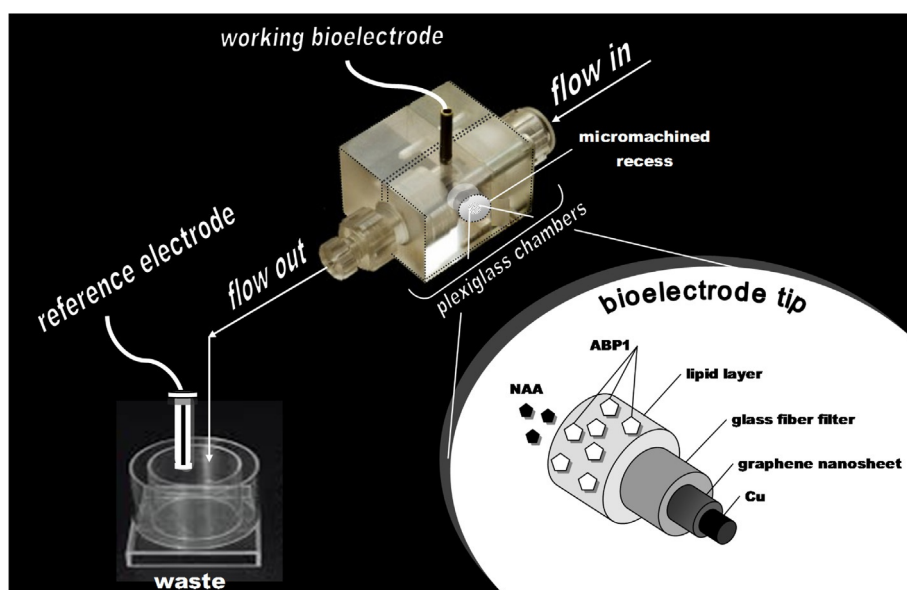


Fig. 1. Schematic of the experimental set-up and the bioelectrode edge surface.

The juices and the pulp samples were shaken vigorously by ultrasonication for 60 min and centrifuged. The supernatant were collected and diluted. Analysis of the samples was performed using the standard addition method. The samples (five samples from each fruit/vegetable type) were spiked with NAA solution, mixed with phosphate buffer to pH=7.0 and analyzed immediately similarly to the sensor calibration procedure. An unspiked sample, treated similarly to the spiked ones, was used as control.

3 Results and Discussion

The preparation of air-stable lipid films for repetitive uses has been previously achieved by thermal polymerization at 60–80 °C [13,15,28,29,33,34]. These high temperature profiles, however, prohibited the incorporation of proteinaceous moieties into the lipid film during the polymerization process; to avoid deactivation, enzymes or receptors could be incorporated afterwards. UV polymerization used in the current study permitted the incorporation of the receptor during film construction, allowing better control and optimization of receptor loading.

Graphene nanosheets used herein allowed the NAA sensor miniaturization in a facile manner. The graphene nanosheets used in our present work have fully been characterized and sufficient data have been provided in our previous works [26,36]. The electrochemical response of the biosensor has been measured as the potential difference between the working electrode and the reference electrode. A highly stable output has been extracted along with a good linear sensitivity curve over a large dynamic range from 50×10^{-9} M to 10×10^{-6} M of NAA at pH 7.0; the correlation coefficient of determination, r^2 , was found to be 0.9992 ($n=30$) (Fig. 2). The detection limit, based on the lowest concentration that could be reliably ($S/N=3$) measured, was 10 nM of NAA. The sensor exhibited an excellent sensitivity slope curve with

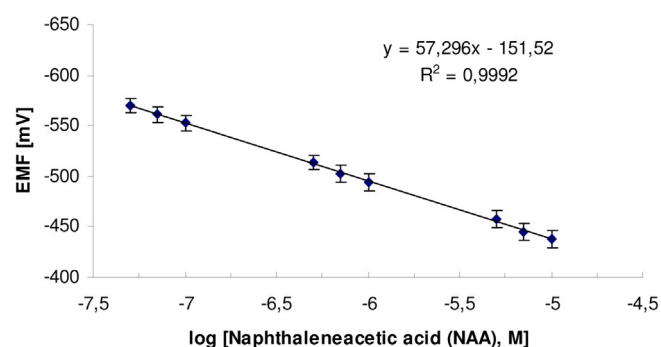


Fig. 2. Calibration curve for NAA detection using the miniaturized potentiometric sensor with auxin receptor (ABP1) incorporated in polymerized lipid films on graphene nanosheets. Experimental conditions: pH 7.0; temperature: 25 °C; NAA concentration range: 50×10^{-9} M to 10×10^{-6} M; responses obtained at stop flow mode; reference electrode: Ag/AgCl. Error bars denote standard deviation ($n=3$).

the value of ca. ~ 57 mV per decade confirming the enhancement in the potential value near the surface of the biosensor as the concentration of the analyte increases. Therefore, the equation that provides the potentiometric response of the biosensor follows the Nernst equation:

$$E = 57.3 \log C - 151.2 \quad (1)$$

The high sensitivity achieved can be attributed to the high surface to volume ratio of graphene nanosheets. The variability of the measurement, as relative standard error (5.95% confidence limit), was found to be ± 3.2 – 3.8% , ($n=40$, on the same sensor, analyst and day) and 4.9–5.8% ($n=30$, on different days with newly constructed sensors and different analysts).

Detailed auxin binding data have previously reported for ABP1 [21,22]. The affinity of ABP1 for the synthetic receptor, 1-NAA, is between 50 to 200 nM, whereas the affinity for the plant secreted indole-3-acetic acid (IAA) is much higher (5–10 mM). Tryptophan and benzoic acid are not bound by ABP1. ABP1 binds the strong auxin 2,4-D relatively weakly. Interference studies were done electrochemically with the present sensor and included other synthetic auxins present in crops. The interference of the biologically inactive 2-NAA and IAA was investigated and these compounds have shown no significant binding even at concentration levels of 10^{-4} M. Investigation of interference studies of other bioactive auxins which may be present in harvested samples has shown that 2,4-D provide a signal, however at concentration levels higher than 10^{-4} M. The present results suggest that each signal causes a temporary change in the membrane, and that each of these disturbances can happen without interference from very similar compounds. These experiments included investigation of most commonly found compounds in real samples of fruits and vegetables. The effect of potent interferences included also a wide range of compounds, usually found in fruits and vegetables (i.e., ascorbic acid, glucose, leucine, glycine, tartrate, citrate, bicarbonate, caffeine). The results (Table 1) showed no interferences from these compounds in concentrations usually found in fruits and vegetables (i.e., the relative error in all the cases was less than 5%). Note that stabilized lipid films without ABP1 were tested with injections of 1-NAA and no current transients were obtained (i.e., blank experiments). These results and the results obtained using the above blank experiments show that the present technique can be applied in fruit and vegetable samples without interferences from the matrix.

Preliminary investigations on the response of the sensor to NAA in the absence of a receptor, indicated a poor output with a sensitivity slope of ~ 3 mV per decade of concentration, over a concentration range of 1×10^{-6} M to 1×10^{-7} M (at pH=7). Thus, it is evident that non-specific binding is not a critical issue in the reliability of measurements of the sensor developed.

Regeneration of the sensor can be made by infinite dilution allowing dissociation to occur by mass action. This

Table 1. Effect of potential interferents on the biosensor

Interferent	Concentration range tested	Max relative error (%) on the signal of 7×10^{-7} M NAA
Ascorbic acid	$0.05\text{--}50 \times 10^{-3}$ M	+4.8%
Glucose	$5\text{--}100 \times 10^{-3}$ M	−2.2%
Leucine	$0.01\text{--}10 \times 10^{-3}$ M	+0.2%
Glycine	$0.01\text{--}10 \times 10^{-3}$ M	+0.2%
Tartate	$0.005\text{--}5 \times 10^{-3}$ M	−0.8%
Citrate	$0.05\text{--}50 \times 10^{-3}$ M	+1.5% (at low concentration)/−0.5% (at high concentration)
Bicarbonate	$0.05\text{--}50 \times 10^{-3}$ M	+2.7% (at low concentration)/−1.0% (at high concentration)
Caffeine	$0.01\text{--}10 \times 10^{-3}$ M	−0.5%

method is easily implemented by the use of the continuous flow system in which the dissociated ABP1 is continuously removed and prevented from re-associating with the receptor. The effect of the flow rate on both, platform regeneration and receptor washing off, has been studied herein. The results indicated that at flow rates higher than 2.5 ml/min, the sensor's signal returned to background (noise) level within 2–5 minutes; the higher the flow rate, the faster the regeneration. Some loss of the receptor has been observed, however, particularly evident after the third washing cycle (as decline of sensor response). At flow rates lower than 2.5 ml/min, platform regeneration required more time to conclude (reaching 12 min at a flow rate of 1.0 ml/min); yet no receptor desorption has been observed. The optimum regeneration flow rate has been set to 2.0 ml/min for 6 minutes.

