



Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών  
Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις»

**ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ  
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ  
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ  
ΠΛΑΤΙΝΑΣ/DNAΖΥΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΟΝΤΩΝ ΒΑΡΕΩΝ  
ΜΕΤΑΛΛΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παναγοπούλου Χρυσή**

A.M.: 09921014

Επιβλέπων: Δ. Τσουκαλάς

ΑΘΗΝΑ 2023



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Τσουκαλά για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Προηγμένων Υλικών και Μικρο-Νανοδιατάξεων της Σ.Ε.Μ.Φ.Ε. του Ε.Μ.Π. για τη βοήθειά τους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους ερευνητές Ασλανίδη Ευάγγελο και Σκοτάδη Ευάγγελο για τη συμβολή, την πολύτιμη βοήθεια και τη υπομονή τους σε κάθε στάδιο της εργασίας. Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω τον ερευνητή Τσέκενη Γεώργιο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) για τη χορήγηση των βιολογικών υλικών. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τη Γεωργία Τζουρμανά και την Αννίτα Ράπεση για τη συνεισφορά τους στην πειραματική διαδικασία.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ABSTRACT .....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : Βασικές έννοιες περί αισθητήρων νανοσωματιδίων και βιολογικών αισθητήρων.....	8
1.1 Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή.....	8
1.2 Ορισμός και χαρακτηριστικά αισθητήρων.....	9
1.3 Ταξινόμηση αισθητήρων.....	13
1.4 Βιολογικοί αισθητήρες.....	15
1.4.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες .....	17
1.5 Νανοσωματίδια .....	19
1.6 Μηχανισμοί αγωγιμότητας νανοσωματιδίων.....	22
1.6.1 Φαινόμενο σήραγγας (tunneling) .....	22
1.6.2 Επίδραση φαινομένων φόρτισης.....	24
1.7 Μηχανισμοί αγωγιμότητας στο DNA.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : Βιολογικοί αισθητήρες για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων- Μεθοδολογία κατασκευής .....	27
2.1 Ιοντοβολή (Sputtering) .....	27
2.2 RF Sputtering .....	28
2.3 DC Sputtering.....	29
2.4 Παραγωγή νανοσωματιδίων μέσω ιοντοβολής.....	30
2.5 Εξάχνωση μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίων (e-gun evaporation).....	31
2.6 Κατασκευή ηλεκτροδίων .....	32
2.7 Βιολογική τροποποίηση αισθητήρων.....	33
2.7.1 DNAzymes .....	33
2.7.2 Χρήση βιοαισθητήρων για ανίχνευση βαρέων μετάλλων.....	35
2.7.3 Πρωτόκολλα ακινητοποίησης DNAzymes.....	37
2.8 Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευής βιοαισθητήρων .....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : Πειραματική διαδικασία μετρήσεων και παρουσίαση αποτελεσμάτων .....	47
3.1 Οργανολογία μετρήσεων .....	47
3.2 Πειραματική διαδικασία .....	48
3.3 Παρουσίαση πειραματικών αποτελεσμάτων.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα και προοπτικές.....	62
Βιβλιογραφία.....	64