The maximum number of experiments that could be performed, within the accuracy level set during sensor calibration, was about 10, given that the potential difference and not the absolute value of the potential is recorded (Fig. 3). The sensor drifts for larger number of injections, possibly due to receptor detachment from the lipid film.

The sensor developed was evaluated using real samples from 36 types of juices, vegetable and fruit extracts Table 2, spiked at two different NAA concentrations, i.e., 5×10^{-8} M and 1×10^{-7} M. According to regulations [3], NAA are allowed for various orchard and fruit crops, such as apple, cherry, olive, orange, pear, tangelo, and

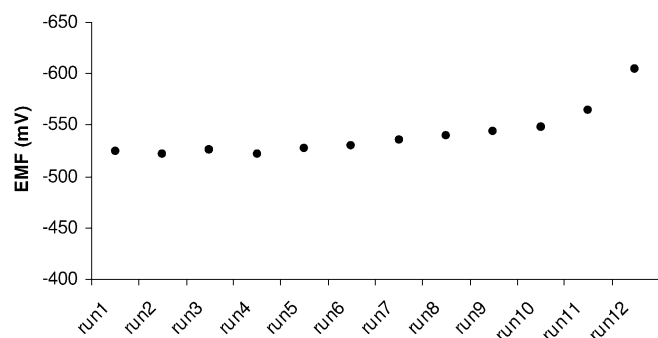


Fig. 3. Sensor response to repetitive injections of 5×10^{-7} M NAA (pH 7.0); after each response (recorded at 5-min stop flow mode), the sensor was regenerated at 2.0 ml/min flow rate for 6 min before the next NAA injection.

tangerine, to prevent pre-harvest drop of fruits and to delay flower induction; many species in Table 2 fall under NAA registration eligibility. Thus, residue NAA levels were determined on unspiked (control) samples; recovery of the spiked solution was estimated (as % apparent recovery, $n=5$) after subtracting the spiked signal from the control signal. All samples were analyzed immediately after preparation on the same sensor, using the calibration plot presented in Fig. 2 and the 6-min regeneration scheme described above.

Recoveries ranged between 91–106% for both, low and high NAA levels (Table 2). The results indicate that, even in the presence of residual NAA, there exists an almost complete mass balance of the recovery analyte, i.e., a good alignment of spiked phytohormone concentration and calibration. No positive or negative trends, indicative of standard errors and matrix effects, were observed at both hormone levels. These results verify the analytical development data, thereby proving the suitability of the minisensor for the quality control of fresh-packed and mild-processed cultivated food products.

4 Conclusions

The present paper describes the preparation of a novel stabilized biosensor based on a lipid film supported on a polymer and incorporated with auxin binding protein 1 (ABP1) that can be used for the rapid electrochemical screening of naphthalene acetic acid (NAA) in fruits and vegetables. Sensor construction is simple and reliable indicating a commercialization prospect. The detection method offers fast response times (order of min) and nanomolar detectability of the phytohormone. The authors have previously developed an electrochemical [16] and an optical biosensor for NAA determination. Our present results show that the limits of detection are comparable to the optical biosensor [17] and by far superior to the electrochemical biosensor [16]. The advantage however of the present biosensing device as compared to the optical biosensor is that the present biosensor can be repeatedly used for at least ten determinations and that the optical biosensor can be used only for a single use. The above offer a technique with similar advantages to HPLC methods that could be used complimentary for the rapid detection of NAA on site or in the field.

Table 2. Results of Analysis of Fruit/Vegetables Samples with the Proposed Biosensor

Sample ID	NAA in control ^[a]	Recovery	
		NAA added	apparent recovery (% , estimated value ^[b] /added value)
Apples	64 nM	50 nM	91–102
		100 nM	97–103
Apples, juice	n.d. ^[c]	50 nM	93–100
		100 nM	96–103
Bananas	n.d.	50 nM	95–101
		100 nM	96–102
Beans	n.d.	50 nM	91–101
		100 nM	97–104
Cabbage, white	n.d.	50 nM	95–105
		100 nM	97–103
Carrots	n.d.	50 nM	92–101
		100 nM	97–100
Celery	n.d.	50 nM	97–105
		100 nM	98–102
Cherries	53 nM	50 nM	94–104
		100 nM	95–105
Cherries, juice	n.d.	50 nM	96–102
		100 nM	97–102
Cherries, syrup	n.d.	50 nM	98–100
		100 nM	96–103
Dill	n.d.	50 nM	97–101
		100 nM	98–104
Grapefruits	n.d.	50 nM	95–102
		100 nM	97–102
Grapefruits, juice	n.d.	50 nM	97–103
		100 nM	96–106
Lemons	n.d.	50 nM	97–102
		100 nM	96–103
Lettuce	n.d.	50 nM	98–101
		100 nM	98–102
Melon	n.d.	50 nM	96–103
		100 nM	98–101
Nectarines	77 nM	50 nM	91–101
		100 nM	95–103
Onions	n.d.	50 nM	94–104
		100 nM	96–106
Oranges	50 nM	50 nM	95–104
		100 nM	95–103
Oranges, juice	n.d.	50 nM	92–105
		100 nM	97–102
Parsley	n.d.	50 nM	97–103
		100 nM	91–101
Peaches	79 nM	50 nM	98–106
		100 nM	96–104
Peaches, juice	n.d.	50 nM	98–106
		100 nM	98–103
Pears	60 nM	50 nM	94–105
		100 nM	91–100
Peppers, green	n.d.	50 nM	98–102
		100 nM	95–104
Peppers, red	n.d.	50 nM	96–105
		100 nM	96–103
Pineapple	64 nM	50 nM	99–103
		100 nM	98–102
Pineapple, juice	n.d.	50 nM	94–101
		100 nM	98–102
Potatoes	n.d.	50 nM	99–104
		100 nM	95–106

Table 2. (Continued)

Sample ID	NAA in control ^[a]	Recovery	
		NAA added	apparent recovery (% , estimated value ^[b] /added value)
Red beets	n.d.	50 nM	96–104
		100 nM	91–102
Spinach	n.d.	50 nM	96–105
		100 nM	95–103
Strawberries	n.d.	50 nM	96–104
		100 nM	98–103
Strawberries, juice	n.d.	50 nM	95–102
		100 nM	96–102
Tangerines	78 nM	50 nM	95–104
		100 nM	98–102
Tomatoes	n.d.	50 nM	96–103
		100 nM	98–102
Watermelon	n.d.	50 nM	95–104
		100 nM	98–104

[a] Residue, determined in unspiked samples. [b] Control signal subtracted, if applicable. [c] Not detected.

References

- [1] H. Morshed, M. S. Hossain, A. ul Islam, U. Ali, M. D. Ibrahim, M. S. Islam, M. A. Islam, *Int. J. Agri. Biol.* **2005**, *7*, 240.
- [2] K. Hąc-Wydro, M. Flasiński, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *130*, 53.
- [3] United States Environmental Protection Agency, Environmental Reregistration Eligibility Decision (RED), Naphthalene acetic acid, Its Salts, Ester, and Acetamide, **2007**, EPA 738-R-07-07017.
- [4] M. T. Fernandez-Arguelles, B. Canabate, A. Segura, J. M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, A. Fernandez, *Talanta* **2005**, *66*, 696.
- [5] M. Shishova, S. Lindberg, *J. Plant Physiol.* **2010**, *167*, 417.
- [6] Z. Ma, L. Ge, A. S. Y. Lee, J. W. H. Yong, S. N. Tan, E. S. Ong, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *610*, 274.
- [7] B.-F. Liu, X.-H. Zhong, Y.-T. Lu, *J. Chromatogr. A* **2002**, *945*, 257.
- [8] R. Zhu, X. Wang, P. L. Wang, *Luminescence* **2005**, *20*, 389.
- [9] L. Du, Q. Xu, *Chin. J. Chromatogr.* **2000**, *18*, 160.
- [10] G. Li, S. Liu, Z. Sun, L. Xia, G. Chen, J. You, *Food Chem.* **2015**, *170*, 123.
- [11] M. Thompson, U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **1983**, *147*, 1.
- [12] U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **1987**, *197*, 203.
- [13] D. P. Nikolelis, M. Mitrokotsa, *Biosen. Bioelectron.* **2002**, *17*, 565.
- [14] D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, M. G. Simantiraki, S. Koinis, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2174.
- [15] D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, N. Ferderigos, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3217.
- [16] D. P. Nikolelis, N. Ntanos, G.-P. Nikoleli, K. Tampouris, *Protein & Peptide Letters* **2008**, *15*(8), 789.
- [17] D. P. Nikolelis, T.-I. Chaloulakos, G.-P. Nikoleli, N. Psaroudakis, *Talanta* **2008**, *77*(2), 786.
- [18] R. Hertel, K. Thomson, V. E. A. Russo, *Planta* **1972**, *107*, 325.
- [19] K. B. Kelley, D. E. Riechers, *Pestic. Biochem. Phys.* **2007**, *89*, 1.
- [20] N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, M. Estelle, *Nature* **2005**, *435*, 441.
- [21] S. Kepinski, O. Leyser, *Nature* **2005**, *435*, 446.

- [22] N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, D. Weijers, E. Lechner, M. Yamada, L. Hobbie, J. Ehrismann, G. Jürgens, M. Estelle, *Dev. Cell* **2005**, *9*, 109.
- [23] R. M. Napier, K. M. David, C. Perrot-Rechenmann, *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 339.
- [24] G. O. Badescu, R. M. Napier, *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 217.
- [25] R. M. Napier, *J. Exp. Bot.* **1995**, *46*, 1787.
- [26] S. Kepinski, O. Leyser, *Nature* **2005**, *435*, 446.
- [27] M. A. Venis, *Nature* **1977**, *266*, 268.
- [28] G.-P. Nikoleli, M. Q. Israr, N. Tzamtzis, D. P. Nikolelis, M. Willander, N. Psaroudakis, *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1285.
- [29] G.-P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, N. Tzamtzis, N. Psaroudakis, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1522.
- [30] A. Ciesielskia, P. Samorì, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 381.
- [31] F. Hennrich, R. Krupke, K. Arnold, J. A. R. Stutz, S. Lebedkin, T. Koch, T. Schimmel, M. M. Kappes, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1932.
- [32] M. Lotya, Y. Hernandez, P. J. King, R. J. Smith, V. Nicolosi, L. S. Karlsson, F. M. Blighe, S. De, Z. M. Wang, I. T. McGovern, G. S. Duesberg, J. N. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3611.
- [33] D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, P. Chatzigeorgiou, G.-P. Nikoleli, K. Viras, *Sens. Actuat. B (Chem.)* **2008**, *130*, 577.
- [34] D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, G.-P. Nikoleli, M. Simantiraki, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 2467.
- [35] M. Y. Wang, J. R. Huang, M. Wang, D. Zhang, J. Chen, *Food Chem.* **2014**, *151*, 191.
- [36] G.-P. Nikoleli, Z. Ibupoto, D. Nikolelis, V. Likodimos, N. Psaroudakis, N. Tzamtzis, M. Willander, T. Hianik, *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11(9)*, 1554.

Received: March 9, 2016

Accepted: April 16, 2016

Published online: May 17, 2016

DOI: 10.1002/elan.201600652

Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Saxitoxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Anti-STX Using Graphene Electrodes

Spyridoula Bratakou,^[a] Georgia-Paraskevi Nikoleli,^[a] Christina G. Siontorou,^[b] Dimitrios P. Nikolelis,^{*,[c]} Stephanos Karapetis,^[a] and Nikolaos Tzamtzis^[a]

Abstract: A miniaturized potentiometric saxitoxin sensor on graphene nanosheets with incorporated lipid films and Anti-STX, the natural saxitoxin receptor, immobilized on the stabilized lipid films is described in the present paper. An adequate selectivity for detection over a wide range of toxin concentrations, fast response time of ca. 5–20 min, and detection limit of 1 nM have been achieved. The

proposed sensor is easy to construct and exhibits good reproducibility, reusability, selectivity, long shelf life and high sensitivity of ca. 60 mV/decade of toxin concentration. The method was implemented and evaluated in lake water and shellfish samples. This novel ultrathin film technology is currently adapted to the rapid detection of other toxins that could be used in bioterrorism.

Keywords: Stabilized lipid films • Saxitoxin biosensor • Graphene electrodes • Electroanalysis, Minaturation

1 Introduction

Both a potent marine biotoxin and neurotoxin, saxitoxin or STX (Figure 1) is the best-known paralytic shellfish toxin (PST). Ingestion of saxitoxin, usually by consumption of shellfish contaminated by toxic algal blooms, is responsible for the life threatening paralytic shellfish poisoning (PSP). An 1 mg dose of the toxin from a single serving of 400 g of contaminated shellfish meat (2.5 ppm STX) is fatal to humans [1]. The European Food and Safety Authority set the acute reference dose to 0.5 µg STX per kg body weight (equivalent to 75 ppb or 30 µg STX per 400 g portion for a 60 kg adult) [1], while most countries have established the drinking water standard to 1–3 µg/L [2]. Considering that STX toxicity varies considerably with the route of administration, permissible levels are currently under revision [3].

The neurotoxicity mechanism involves the inhibition of the voltage-gated sodium channels of nerve cells, preventing normal cellular function and leading to paralysis [4]. The toxin is naturally produced by certain species of marine dinoflagellates (*Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.) and cyanobacteria (*Anabaena* sp., some *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* sp., *Lyngbya* sp., *Planktothrix* sp.) [5]. STX has a large environmental and economic impact, as its presence in bivalve shellfish such as mussels, clams, oysters and scallops frequently leads to bans on commercial and recreational shellfish harvesting in many temperate coastal waters around the world including northeastern and western US, western Europe, east Asia, Australia, New Zealand and South Africa [6]; in the US, paralytic

shellfish poisoning has occurred in California, Oregon, Washington, Alaska, and New England [7].

Toxin analysis is currently performed with mouse bioassay, in vitro functional and cell assays, ELISA, and a number of analytical techniques involving liquid chromatography coupled to mass spectrometry [8]; the lowest detection limit achieved is 5 nM which requires sample pre-concentration or chromatographic pre-oxidation [9]. Immunoassays developed are very sensitive and easy to use, although cross-reactivities and matrix effects compromise their measurement reliability [10]. Due to the severity of contamination, there exists the need for rapid and preferably on site detection. Biosensors might offer a suitable alternative for STX detection. Various ap-

[a] S. Bratakou, G.-P. Nikoleli, S. Karapetis, N. Tzamtzis
Laboratory of Inorganic & Analytical Chemistry, School of Chemical Engineering, Dept 1, Chemical Sciences, National Technical University of Athens, 9 Iroon Polytechniou St., Athens 157 80, Greece

[b] C. G. Siontorou
Laboratory of Simulation of Industrial Processes, Department of Industrial Management and Technology, School of Maritime and Industry, University of Piraeus

[c] D. P. Nikolelis
Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, GR-15771 Athens
Tel: + +302107274754
E-mail: nikolelis@chem.uoa.gr

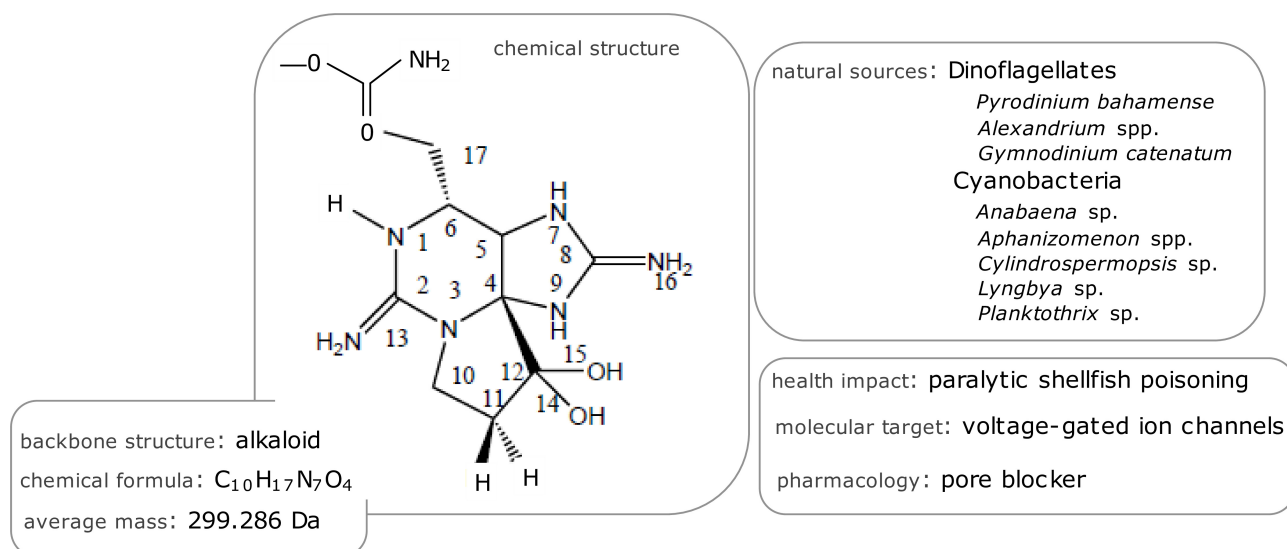


Fig. 1. Structure of saxitoxin (STX). Basically, it is a trialkyl tetrahydropurine, with positions 2 and 8 of the purine ring containing the amine groups, which form two guanidinium moieties. It has two pKa values: 8.22 (for the 7,8,9 guanidinium group) and 11.28 (for the 1,2,3 guanidinium group). At pH 7, the 1,2,3-guanidinium group is positively charged, and the 7,8,9-guanidinium group is partially deprotonated.

proaches have been proposed in literature, including cell-based [11,12], receptor-based [13] or immunoassay formats [14]. Saxitoxin may be detected down to 3.3 nM concentrations by biotinylated antibodies and Cy5-labeled streptavidin as the fluorescent probe [14]. An improved functional assay for saxitoxin and brevetoxin has been recently proposed based on cardiomyocytes with a detectability of 1.2 nM [12]. Electrochemical or piezoelectric platforms have been the most successful in attaining low detection limits [15]; for example, the electrochemical aptasensor developed by Hou et al. demonstrated a 0.38 nM detection limit [16], although linearity is observed within 0.9 and 30 nM concentration range.