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σημερινή εποχή, η μόλυνση του περιβάλλοντος απαιτεί αποτελεσματικές και αξιόπιστες λύσεις, ιδιαίτερα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ρύπων σε φυσικούς πόρους, όπως ο αέρας και το νερό. Μεταξύ των συνηθέστερων ρυπογόνων ουσιών είναι τα ιόντα βαρέων μετάλλων, τα φυτοφάρμακα, τα μεταλλοειδή, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα αντιβιοτικά, ενώ το νερό βρύσης, οι λίμνες, τα ποτάμια, τα υπόγεια ύδατα και τα λύματα είναι οι πιο συνηθισμένες περιβαλλοντικές μήτρες. Ωστόσο, η ανίχνευση ρύπων σε τέτοιες μήτρες αποτελεί πρόκληση λόγω της πολυπλοκότητας και της μεταβλητότητάς τους, γεγονός που καθιστά αναγκαία την εφαρμογή ιδιαίτερα ευαίσθητων και επιλεκτικών μεθόδων ανίχνευσης με χαμηλά όρια ανίχνευσης. Τα ιόντα βαρέων μετάλλων αποτελούν ένα από τα πιο επικίνδυνα υποπροϊόντα της ταχείας εκβιομηχάνισης, καθώς και σημαντική απειλή τόσο για την ανθρώπινη ζωή, όσο και για τη χλωρίδα και την πανίδα. Η μόλυνση του νερού από τόσο επικίνδυνες ουσίες είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, δεδομένου ότι η συσσώρευση μολυσματικών ουσιών στο πόσιμο ή αρδευτικό νερό μπορεί να επηρεάσει όλο το φάσμα της τροφικής αλυσίδας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε ένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας που βασίζεται σε ένα υβρίδιο μεταλλικών νανοσωματιδίων πλατίνας και DNAzymes για την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων στο νερό. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε ανίχνευση ιόντων μολύβδου, καδμίου και τρισθενούς χρωμίου, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια στο πόσιμο νερό. Για να επιτευχθεί ο έλεγχος της επιφανειακής κάλυψης των νανοσωματιδίων και της αντίστασης της διάταξης, τα νανοσωματίδια εναποτίθενται σε υποστρώματα πυριτίου και πολυϊμιδίου με την τεχνική sputtering. Ο βιοαισθητήρας αξιοποιεί τα DNAzymes, ένα βιοϋλικό που αλληλεπιδρά επιλεκτικά με τα ιόντα βαρέων μετάλλων και παρουσία αυτών, οι ενζυματικές αλυσίδες τους διασπώνται σε επιμέρους κομμάτια. Το καταλυτικό DNA στην επιφάνεια του αισθητήρα και μεταξύ των νανοσωματιδίων γεφυρώνει τα νανοσωματίδια ή τα συσσωματώματα νανοσωματιδίων, δημιουργώντας περισσότερους αγωγίμους δρόμους στα ηλεκτρόδια του αισθητήρα. Κατά την ανίχνευση των ιόντων βαρέων μετάλλων, τα DNAzymes αυτοκαταλύουν την υδρόλυση της ίδιας τους της αλυσίδας, καθώς οι αγωγίμες γέφυρες καταρρέουν επιλεκτικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια μετρήσιμη αλλαγή στην αντίσταση της διάταξης που μεταφράζεται σε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση. Επιπροσθέτως, η εργασία εστιάζει στον αντίκτυπο των χαρακτηριστικών ομάδων επιφανειακής

τροποποίησης για την ακινητοποίηση των DNAzymes, εξετάζοντας την απόδοση των αισθητήρων για πρωτόκολλα τροποποίησης με ομάδες αμίνης και θειόλης. Οι αισθητήρες συγκεντρωτικά παρουσίασαν όριο αντίχυνσης στα 10 nM και τιμές απόκρισης μέχρι και 71,428%.

**Λέξεις-κλειδιά:** μεταλλικά νανοσωματίδια, ηλεκτροχημικοί αισθητήρες, βιοαισθητήρες, DNAzymes, πλατίνα, βαρέα μέταλλα, μόλυβδος, κάδμιο, χρώμιο

## ABSTRACT

Nowadays, efficient and reliable solutions are required for environmental contamination, especially in the detection and quantification of pollutants in natural resources, such as air and water. Heavy metal ions, pesticides, metalloids, mineral nutrients, pharmaceuticals, and antibiotics are among the most common pollutants found in tap water, lakes, rivers, groundwater, and sewage - the most common environmental matrices. However, detecting contaminants in such matrices is challenging due to their complexity and variability. This necessitates the application of highly sensitive and selective detection methods with low detection limits. Heavy metal ions are one of the most dangerous byproducts of rapid industrialization and pose a significant threat to both human life and flora and fauna. Contamination of water by such dangerous substances is particularly critical because the accumulation of contaminants in drinking or irrigation water can affect the entire spectrum of the food chain.

In the present work, an electrochemical biosensor based on a hybrid of platinum metal nanoparticles and DNAzymes was developed for the detection of heavy metal ions in water. Specifically, the biosensor achieved the detection of lead, cadmium, and trivalent chromium ions at concentrations lower than the maximum permissible limits in drinking water. To control the nanoparticle surface coverage and device resistance, the nanoparticles were deposited on silicon and polyimide substrates using the sputtering technique. The biosensor utilizes DNAzymes, a biomaterial that selectively interacts with heavy metal ions. In the presence of heavy metal ions, the enzymatic strands of DNAzymes are broken into individual pieces. Catalytic DNA on the surface of the sensor and between the nanoparticles bridges the nanoparticles or nanoparticle aggregates, creating more conductive pathways to the sensor electrodes. Upon sensing heavy metal ions, DNAzymes self-catalyze the hydrolysis of their own strand, and the conducting bridges selectively collapse, resulting in a measurable change in array resistance that translates into qualitative and quantitative detection. Furthermore, the work examines the impact of characteristic surface modification groups on the functionalization of DNAzymes by analyzing the performance of the sensors for amine- and thiol-modification functional groups. The sensors collectively exhibited a detection limit of 10 nM and response values up to 71.428%.

**Keywords:** metallic nanoparticles, electrochemical sensors, biosensors, DNazymes, platinum, heavy metals, lead, chromium, cadmium



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> : Βασικές έννοιες περί αισθητήρων νανοσωματιδίων και βιολογικών αισθητήρων

## 1.1 Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή

Οι αισθητήρες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινότητας του σύγχρονου κόσμου. Χάρη στην εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής, ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που βασίζεται στη χρήση καινοτόμων τεχνολογιών αισθητήρων έχει συμβάλει στη βελτίωση του τρόπου ζωής, από την υγειονομική περίθαλψη, την ασφάλεια και την περιβαλλοντική προστασία, μέχρι τη βιομηχανία και την επιστημονική έρευνα. Οι αισθητήρες αυξάνουν την ικανότητα παρατήρησης και αναφοράς του κόσμου γύρω μας και είναι φτιαγμένοι ώστε να κάνουν την ανθρώπινη ζωή σημαντικά πιο προσιτή και βελτιωμένη σε όλους σχεδόν τους τομείς. [1]

Το ίδιο το ανθρώπινο σώμα αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα ενός σύνθετου συστήματος αισθητήρων, με ευρεία γκάμα ανίχνευσης εξωτερικών ερεθισμάτων, που χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Το ανθρώπινο μάτι ως αισθητήριο όργανο όρασης ή το ανθρώπινο αυτί ως αισθητήρας ακοής είναι δύο μόνο περιπτώσεις οργάνων που, συλλέγοντας οπτικά και ακουστικά σήματα, αντίστοιχα, διευκόλυναν την επιβίωση και εξέλιξη του είδους ως προς την εύρεση τροφής και προστασίας από φυσικούς εξωτερικούς κινδύνους. [2]

Η ραγδαία εξέλιξη στον τεχνολογικό τομέα των αισθητήρων οφείλεται πρωτίστως στην ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής, καθώς επίσης και της τεχνολογίας των ημιαγωγών και συγκεκριμένα του πυριτίου. Ο τομέας της μικροηλεκτρονικής ξεκίνησε το 1948, όταν εφευρέθηκε το πρώτο τρανζίστορ, ένα τρανζίστορ σημειακής επαφής, το οποίο αντικαταστάθηκε τη δεκαετία του 1950 από το τρανζίστορ διπολικής σύνδεσης (Bipolar Junction Transistor). Το πρώτο σύγχρονο τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (Junction Field-Effect Transistor) προτάθηκε από τον Shockley το 1952. Αυτοί οι δύο τελευταίοι τύποι ηλεκτρονικών διατάξεων αποτελούν τη βάση όλων των μικροηλεκτρονικών στοιχείων.

Παράλληλα, η ανάπτυξη της τεχνολογίας των ημιαγωγών και ιδιαίτερα της τεχνολογίας του πυριτίου από τη δεκαετία του 1960, έδωσε ώθηση στην ταχύτητα επεξεργασίας πληροφορίας, καθώς και στην αύξηση της πυκνότητας της αποθηκευόμενης πληροφορίας (μνήμης). Επιπλέον, αποδείχθηκε πως το πυρίτιο εκτός από κατάλληλες ηλεκτρονικές ιδιότητες χαρακτηρίζεται και από πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες που είναι απαραίτητες στην κατασκευή διατάξεων αισθητήρων. Όλα αυτά,

σε συνδυασμό με την ανάπτυξη στον τομέα των ολοκληρωμένων κυκλωμάτων ήδη από το 1958, οδήγησαν στην κατασκευή του σύγχρονου υπολογιστή. [3] [4]

Χάρη στις εξελίξεις της μικροηλεκτρονικής, τέθηκαν οι κατάλληλες βάσεις για την κατασκευή συστημάτων ελέγχου πολύ μικρών διαστάσεων. Ένα οποιοδήποτε σύστημα ελέγχου θεωρείται πως αποτελείται από τρία κύρια μέρη (υποσυστήματα): ένα υποσύστημα με σκοπό τη συλλογή πληροφορίας από το περιβάλλον, ένα υποσύστημα επεξεργασίας της πληροφορίας ώστε να λαμβάνεται η βέλτιστη απόφαση και τέλος, ένα υποσύστημα εκτέλεσης της απόφασης. Τα τρία αυτά υποσυστήματα τα ονομάζουμε αντίστοιχα αισθητήρα, επεξεργαστή και ενεργοποιητή. Μειώνοντας τις διαστάσεις και ενσωματώνοντας την τεχνολογία επεξεργασίας ολοκληρωμένων κυκλωμάτων, κατασκευάστηκαν τα πρώτα συστήματα ελέγχου πολύ μικρής κλίμακας μεγέθους, της τάξης των μερικών χιλιοστών του μέτρου. Πρόκειται για τα επονομαζόμενα από τη βιβλιογραφία ως μικροσυστήματα (microsystems) ή μικρο-ηλεκτρο-μηχανικά συστήματα (microelectromechanical systems ή MEMS) ή μικρομηχανές (micromachines). Σκοπός των μικροσυστημάτων είναι να συλλέγουν φυσικές και χημικές πληροφορίες διαφόρων ειδών για το περιβάλλον τους και να τις μετατρέπουν σε μορφή πιο κατάλληλη για τις ανθρώπινες αισθήσεις και τα υπάρχοντα τεχνικά συστήματα. [5] [4] [6]