Significant progress has been recently achieved in the design and stabilization of biosensors based on lipid films [17–19], demonstrated in the development of rugged sensors for dopamine [18] and ephedrine [19].

A miniaturized potentiometric saxitoxin biosensor using anti-STX incorporated lipid films on graphene nanosheets is described herein. The sensor has shown fast response times (5–20 min) and a good linear sensitivity curve over a large dynamic range from 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M of STX at pH 7.0 has been obtained. The detection limit, based on the lowest concentration that could be reliably ($S/N=3$) measured, was 1 nM. A good reproducibility, reusability, selectivity, long shelf life, nanomolar detection limit and high sensitivity of ca. 60 mV/decade of toxin concentration were the main characteristics of the present sensor. The suitability of the sensor developed was further verified on STX-spiked lake water samples and fresh shellfish samples.

2 Experimental

2.1 Materials and Solutions

Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. DPPC was used as lipid for the formation of the films supported on a polymer. The functional monomer, methacrylic acid, and the crosslinker, ethylene glycol dimethacrylate, were both supplied by Aldrich (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany). The initiator, 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN), was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Saxitoxin (STX) pure standards were obtained from Calbiochem (San Diego, CA); STX stock solution (100 μ M) was prepared in 0.05 mM acetic acid. Working toxin solutions were freshly prepared minutes before use. Rabbit serum anti-STX purified IgG was supplied from Agrisera AB (Vännäs, Sweden). The antibody could be stored at 4 °C up to one month or in aliquots at –20 °C for long time storage; repeated freezing and thawing was avoided. Antibodies were present in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, 0.01 % sodium azide as preservative. Water was purified by passage through a Milli-Q cartridge filtering system (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, USA) and had minimum resistivity of 18 M Ω cm. All other chemicals were of analytical-reagent grade. The filters and (nominal) pore sizes used were glass microfiber (0.7 and 1.0 μ m, Whatman Scientific Ltd., Kent, UK).

2.2 Fabrication of the Lipid-Based Sensor Electrode with Incorporated Receptor on a Graphene Electrode

The construction of the graphene electrode has been described in detail in one of our previous papers [20]; a 0.4 mg/mL homogeneous graphene dispersion has been

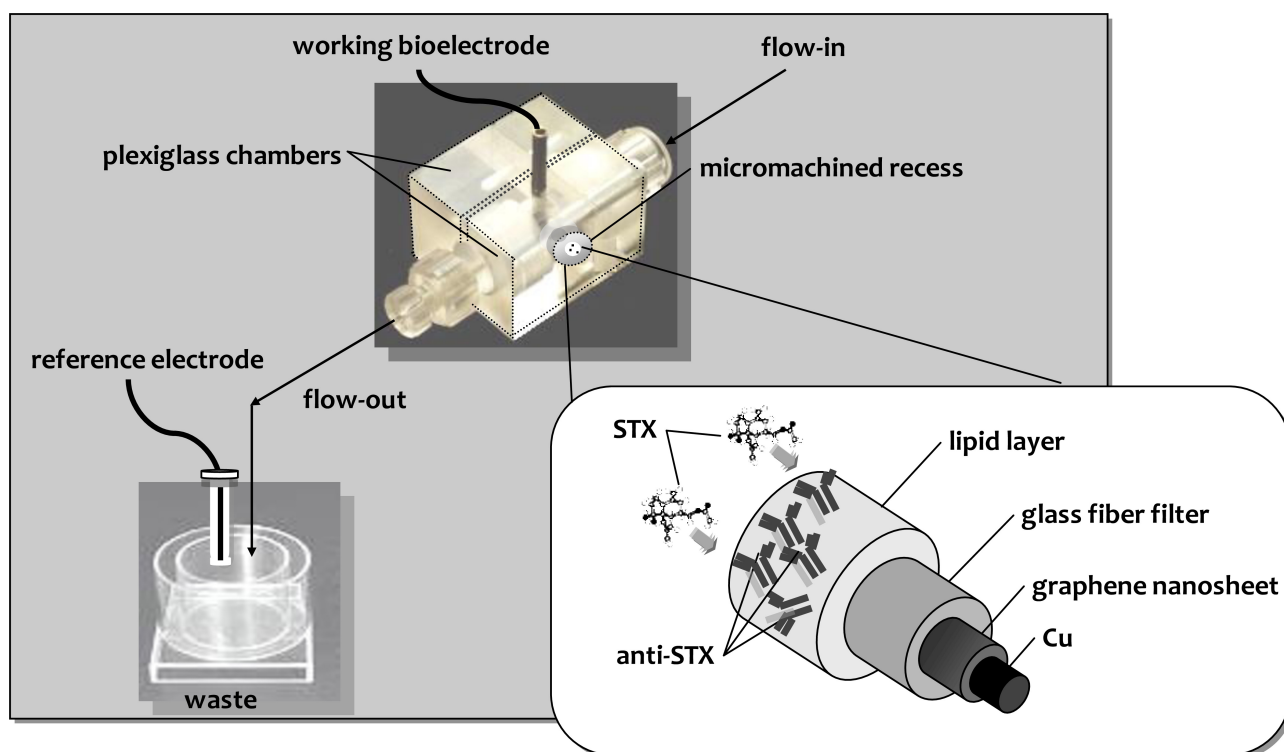


Fig. 2. Schematic configuration of the saxitoxin electrochemical biosensor and the bioelectrode edge surface.

obtained in N-methyl-pyrrolidone (NMP) after mild sonication (using a Bandelin SONOREX Digital 10P sonicator, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) for 180 h and centrifugation at 700 rpm for 2 h. Sonication creates shear stresses and cavitation in the solvent that break apart graphite and exfoliate the sheets into individual graphite flakes [21]. Stabilized lipid films were prepared by polymerization, as previously described in the literature [22,23]. Shortly, 5 mg of DPPC were added to a mixture of 0.070 mL of methylacrylic acid, 0.8 mL of ethylene glycol dimethacrylate, 8 mg of 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile), 1.0 mL of acetonitrile. The mixture was sparged with nitrogen for about 1 min and sonicated for 30 min. For the preparation of the stabilized lipid films, 0.15 mL of this mixture was spread on the microfilter. The filter with the mixture was then irradiated using the UV deuterium lamp. Polymerization was completed within 4 hours. These membranes were stable to store in air for periods of more than two months.

Anti-STX was incorporated in bilayer lipid membranes (BLMs) during polymerization by spreading 10 μL of the antibody suspension along with the polymerization mixture (i.e., for the preparation of the anti-STX-incorporated lipid films, the microfilter was spread with 0.15 mL of the polymerization mixture and 10 μL of antibody suspension). These electrodes can be used once (and then disposed of) or repetitively (after regenerated -see below); when not in use, they are kept at 4 °C.

The preparation of the potentiometric biosensor concluded after the encapsulation of the filter-supported

polymerized lipid film onto the copper wire ($d=0.25$ mm) containing graphene nanosheets (Figure 2).

2.3 Electrochemical Measurements

A two electrode system, i.e., the working bioelectrode: stabilized polymeric lipid membrane/graphene, and the reference electrode: standard Ag/AgCl (homemade, $d=0.25$ mm, prepared in 0.1 M KCl), used to measure the potentiometric electrochemical response of the fabricated saxitoxin biosensor using a Keithley Electrometer Model 614 (in the voltage mode); the voltage was measured against the reference electrode (Figure 2).

Sensor calibration performed in a stopped-flow mode: STX solutions, at 10- μL or 20- μL aliquots, were injected into the carrier electrolyte (pH=7.0) inflow; the flow stopped for 5 min (adequate time to record the response) and then re-started for sensor regeneration. The flow rate used was 2.0 mL/min.

2.4 Simulated and Real Lake Samples

Seven potential interferents usually met in waters were selected (Table 1). Each species was tested individually throughout its stated range and in mixtures on freshly prepared sensors, according to the procedures developed in [20,22,23], based on the Plackett–Burman experimental design [24], i.e., a two-level orthogonal design that minimizes the number of experiments required to allow exploratory study of a large number of factors to see

Table 1. Ionic compounds tested as potential interferents in simulated lake water samples

Matrix substance	Concentration range (mg/L)		
	low	medium	high
Mg ²⁺	8-15	15-30	30-40
Ca ²⁺	30-60	60-110	110-155
HCO ₃ ⁻	100-380	380-650	650-800
SO ₄ ²⁻	50-75	75-120	120-200
Cl ⁻	100-150	150-250	250-300
NO ₃ ⁻	200-350	350-600	600-800
NH ₄ ⁺	10-25	25-50	50-70

whether they have a significant effect on the response. At first, each species was separately tested at three concentration levels (low, medium and high); the higher concentration levels of each factor was used to produce pairwise and combined mixtures. Significance of the effects of interferents was estimated using Student's *t*-test.