Με τη δραματική αύξηση της έρευνας και ανάπτυξης των εφαρμογών στον κλάδο των MEMS τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, οι αισθητήρες βρίσκονται σίγουρα στα πρόθυρα μιας επανάστασης παρόμοιας με εκείνη που σημειώθηκε με τους μικροϋπολογιστές τη δεκαετία του 1980. Δεν είναι τυχαίο, άλλωστε, που η πρώτη δεκαετία του 21ου αιώνα έχει χαρακτηριστεί από ορισμένους ως η «δεκαετία των αισθητήρων». Μόνο στα αυτοκίνητα, οι ανάγκες για αισθητήρες αυξάνονται αλματωδώς, ενώ οι τεχνολογίες ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται είναι τόσο ποικίλες όσο και οι εφαρμογές. Συνολικά τεράστια πρόοδος έχει σημειωθεί στην τεχνολογία των αισθητήρων και υπάρχει πληθώρα προοπτικών στον ορίζοντα. [7]

## 1.2 Ορισμός και χαρακτηριστικά αισθητήρων

Ως αισθητήρας ορίζεται «η διάταξη που λαμβάνει και ανταποκρίνεται σε ένα σήμα ή ερέθισμα». Περιορίζοντας τον ευρύ αυτό ορισμό σε πρακτικές εφαρμογές, ο αισθητήρας αποτελεί μία διάταξη που λαμβάνει ένα ερέθισμα και ανταποκρίνεται σε αυτό με ένα ηλεκτρικό σήμα. Σκοπός ενός αισθητήρα είναι να ανταποκρίνεται σε

κάποιου είδους φυσική ποσότητα εισόδου (ερέθισμα) και να το μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα που να είναι συμβατό με ηλεκτρονικά κυκλώματα.

Κάθε αισθητήρας αποτελεί ένα μετατροπέα ενέργειας. Ανεξάρτητα από το φυσικό μέγεθος που έχει ως στόχο να ανιχνεύσει, απαιτείται μεταφορά ενέργειας από το αντικείμενο μέτρησης στον αισθητήρα, αφού κάθε μετάδοση πληροφορίας βασίζεται στη μετάδοση ενέργειας. Εδώ πρέπει να τονιστεί η διαφορά ανάμεσα στον αισθητήρα και τον μορφοτροπέα (transducer). Ο τελευταίος είναι ένας μετατροπέας οποιουδήποτε τύπου ενέργειας σε άλλη μορφή, ενώ ο πρώτος μετατρέπει οποιοδήποτε είδος ενέργειας σε ηλεκτρική ενέργεια. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί πως οι αισθητήρες αποτελούν ένα υποσύνολο των μορφοτροπέων.

Όλοι οι αισθητήρες μπορεί να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες, τους παθητικούς και τους ενεργητικούς. Ένας παθητικός αισθητήρας για να λειτουργήσει δεν απαιτεί καμία εξωτερική πηγή τροφοδοσίας ώστε να αποκριθεί σε ένα εξωτερικό ερέθισμα, καθώς η ενέργεια του ερεθίσματος εισόδου μετατρέπεται αυτόματα σε σήμα εξόδου. Παθητικοί αισθητήρες είναι, για παράδειγμα, τα θερμοζεύγη, η φωτοδίοδος και ο πιεζοηλεκτρικός αισθητήρας. Αντίθετα, οι ενεργητικοί αισθητήρες χρειάζονται εξωτερική πηγή τροφοδοσίας για τη λειτουργία τους.

Κάθε αισθητήρας καθορίζεται βάσει δύο ειδών χαρακτηριστικών του, των δυναμικών και των στατικών. Η πρώτη περίπτωση αφορά στις ιδιότητες της μεταβατικής απόκρισης του συστήματος σε ένα σήμα εισόδου, ενώ στην περίπτωση των στατικών χαρακτηριστικών λαμβάνονται υπόψιν οι ιδιότητες του συστήματος στις μεταγενέστερες χρονικά συνθήκες σταθερής κατάστασης. [8]

### **Στατικά χαρακτηριστικά**

Όταν ο αισθητήρας δεν αντιλαμβάνεται κάποια μεταβολή του μετρούμενου φυσικού μεγέθους, δηλαδή έχει επέλθει ισορροπία του συστήματος, μερικά από τα θεμελιώδη στατικά χαρακτηριστικά του είναι τα εξής:

- Η *ευαισθησία* αποτελεί δείκτη της απόκρισης του αισθητήρα σε μια δεδομένη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους. Σχετίζεται με τη συνάρτηση μεταφοράς, δηλαδή τη σχέση που συνδέει την είσοδο (διέγερση) και την έξοδο του αισθητήρα και μπορεί να είναι γραμμική, εκθετική, λογαριθμική είτε άλλης μορφής. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία ορίζεται ως η παράγωγος της συνάρτησης μεταφοράς ως προς τη διέγερση για ορισμένη τιμή της διέγερσης.

- Η *ακρίβεια* ορίζεται ως η απόκλιση της μέτρησης του αισθητήρα από την πραγματική τιμή του εξωτερικού ερεθίσματος.
- Η *πλήρης κλίμακα εισόδου* αφορά στην υψηλότερη δυνατή τιμή εισόδου, η οποία μπορεί να είναι εφαρμοστεί στον αισθητήρα χωρίς να προκαλέσει μη αποδεκτά υψηλή ανακρίβεια.
- Η *πλήρης κλίμακα εξόδου* είναι η αλγεβρική διαφορά μεταξύ των τιμών εξόδου που αντιστοιχούν στη μέγιστη και την ελάχιστη τιμή του σήματος εισόδου που εφαρμόζεται από το εξωτερικό ερέθισμα.
- Τα *σφάλματα βαθμονόμησης* υπεισέρχονται όταν η βαθμονόμηση του αισθητήρα δε γίνεται αναλυτικά, αλλά για μη επαρκή αριθμό αντιπροσωπευτικών σημείων. Πρόκειται για σφάλματα με συστηματικό χαρακτήρα, δηλαδή λειτουργούν προσθετικά σε όλες τις πιθανές πραγματικές συναρτήσεις μεταφοράς, μετατοπίζοντας την ακρίβεια κάθε τιμής σήματος εισόδου κατά μία σταθερά.
- Η *υστέρηση* ενός αισθητήρα αφορά στην απόκλιση της εξόδου του αισθητήρα για μία συγκεκριμένη τιμή του σήματος εισόδου, όταν αυτό προσεγγίζεται από αντίθετες κατευθύνσεις. Οι πιο συνηθισμένες αιτίες υστέρησης είναι η γεωμετρία σχεδιασμού των αισθητήρων, η τριβή και αλλαγές στη δομή των υλικών κατασκευής τους.
- Το *σφάλμα μη γραμμικότητας* ορίζεται για αισθητήρες με γραμμική συνάρτηση μεταφοράς. Η πιο συνήθης ευθεία είναι αυτή που προσδιορίζεται από την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων σε σχέση με τα σημεία της μέτρησης. Με αυτόν τον τρόπο, το σφάλμα μη γραμμικότητας υπολογίζεται με το ποσοστό της μέγιστης τιμής εισόδου.
- Η *επαναληψιμότητα* ενός αισθητήρα βασίζεται στην ικανότητά του να δώσει την ίδια τιμή εξόδου για απόκριση στο ίδιο ερέθισμα.
- Η *διακριτική ικανότητα* αντιπροσωπεύει τις μικρότερες τιμές προσαυξήσεων του ερεθίσματος που μπορούν να ανιχνευθούν από τον αισθητήρα.
- Ο *κορεσμός* ενός αισθητήρα αναφέρεται στην απόκρισή του εκτός των ορίων λειτουργίας του. Ακόμη και αν πρόκειται για γραμμικό αισθητήρα σε ένα εύρος τιμών εισόδου, το σήμα εξόδου του δε θα ανταποκρίνεται πλέον, ενώ περαιτέρω αύξηση του ερεθίσματος δεν θα έχει την ικανότητα για παραγωγή επιθυμητής τιμής εξόδου. Σε αυτήν την περίπτωση, θεωρείται πως ο αισθητήρας παρουσιάζει κορεσμό.

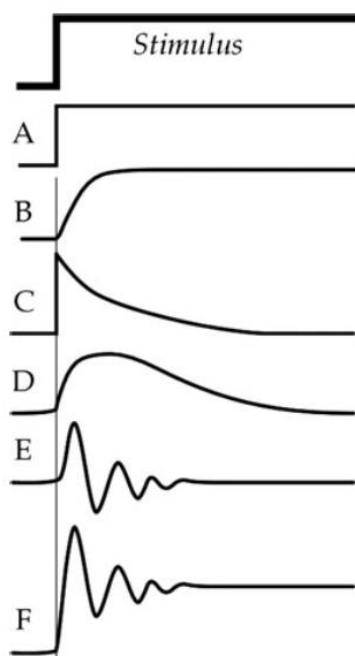
- Η *νεκρή ζώνη* αφορά σε ένα εύρος τιμών εισόδου για τις οποίες ο αισθητήρας δεν παρουσιάζει ευαισθησία, συνεπώς το σήμα εξόδου του παραμένει κοντά σε μια συγκεκριμένη τιμή (συχνά μηδέν).