Real water has been obtained from Lake Koumoundourou, located at the western part of Attica region (Chaidari City, Greece), with a well known physicochemical and biological profile [25]. The lake samples were stored in 4 °C, according to the procedures described in [25]. Following filtration (two times through Whatman filters Grade GF/A: 1.6 μm), ten lake samples were spiked with STX solution; the samples were mixed with phosphate buffer to pH=7.0 and analyzed immediately similarly to the sensor calibration procedure. An unspiked lake sample, treated similarly to the spiked ones, was used as the control. In order to evaluate the recovery variability of the entire process, six lake samples were spiked with 1 μM STX prior to filtration, treated as described above and analyzed immediately on a freshly prepared sensor.

2.5 Shellfish Samples

The preparation of the samples followed the procedure described in [26]. Freshwater shellfish samples were used for the evaluation of tissue matrix effects. Mussels, molluscs and oysters were purchased fresh from the local market and tested immediately with a commercial ELISA Check kit (Fast Saxitoxin, Ridascreen®, Darmstadt, Germany); all samples were found free of toxin. The samples were washed externally using a brush; the species were removed from their shells, drained and homogenized with a blender. A 5.0 g amount of homogenate was extracted with 15.0 mL of 0.1 M acetic acid. After centrifugation at 2500 rpm for 20 min (at room temperature), the supernatant was collected and the pellet was extracted again with 10.0 mL 0.1 M acetic acid; the supernatants were combined and filtered through 0.22 mm cellulose filter. The filtrate was brought to pH 7.0, spiked with STX solution and analysed on the same day.

3 Results and Discussion

The preparation of stabilized in the air lipid films for repetitive uses has been reported in the literature [23,27] using thermal polymerization 60–80 °C. These high temperature profiles prohibited the incorporation of proteinaceous moieties into the lipid film during the polymerization process; to avoid deactivation, enzymes or receptors could be incorporated afterward. UV polymerization used in the current study permitted the incorporation of the anti-STX during film construction, resulting in a significant optimization of antibody loading.

Graphene nanosheets used in our present studies have permitted sensor miniaturization. The response of the electrochemical biosensor has been measured as the difference of the potential between the working electrode and the reference electrode. A highly stable output has been measured with a linear sensitivity over a large dynamic range from 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M of STX at pH 7.0 (Figure 3). The detection limit was based on the lowest concentration that could be reliably measured with S/N=3 and it was 1 nM. The detectability of the sensor is comparable or even lower than similar approaches reported in literature [11–16]. The sensitivity slope of the sensor had a value of ~60 mV per decade and confirmed the enhancement in the potential value near the surface of the biosensor as the concentration of the analyte increases. The variation coefficient of determination r^2 was 0.9997 ($n=27$) and the reproducibility of response was ± 4.2 – 4.8% within-day analyses ($n=30$ and 5.95% confidence limit) and 5.5% for between-days ($n=12$ and 5.95% confidence limit).

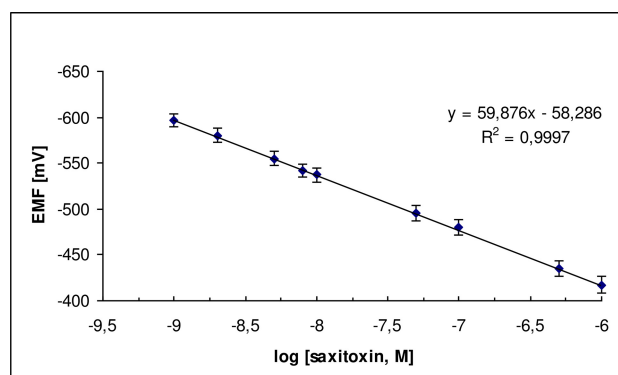


Fig. 3. Calibration curve for STX detection using the miniaturized potentiometric sensor: rabbit serum anti-STX purified IgG incorporated in polymerized lipid films on graphene nanosheets. Experimental conditions: pH 7.0 (PBS); Temperature: 25 °C; STX concentration range: 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M; responses obtained at stop flow mode; reference electrode: Ag/AgCl. Error bars denote standard deviation ($n=3$).

The high sensitivity that was achieved is due to the high surface to volume ratio of graphene nanosheets. Preliminary investigations on the response of the sensor

to the toxin without the graphene modification, indicated a poor output with a sensitivity slope of ~ 30 mV per decade of concentration, over a concentration range of 10×10^{-8} M to 10×10^{-6} M (at pH=7.0). The surface to volume ratio of graphene nanosheets is theoretically predicted to be ~ 2630 m²/g [28], although, in practice, the graphene networks could reach specific surface areas of ~ 1100 m²/g [29,30].

Blank experiments were performed to determine the response of the sensor in the absence of the antibody. These experiments have shown a sensitivity slope of ~ 3 mV per decade of concentration, over a concentration range of 10×10^{-6} M to 10×10^{-3} M (at pH=7). Therefore, it is clear that the non-specific binding is not a critical issue in the reliability of response.

The optimum pH values for STX binding to anti-STX range between 3.0 - 8.0 [31,32]. The sensor response was found to vary with the pH of the measurement medium within the range 5.8 - 8.0 (Figure 4); lower pH values were not considered herein, as the electric capacitance of the lipid bilayers is greatly compromised at acidic conditions [33]. Low readings were obtained at pH 5.8 and 8.0 but an optimum response was observed at pH 6.4 and remained stable at 7.0, which was the pH value used herein, for simplicity and compatibility issues. This behaviour indicates the pH dependence of the binding of the saxitoxin to the sodium ion-channel; the pH of the solution would determine the degree of protonation of the guanidinium groups of STX and, consequently, the binding with the carboxylate residues in the sodium channel binding site [31,32].

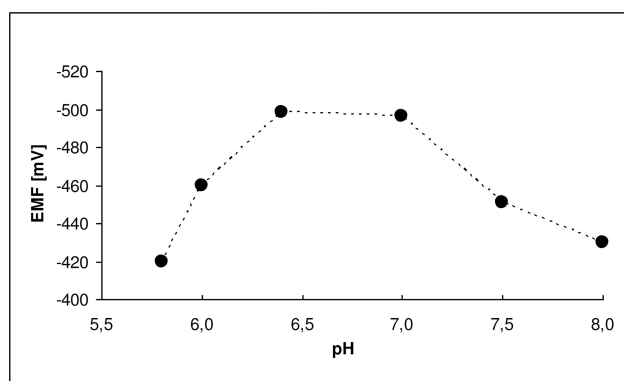


Fig. 4. The response of the miniaturized sensor to 5×10^{-8} M STX over the pH range 5.8 – 8.0.

The present use of the stabilized filter-supported BLMs for saxitoxin detection provides a measuring system in which the antibody is bound onto the lipid membrane and interacts with the toxin in a reversible manner. The biosensor has shown response times from 5 to 20 minutes and this variation in response times depends on the concentration of saxitoxin. At low concentrations of STX (up to 0.1 $\mu\text{g/mL}$), longer response times were observed (max. 20 min), whereas at higher concentrations, steady

state response was achieved within a shorter time period (ca. 5 min). The toxin-antibody binding kinetics are mildly sensitive to toxin concentration [34]; at low concentrations, the slow diffusion of STX to the sensing reagent phase results in a longer time required to attain equilibrium binding. The response times recorded herein (i.e., 5–20 min) are in good agreement with values reported in the literature [32,35,36].

The present sensor can be regenerated either by infinite dilution allowing dissociation to occur by mass action or by the use of chaotropic agents [37]. Chaotropic agents generally act to disrupt antibody-antigen complexes by inducing a change in the antibody structure that results in weakening of the interaction with the antigen [38]. The mass action technique can presently be implemented by the use of the continuous flow system in which the dissociated toxin molecules are continuously removed and therefore are prevented to re-associate with the antibody. A trade-off has been established involving regeneration time and flow rate; the higher the flow rate the faster the regeneration of the platform but the higher the chance of washing the antibody off. An optimum has been found at 2.0 ml/min for 10 minutes.

The maximum number of experiments that could be performed was ca. 10, provided that the potential difference and not the absolute value of the potential is measured (Figure 5). The sensor response drifts for a larger number of injections, which is due to receptor detachment from the lipid film. At any case, the potential drift of the sensor (in the absence of toxin) was 25 ± 1.6 $\mu\text{V/h}$.