Δύο ακόμη σημαντικά χαρακτηριστικά, τα οποία συναντώνται κυρίως στους βιολογικούς και χημικούς αισθητήρες που αποτελούν και τη βάση της συγκεκριμένης εργασίας, είναι τα εξής:

- Η *επιλεκτικότητα* αφορά στην ικανότητα ενός αισθητήρα να ανιχνεύει και να αποκρίνεται στο χημικό σώμα για το οποίο έχει κατασκευαστεί, ξεχωρίζοντάς έτσι την παρουσία και άλλων ουσιών κατά την ανίχνευση.
- Το *όριο ανίχνευσης* ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της ουσίας-στόχου που μπορεί να ανιχνεύσει ο αισθητήρας.
- Ο *χρόνος απόκρισης* προσδιορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή εξόδου του αισθητήρα κατά την εμφάνιση της ουσίας ανίχνευσης.

### Δυναμικά χαρακτηριστικά

Σε στατικές συνθήκες (πολύ αργά μεταβαλλόμενο σήμα εισόδου) ένας αισθητήρας μπορεί να περιγραφεί πλήρως από τη συνάρτηση μεταφοράς, τη βαθμονόμηση, την ευαισθησία κ.λπ. Ωστόσο, όταν η τιμή εισόδου μεταβάλλεται, η απόκρισή του γενικά



**Εικόνα 1.1:** Διάφορα είδη απόκρισης αισθητήρων σε ερέθισμα[8]

δεν ακολουθεί με τέλεια ακρίβεια. Ο λόγος είναι ότι τόσο ο αισθητήρας όσο και η σύζευξή του με την πηγή του ερεθίσματος δεν μπορούν πάντα να ανταποκρίνονται άμεσα. Με άλλα λόγια, ένας αισθητήρας μπορεί να χαρακτηρίζεται από μια χρονικά εξαρτώμενη χαρακτηριστική, η οποία ονομάζεται δυναμική χαρακτηριστική. Επιπλέον, εάν ένας αισθητήρας αποτελεί μέρος ενός συστήματος ελέγχου (πυκνωτές, επαγωγικά ή θερμικά στοιχεία), το οποίο έχει τα δικά του δυναμικά χαρακτηριστικά, μπορεί να προκληθεί στην καλύτερη περίπτωση μια καθυστέρηση στην αναπαράσταση της πραγματικής τιμής ενός ερεθίσματος ή στη χειρότερη περίπτωση να εμφανιστούν ψευδείς τιμές.

### 1.3 Ταξινόμηση αισθητήρων

Ένας από τους συνηθέστερους τρόπους κατηγοριοποίησης των αισθητήρων στηρίζεται στο είδος του ερεθίσματος που αυτός ανιχνεύει, δηλαδή στη μορφή ενέργειας του σήματος εισόδου. Μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες αισθητήρων είναι οι εξής [8]:

- Οι *μηχανικοί* αισθητήρες, οι οποίοι μετρούν φυσικά μεγέθη όπως η θέση, η ταχύτητα, η επιτάχυνση, η ελαστικότητα, η παραμόρφωση, η δύναμη κ.ά. Κατασκευάζονται συνήθως με μικρομηχανικές τεχνικές που επιτρέπουν τη δημιουργία μηχανικών δομών όπως οι μεμβράνες και οι αιωρούμενοι δίσκοι, η παραμόρφωση των οποίων οφείλεται σε μηχανικές τάσεις, πίεση ή άλλους παράγοντες.
- Οι *θερμικοί* αισθητήρες, οι οποίοι μετατρέπουν τη θερμική ενέργεια του ερεθίσματος σε ηλεκτρικό σήμα, και μπορούν να μετρήσουν θερμοκρασία, ειδική θερμότητα, θερμική αγωγιμότητα κ.ά. Τέτοιου τύπου αισθητήρες είναι τα θερμοζεύγη, τα θερμίστορς και οι θερμοδιακόπτες.
- Οι *ηλεκτρικοί* αισθητήρες, οι οποίοι ανιχνεύουν αλλαγές σε ηλεκτρικά μεγέθη όπως η τάση και η ένταση του ρεύματος, το φορτίο, η αγωγιμότητα κ.ά.
- Οι *οπτικοί* αισθητήρες, οι οποίοι, κάνοντας χρήση φωτοευαίσθητων υλικών, μετατρέπουν την οπτική ακτινοβολία σε ηλεκτρικό σήμα. Μετρούν μεγέθη όπως το πλάτος του ηλεκτρομαγνητικού κύματος, τη φάση, την πόλωση, το δείκτη διάθλασης κ.ά.
- Οι *μαγνητικοί* αισθητήρες, που μετρούν το μαγνητικό πεδίο (πλάτος, φάση, πόλωση), τη μαγνητική ροή και διαπερατότητα. Στηρίζονται κυρίως στο φαινόμενο Hall και τη μαγνητοαντίσταση.
- Οι *χημικοί* αισθητήρες, οι οποίοι ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα που παράγονται από διάφορες χημικές ουσίες ή χημικές αντιδράσεις. Οι αισθητήρες αυτοί προορίζονται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ουσιών (συμπεριλαμβανομένων και των δύο φάσεων της ύλης-υγρών και αέριων). Το πεδίο εφαρμογών των χημικών αισθητήρων είναι εξαιρετικά ευρύ, με εφαρμογές στην επιστήμη και την έρευνα, στη βιομηχανία, στην υγεία, τη γεωργία, κ.λπ. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογών περιλαμβάνουν τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των περιβαλλοντικών ρύπων, τον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία τροφίμων, την ανίχνευση φυτοφαρμάκων κ.ά.

- Οι *βιολογικοί* αισθητήρες, οι οποίοι αποτελούν το κεντρικό θέμα της παρούσας εργασίας, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν μία βιολογική ποσότητα σε ηλεκτρικό σήμα. Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια λόγω του ευρέος φάσματος εφαρμογών τους, όπως για παράδειγμα στην υγειονομική περίθαλψη και τη διάγνωση ασθενειών, στον ποιοτικό έλεγχο του νερού και των τροφίμων και στη χορήγηση φαρμάκων.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται συγκεντρωτικά οι κατηγορίες των αισθητήρων με βάση το είδος του ερεθίσματος που προσλαμβάνουν.

Stimulus	
Acoustic	Wave amplitude, phase, polarization Spectrum Wave velocity Other
Biological	Biomass (types, concentration, states) Other
Chemical	Components (identities, concentration, states) Other
Electric	Charge, current Potential, voltage Electric field (amplitude, phase, polarization, spectrum) Conductivity Permittivity Other
Magnetic	Magnetic field (amplitude, phase, polarization, spectrum) Magnetic flux Permeability Other
Optical	Wave amplitude, phase, polarization, spectrum Wave velocity Refractive index Emissivity, reflectivity, absorption Other
Mechanical	Position (linear, angular) Acceleration Force Stress, pressure Strain Mass, density Moment, torque Speed of flow, rate of mass transport Shape, roughness, orientation Stiffness, compliance Viscosity Crystallinity, structural integrity Other
Radiation	Type Energy Intensity Other
Thermal	Temperature Flux Specific heat Thermal conductivity Other

*Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση αισθητήρων βάσει του ερεθίσματος ανίχνευσης [8]*