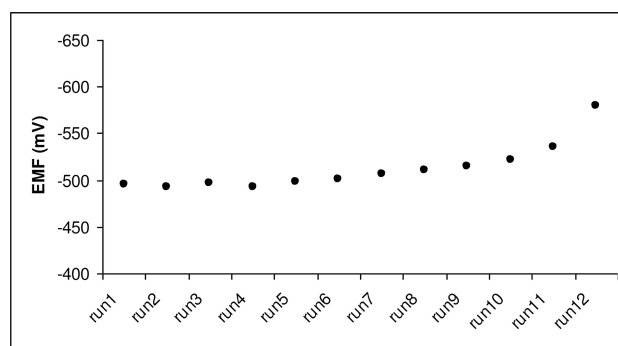


Fig. 5. Sensor response to repetitive injections of 5×10^{-8} M STX (pH=7.0); after each response (recorded at stop flow mode), the sensor was regenerated at 2.0 ml/min flow rate for 10 min before the next STX injection.

In order to exploit the mechanism of signal generation, SEM experiments were performed in the presence and absence of anti-STX and the toxin. SEM images of the polymer without the lipid (Fig. 6 A) show that the structure is not crystalline; in the presence of the lipid (Figure 6B) the structure becomes crystalline. SEM images of the structure of the polymer with the lipid after the incorporation of Anti-STX (Fig. 6C) indicate that the

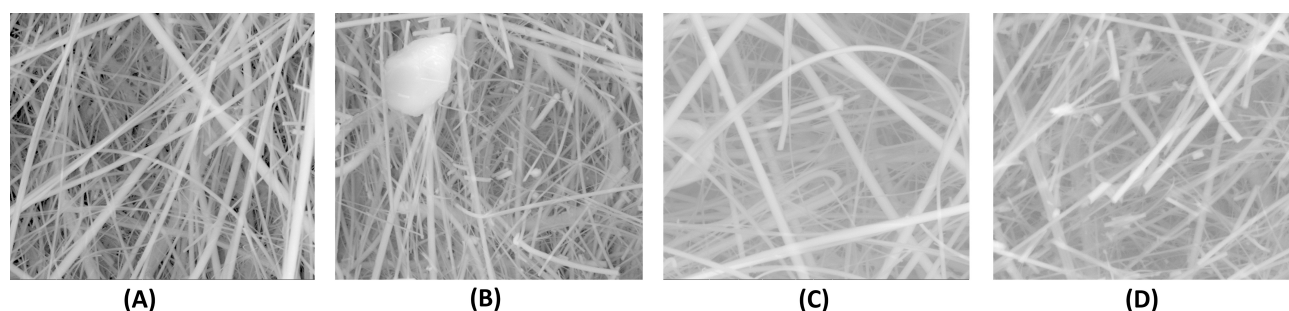


Fig. 6. SEM images of (A) polymer without the lipid, (B) polymer with the lipid, (C) polymer with the lipid after the incorporation of Anti-STX, and (D) same as (C) but a drop of toxin is placed on the filter. Magnification is 2000 x (nm).

presence of the receptor the structure reverts to the non-crystalline image of Fig. 6 A. Following, however, a drop of the toxin onto the filter (Fig. 6D) the structure becomes again crystalline. These results are in agreement with previous obtained results in the literature [39]; STX has demonstrated the ability of electrostatic interactions with lipid membranes [40], whereas its binding to antibodies brings about dynamic conformational changes [41] that could affect the fluidity of the lipid film [42]. This alteration in the phase structure of the lipid film changes the surface potential and electrostatics of the lipid film and in addition the fluidity of the membrane, therefore the changes in the potential changes.

4 Application in Simulated and Real Water Samples

The suitability of the sensor developed for assessing the quality of waters has been investigated using simulated samples with varying levels of seven potential interferents (Table 1). Each species was tested individually throughout its stated range and in mixtures on freshly prepared sensors. No significant interferences were noticed from the presence of these compounds, either individually or in mixtures; at all cases, the relative error did not exceed 5%.

Water from Koumoundourou Lake has provided an appropriate real sample matrix for testing the applicability of the sensor for environmental samples. The microbiological and chemical quality of the lake has been previously investigated, confirming the absence of bacterial toxins [25] In order to assess matrix effects reliably and avoid variability in the recoveries from the extraction process, water samples were spiked with toxin after filtration. Five samples have been used as a low-level control, with an STX concentration of 50 nM, and the remaining five as high-level control, with an STX concentration of 1 μ M.

All samples were analyzed immediately after preparation on the same sensor, using the calibration plot presented in Fig. 3 and the 10-min regeneration scheme described above. The results from the analyses of the

spiked lake samples are presented in Table 2, as % apparent recovery [43] Recovery ranged between 90–106% for the low concentration and 95–102% for the high concentration.

Table 2. Saxitoxin detection in lake water spiked samples with the potentiometric minisensor based on anti-STX - incorporated lipid films on graphene nanosheets

STX contamination level	#sample ID	STX concentration found (\pm SD), $n=3$	apparent recovery (%; observed value / reference value)
Samples spiked after filtration			
Low (50 nM)	#1	45.05 nM (\pm 3.6)	90.10
	#2	53.00 nM (\pm 4.24)	106.0
	#3	46.15 nM (\pm 3.70)	92.30
	#4	51.25 nM (\pm 4.10)	102.5
	#5	45.35 nM (\pm 3.63)	90.70
High (1 μ M)	#6	0.967 μ M (\pm 0.048)	96.70
	#7	1.010 μ M (\pm 0.060)	101.0
	#8	0.955 μ M (\pm 0.030)	95.50
	#9	1.018 μ M (\pm 0.060)	101.8
	#10	0.988 μ M (\pm 0.070)	98.80
Samples spiked before filtration			
High (1 μ M)	#11	1.007 μ M (\pm 0.076)	100.7
	#12	0.970 μ M (\pm 0.046)	97.00
	#13	1.013 μ M (\pm 0.076)	101.3
	#14	0.967 μ M (\pm 0.057)	96.70
	#15	0.973 μ M (\pm 0.107)	97.30
	#16	1.003 μ M (\pm 0.080)	100.3

In order to evaluate the recovery variability of the extraction process, six lake samples were spiked with 1 μM STX prior to filtration and analysed on a freshly prepared sensor, using the calibration plot presented in Fig. 3 and the 10-min regeneration scheme described above. Although a slightly higher variability was observed (as compared to the samples spiked after filtration), recovery ranged between 92–103% (Table 2). According to the 2005 ICH guidelines for analytical validation Q2 (R1), apparent recoveries of 80–115% are acceptable; values greater than 100% are the expected positive side from a typical distribution of analytical results from analytes present at or near 100% that are balanced by equivalent results on the negative side of the mean.

The high recoveries achieved at the present study, especially at the high toxin concentration level, indicate an almost complete mass balance of the recovery analyte, i.e., a good alignment of spiked toxin concentration and calibration. No positive or negative trends, indicative of standard errors, were observed at both STX levels. These results verify the analytical development data, thereby proving the suitability of the minisensor for repetitive water monitoring.

5 Application in Shellfish Samples

The sensor has been validated in freshwater shellfish samples (mussels, molluscs and oysters) purchased fresh from the local market. The samples were immediately tested with a commercial ELISA Check kit and found toxin-free. Following extraction, according to the protocol described in [26], the samples were spiked with STX solution to represent a filtrate concentration of 8 nM (equivalent to 0.5 μg of toxin per g of shellfish). All samples were analyzed immediately after preparation on the same sensor, using the calibration plot presented in Fig. 3 and the 10-min regeneration scheme described above.

The results are shown in Table 3. The sensor gave consistently higher values, possibly due to matrix effects;

Table 3. Saxitoxin detection in freshwater shellfish spiked samples (with 8 nM of toxin) using the potentiometric minisensor based on anti-STX - incorporated lipid films on graphene nanosheets

Shellfish species	#sample ID	STX concentration found (\pm SD), n=3	apparent recovery (%), observed value / reference value)
Mussels	#1	8.28 nM (\pm 0.40)	103.5
	#2	8.40 nM (\pm 0.60)	105.0
	#3	8.37 nM (\pm 0.25)	104.6
Mollusks	#1	8.34 nM (\pm 0.92)	104.2
	#2	8.54 nM (\pm 0.51)	106.8
	#3	8.46 nM (\pm 0.42)	105.7
Oysters	#1	8.53 nM (\pm 0.34)	106.6
	#2	8.23 nM (\pm 0.08)	102.9
	#3	8.27 nM (\pm 0.17)	103.4

yet, the maximum deviation observed was only 6.8%, rendering the sensor quite capable of measuring contaminated and complex field samples. Nonetheless, the effect of organic matter needs to be investigated in depth and the results obtained in the present study should be further verified with more shellfish samples. Moreover, toxin losses and recovery variability due to the extraction process should be estimated; according to literature, high variability and considerable losses (up to 10%) are expected for both, intracellular [44] and extracellular [45] toxin content.

6 Conclusions

The present article describes the preparation of a novel miniaturized biosensor, based on a polymer stabilized lipid film and an incorporated saxitoxin antibody packed on graphene nanosheets. The sensor exhibits long shelf life and adequate operational stability for environmental and food analysis. The sensor has been validated for saxitoxin detection in water and shellfish; the results indicate that the anti-STX-saxitoxin interactions employed herein might serve as a suitable model for developing detection schemes for other channel blocking toxins, such as brevetoxin, palytoxin or ciguatoxin.

The advantages of the method presented are fast response times (5–20 min, depending on toxin concentration) and nanomolar detection levels without significant interference from other water constituents. The biosensing surface can be easily and reproducibly prepared and renewed. The lipid membrane interface at the biosensing surface provides a biocompatible environment that has proven beneficial in resisting nonspecific adsorption of anionic and cationic species, thus ensuring a low background signal in the assay. The proposed sensor reveals good reproducibility, reusability and selectivity along with a high sensitivity of ca. ~ 60 mV/decade over a wide logarithmic range of saxitoxin concentrations ranging from 1×10^{-9} M to 1×10^{-6} M. The proposed scheme can be easily packed into a portable field detector for rapid water quality preliminary assessment for life-threatening contaminants and bioterrorism attacks.

References

- [1] Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – saxitoxin group, *EFSA J.* **2009**, 1019, 1.
- [2] Washington State provisional recreational guidance for cylindrospermopsin and saxitoxin, **2011**, DOH 332–118.
- [3] R. Munday, K. Thomas, R. Gibbs, C. Murphy, M. A. Quilliam, *Toxicon* **2013**, 76, 77.
- [4] S. Cestèle, W. A. Catterall, *Biochimie* **2000**, 82, 883.
- [5] D. M. Anderson, P. M. Glibert, J. M. Burkholder, *Estuaries* **2002**, 25, 704.
- [6] F. Garcia Camacho, J. Gallardo. Rodríguez, A. Sánchez Mirón, M. C. Cerón García, E. H. Belarbi, Y. Chisti, E. Molina Grima, *Biotechnol. Adv.* **2007**, 176.

- [7] K. A. Lefebvre, L. Quakenbush, E. Frame, K. Burek Huntington, G. Sheffield, R. Stimmelmayer, A. Bryan, P. Kendrick, H. Ziel, T. Goldstein, J. A. Snyder, T. Gelatt, F. Gulland, B. Dickerson, V. Gill, *Harmful Algae* **2016**, *55*, 13.
- [8] K. D. Cusick, G. S. Sayler, *Mar. Drugs* **2013**, *1*, 991.
- [9] M. Halme, M. L. Rapinoja, M. Karjalainen, P. Vanninen P, *J. Chromatogr. B* **2012**, *880*, 50.
- [10] D. Garibo, K. Campbell, A. Casanova, P. de la Iglesia, M. Fernández-Tejedor, J. Diogène, C.T. Elliott, M. Campàs, *Sens. Actuat. B-Chem.* **2014**, *190*, 822.
- [11] W. Henao-Escobar, L. del Torno-de Román, O. Domínguez-Renedo, M. Alonso-Lomillo, M. Arcos-Martínez, *Food Chem.* **2016**, *190*, 818.
- [12] Q. Wang, J. Fang, D. Cao, H. Li, K. Su, N. Hu, P. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *72*, 10.
- [13] O. Sadik, F. Yan, *Chem. Commun.* **2004**, *7*, 1136.
- [14] K. Zhu, R. Dietrich, A. Didier, D. Doyscher, E. Märklbauer, *Toxins* **2014**, *6*, 1325.
- [15] H. Chen, Y. Kim, S. Keum, *Sensors* **2007**, *7*, 1216.
- [16] L. Hou, L. Jiang, Y. Song, Y. Ding, J. Zhang, X. Wu, D. Tang, *Microchim Acta* **2016**, *183*, 1971.
- [17] D. P. Nikolelis, M. Mitrokotsa, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 565.
- [18] D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, M. G. Simantiraki, M. G. S. Koinis, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2174.
- [19] D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, N. Ferderigos, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3217.
- [20] D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, G.-P. Nikoleli, M. Simantiraki, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 2467.
- [21] D. W. Johnson, B. P. Dobson, K. S. Coleman, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2015**, *20*, 367.
- [22] D. P. Nikolelis, N. Ntanos, G.-P. Nikoleli, K. Tampouris, *Protein Peptide Lett.* **2008**, *15*, 789.
- [23] D. P. Nikolelis, T.-I. Chaloulakos, G.-P. Nikoleli, N. Psaroudakis, *Talanta* **2008**, *77*, 786.
- [24] J. Kochana, A. Gala, A. Parczewski, J. Adamski, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1275.
- [25] E. Dimitriou, I. Karaouzas, K. Sarantakos, I. Zacharias, K. Bogdanos, A. Diapoulis, *J. Environ. Manage.* **2008**, *88*, 526.
- [26] X. Zhang, Z. Zhang, *J. Food. Compos. Anal.* **2012**, *28*, 61.
- [27] G.-P. Nikoleli, M. Q. Israr, N. Tzamtzis, D. P. Nikolelis, M. Willander, N. Psaroudakis, *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1285.
- [28] M. D. Stoller, S. J. Park, Y. W. Zhu, J. H. An, R. S. Ruoff, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3498.
- [29] J. R. Miller, R. A. Outlaw, B. C. Holloway, *Science* *m²/g*, 329, 1637.
- [30] Z. Bo, Y. Yang, J. Chen, K. Yu, J. Yana, K. Cena, *Nanoscale* **2013**, *5*, 5180.
- [31] S. L. Hu, C. Y. Kao, *J. Gen. Physiol.*, **1991**, *97*, 561.
- [32] J.H. Bergantin, F. Sevilla III, *Anal. Lett.*, **2010**, *43*, 476.
- [33] M. Naumowicz, Z. A. Figaszewski, L. Póttorak. *Electrochim Acta.* **2013**, *91*, 367.
- [34] A. Sadana, N. Sadana, *Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics*, Elsevier Science, **2010**, Ch. 14, pp. 389–418.
- [35] E. Usleber E, E. Schneider, G. Terplan, M. V. Laycock, *Food Addit. Contam.* **1995**, *12*, 405.
- [36] B. J. Yakes, S. Prezioso, S. A. Haughey, K. Campbell, C. T. Elliott, S. L. DeGrasse, *Sens. Actuat. B-Chem.* **2011**, *156*, 805.
- [37] F. V. Bright, T. A. Betts, K. S. Litwiler, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1065.
- [38] L. Locascio-Brown, A. L. Plant, V. Horvath, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2587.
- [39] L. Zou, C. Wu, Q. Wang, J. Zhou, K. Su, H. Li, N. Hu, P. Wang, *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *67*, 458.
- [40] L. M. Durán-Riveroll, A. D. Cembella, C. J. Band-Schmidt, J. J. Bustillos-Guzmán, J. Correa-Basurto, *Toxins* **2016**, *8*, 129.
- [41] D. Tobi, I. Bahar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18908.
- [42] L. Schild, E. Moczydlowski, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 523.
- [43] D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 2201.
- [44] L. A. Mackenzie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 326.
- [45] T. Rundberget, M. Sandvik, K. Larsen, G. M. Pizarro, B. Reguera, T. Castberg, E. Gustad, J. I. Loader, F. Rise, A. L. Wilkins, C. O. Miles, *Toxicol.* **2007**, *50*, 960.

Received: October 14, 2016

Accepted: November 25, 2016

Published online on December 21, 2016

IV. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στην Αθήνα το 1986. Έλαβα μέρος στις πανελλήνιες εισαγωγικές εξετάσεις του 2004 και εισήχθη στο ΤΕΙ Αθήνας, Τμήμα Δημόσια Υγείας όπου και φοίτησα μόνο 3 εξάμηνα σπουδών. Ακολούθως διέκοψα, και συμμετείχα το 2006 στις πανελλήνιες εξετάσεις, όπου εισήχθη στο Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Σχολή Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου (Νέος τίτλος: Τμήμα Ωκεανογραφίας και Θαλασσιών Βιοεπιστημών) από το οποίο αποφοίτησα το 2012. Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο Τμήμα παρακολούθησα διάφορα Συνέδρια (13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων «Υδάτινοι Βιολογικοί Πόροι & Οικοσυστήματα», 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οικολογίας «Οικολογική Έρευνα στην Ελλάδα: τάσεις, προκλήσεις, εφαρμογές», «Λειψυδρία, Περιβαλλοντικές και Ανθρωπογεωγραφικές επιπτώσεις»), ενώ πραγματοποίησα 3μηνη πρακτική άσκηση στο πλαίσιο της οποίας ολοκλήρωσα τη διπλωματική μου εργασία υπό τον καθηγητή κ. Β. Μπακόπουλο, την οποία ανακοίνωσα στο «7th International Conference Instrumental Methods of Analysis -IMA 2011».

Εργάστηκα για ένα έτος (15/01/2012-31/12/2012) στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού» στο πλαίσιο της πράξης με τίτλο “Υποστήριξη και Συμβουλευτική της Διεύθυνσης Ποιότητας και Αποδοτικότητας του Υ.Υ.Κ.Α. και των επτά (7) ΥΠΕ της χώρας στην ανάπτυξη συστημάτων ποιότητας” και από το 2013-2015 στο πρόγραμμα υλοποίηση της Πράξης: «Πρακτική Άσκηση Τ.Ε.Ι. Αθήνας».

Το 2015 ολοκλήρωσα το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στη «Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος» στο Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μεταπτυχιακή μου εργασία με θέμα «ανάπτυξη ποτενσιομετρικού αισθητήρα για την ταχεία ανίχνευση καρμποφουρανίου σε σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες με ενσωματωμένο υποδοχέα calix [4]arene phosphoryl χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο γραφενίου» βρίσκεται δημοσιευμένη στο περιοδικό *Electroanalysis* (2015) **27**, 2608–2613.

Από το 2015 έως σήμερα συμμετέχω με μερική απασχόληση στην εκπόνηση του έργου «Υποστήριξη του Προγράμματος Erasmus+ - Διεθνής κινητικότητα» και «Υποστήριξη του Προγράμματος Erasmus+ - Ομίλος πρακτικής άσκησης» μεταξύ χωρών του προγράμματος και εταίρων χωρών με το πρώην ΤΕΙ Αθήνας και τώρα Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής (2015-2019) συμμετείχα σε επικουρικό έργο στις εργαστηριακές ασκήσεις του μαθήματος Αναλυτική Χημεία και Ανόργανη Χημεία της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Από το ερευνητικό έργο του διδακτορικού προέκυψαν οι δύο (2) κύριες εργασίες δημοσιευμένες στο περιοδικό *Electroanalysis* και επί πλέον μία (1) εργασία με ανάλογο πειραματικό περιεχόμενο στο περιοδικό *Journal of Materials and Environmental Science*, ως συνεργάτης στο ερευνητικό εργαστήριο IMD-Laboratories Co. Επίσης συμμετείχα σε έξι (6) άρθρα ανασκόπησης και σε επτά (7) κεφάλαια βιβλίων σχετικά με το θέμα των βιοαισθητήρων, όπως φαίνεται στον κατάλογο των δημοσιεύσεων που ακολουθεί.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Nikoleli, G-P, Siontorou, C. G., Nikoleli, M-T., **Bratakou, S.**, and Bendos, D. K. (2019). Recent Lipid Membrane-Based Biosensing Platforms. *Applied Sciences* **9**, 1745; doi:10.3390/app9091745.

Bousiakou, L. G., and **Bratakou, S.** (2018). Current trends in nanobiosensing towards lab-on-a-chip devices for ultrasensitive analyte detection. *Journal of Materials and Environmental Science* **9** (10), 2932-2944.

Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Siontorou, G. C., Nikolelis, D. P., Karapetis, S., and Tzamtzis, N. (2017). Development of an electrochemical biosensor for the rapid detection of saxitoxin based on air stable lipid films with incorporated Anti-STX using graphene electrodes. *Electroanalysis* **29**, 990–997.

Nikoleli, G.-P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., **Bratakou, S.**, Karapetis, S., and Tzamtzis, N (2017). Biosensors based on lipid modified graphene microelectrodes. *Carbon* **3** (1), 9.

Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., and Tzamtzis, N. (2016). Electrochemical biosensor for naphthalene acetic acid in fruits and vegetables based on lipid films with incorporated auxin-binding protein receptor using graphene electrodes. *Electroanalysis* **28**, 2171–2177.

Christina G. Siontorou, Basileios Th.Keramidas, Georgia-Paraskevi D. Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, Stefanos Karapetis, **Spyridoula Bratakou**, Nikolaos Tzamtzis. (2016). Nano-enabled medical devices based on biosensing principles: Technology basis and new concepts. *AIMS Journal* **4** (1), 250-266.

Christina G. Siontorou, Konstantinos N. Georgopoulos, Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, Stefanos K. Karapetis, **Spyridoula Bratakou**, Nikolaos Tzamtzis. (2016). Protein – Based Graphene Tools in Protein-Based Biosensors: Optimizing Artificial Chemoreception in Bilayer Lipid Membranes. *Membranes* **6** (3), 43

Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Nikolelis, D. P., and Psaroudakis, N. (2015). Development of a potentiometric chemical sensor for the rapid detection of carbofuran based on air stable lipid films with incorporated calix [4]arene phosphoryl receptor using graphene electrodes. *Electroanalysis* **27**, 2608–2613.

Nikolelis, D. P, Siontorou, C. G, **Bratakou, S.**, Nikoleli, G-P., Karapetis, S. (2015). Single domain antibodies in bio-sensing. *Kenkyu Journal of Nanotechnology and Nanoscience* **2** (1), 2:100113

Georgia-Paraskevi Nikoleli, **Spyridoula Bratakou**, Vassilios N. Psychoyios, Stefanos K. Karapetis, Dimitrios P. Nikolelis, Nikolaos Tzamtzis, Nikolaos Psaroudakis and Theodoros H. Varzakas. (2015). Some typical examples of graphene and ZnO microelectrode based electroanalytical biosensors. *Kenkyu Journal of Nanotechnology and Nanoscience*, **1** (3), 1:100111.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Spyridoula M. Bratakou, Vassilia J. Sinanoglou, Vladimiro Lougovois and Vassilis Bakopoulos. (2011). Effects of frozen storage on sensory characteristics and on lipids and fatty acid composition of gilthead sea bream, *Sparus aurata* skin-on fillets. «7th International Conference Instrumental Methods of Analysis -IMA 2011». September 18-22, 2011, Chania Crete, Greece.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΒΙΒΛΙΩΝ

Georgia-Paraskevi Nikoleli, Christina G. Siontorou, Dimitrios P. Nikolelis, Stephanos Karapetis, **Spyridoula Bratakou**. (2018). Prototype biosensing devices: Design and microfabrication based on nanotechnological tools for the rapid in the field detection of food toxicants and environmental

pollutants. In: *Nanotechnology and Biosensors* (Eds, N. D. Nikolelis and G-P, Nikoleli), Ch. 1, pp. 1-28. Elsevier Inc.

Anastasios Economoy, Stephanos K. Karapetis, Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, **Spyridoula Bratakou** and Theodoros H. Varzakas. (2017). Enzyme-based Sensors. In: *Advances in Food Diagnostics* (Eds, L. M. L. Nollet and F. Toldra), 2nd edition, Ch. 9, pp. 231-248. Wiley Blackwell.

Stephanos K. Karapetis, **Spyridoula M. Bratakou**, Georgia-Paraskevi Nikoleli, Christina G. Siontorou, Dimitrios P. Nikolelis and Nikolaos Tzamtzis. (2017). Graphene and Carbon Nanotube-Based Biosensors for Food Analysis. In: *Advances in Food Diagnostics* (Eds, L. M. L. Nollet, and F. Toldra), 2nd edition, Ch. 11, pp. 269-274. Wiley Blackwell.

Christina G. Siontorou, Georgia-Paraskevi D. Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, Stefanos Karapetis, Nikolaos Tzamtzis and **Spyridoula Bratakou**. (2017). Point-of-care and implantable biosensors in cancer research and diagnosis. In: *Next generation point-of-care biomedical sensors technologies for cancer diagnosis* (Eds, P. Chandra, Y. N. Tan, and S.P. Sangh), Ch. 5, pp. 114-132. Springer Nature Singapore Pte Ltd.

Georgia-Paraskevi Nikoleli, Stephanos Karapetis, **Spyridoula Bratakou**, Dimitrios P. Nikolelis, Nikolaos Tzamtzis and Vasillios N. Psychoyios. (2016). Graphene-based Electrochemical Biosensors: New Trends and Applications. In: *Intelligent Nanomaterials* (Eds, A. Tiwari, Y. K. Mishra, H. Kobayashi, and A. P. F. Turner), 2nd edition Part 2, Ch. 13, pp. 428-445. Advanced Materials Book Series. WILEY-Scrivener Publishing, USA.

Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, Theodoros Varzakas **Spyridoula Bratakou**, Vasillios N. Psychoyios. (2016). Applications of graphene microelectrodes in clinical analysis. Ch. 22, pp. 459-472. In: *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis*. (Ed, P. Chandra, and E. Sengal). The Institution of Engineering and Technology (IET), UK.

Georgia-Paraskevi Nikoleli, Stephanos Karapetis, **Spyridoula Bratakou**, Dimitrios P. Nikolelis, Nikolaos Tzamtzis, Vasilios N. Psychoyios and Nikolas Psaroudakis. (2016). Biosensors for security and dioterrorism: Definitions, history, types of agents, new trends and applications. In: *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications* (Eds, D. P. Nikolelis and G-P. Nikoleli), Ch. 1, pp. 1-13. Advanced Sciences and Technologies for Security Applications, Springer International Publishing.