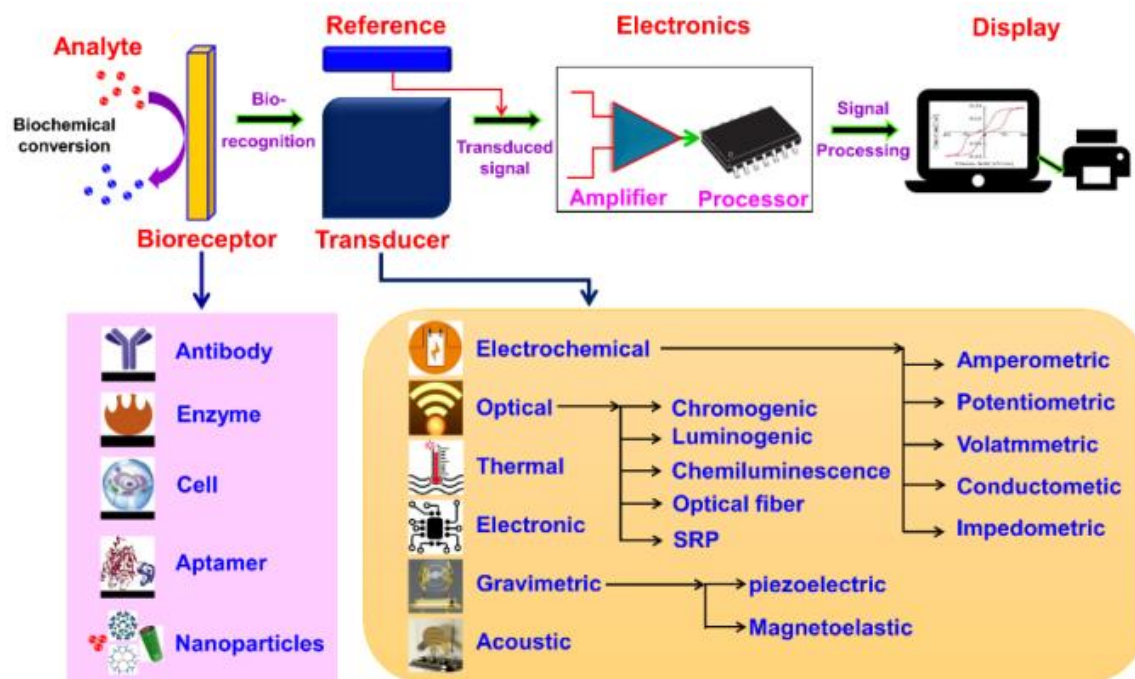
## 1.4 Βιολογικοί αισθητήρες

Ένας βιολογικός αισθητήρας ή βιοαισθητήρας αποτελεί μία διάταξη που ενσωματώνει ένα βιολογικό μόριο, όπως ένα ένζυμο ή αντίσωμα, εντός ενός ηλεκτρονικού στοιχείου για τη δημιουργία μετρήσιμου σήματος. Το ηλεκτρονικό στοιχείο ανιχνεύει, καταγράφει και μεταδίδει πληροφορίες σχετικά με μια αλλαγή στη φυσιολογία ή την παρουσία διαφόρων χημικών ή βιολογικών υλικών στο περιβάλλον. Οι βιοαισθητήρες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών ή τοξικών χημικών ουσιών, καθώς και τα επίπεδα pH.

Ένας τυπικός βιοαισθητήρας περιλαμβάνει τον αναλύτη, το βιοϋποδοχέα, το μορφοτροπέα, τα ηλεκτρονικά στοιχεία και μία μονάδα απεικόνισης των μετρήσεων, όπως μία οθόνη. Ο αναλύτης συνιστά την ουσία ενδιαφέροντος, της οποίας τα συστατικά προσδιορίζονται ή ανιχνεύονται (π.χ. γλυκόζη, αμμωνία, αλκοόλη ή λακτόζη). Ο βιοϋποδοχέας είναι ένα βιομόριο ή βιολογικό στοιχείο που μπορεί να αναγνωρίσει την ουσία-στόχο (δηλαδή τον αναλύτη). Ως βιοϋποδοχείς χρησιμοποιούνται συνήθως ένζυμα, κύτταρα, απταμερή, μόρια DNA ή RNA και αντισώματα. Η διαδικασία παραγωγής σήματος (με τη μορφή για παράδειγμα φωτός, θερμότητας, pH, αλλαγής φορτίου ή μάζας κ.λπ.) κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ βιοϋποδοχέα και αναλύτη ονομάζεται βιοαναγνώριση. Ο μορφοτροπέας μετατρέπει το συμβάν βιοαναγνώρισης σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα που σχετίζεται με την παρουσία ενός χημικού ή βιολογικού στόχου. Στη συνέχεια, το ηλεκτρικό σήμα υφίσταται επεξεργασία (ενίσχυση πλάτους και μετατροπή σε ψηφιακή μορφή) και προετοιμάζεται για το τελευταίο κομμάτι της ανίχνευσης που συνίσταται στην εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε περιβάλλον απεικόνισης, όπως μια οθόνη. Η έξοδος μπορεί να έχει τη μορφή αριθμητικής, γραφικής τιμής ή ενός πίνακα.

Η προσπάθεια για ταξινόμηση των βιοαισθητήρων αποκαλύπτει έναν πολυποίκιλο και διεπιστημονικό τομέα. Διάφορα κριτήρια εμπλέκονται στην κατηγοριοποίηση των βιολογικών αισθητήρων, με ένα βασικό σχεδιάγραμμα ταξινόμησης να παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2. Μία πρώτη ταξινόμηση στηρίζεται στο είδος του βιοϋποδοχέα, όπου γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στους ενζυμικούς βιοαισθητήρες (η πιο κοινή κατηγορία βιοαισθητήρων), στους ανοσοαισθητήρες (ιδιαίτερα χρήσιμοι στη διάγνωση), στους βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή ή τα νουκλεϊκά οξέα (διαθέτουν υψηλή επιλεκτικότητα για μικροβιακά στελέχη και νουκλεϊκά οξέα που περιέχουν κάποιον αναλύτη), και στους μικροβιακούς ή βιοαισθητήρες ολόκληρων κυττάρων.



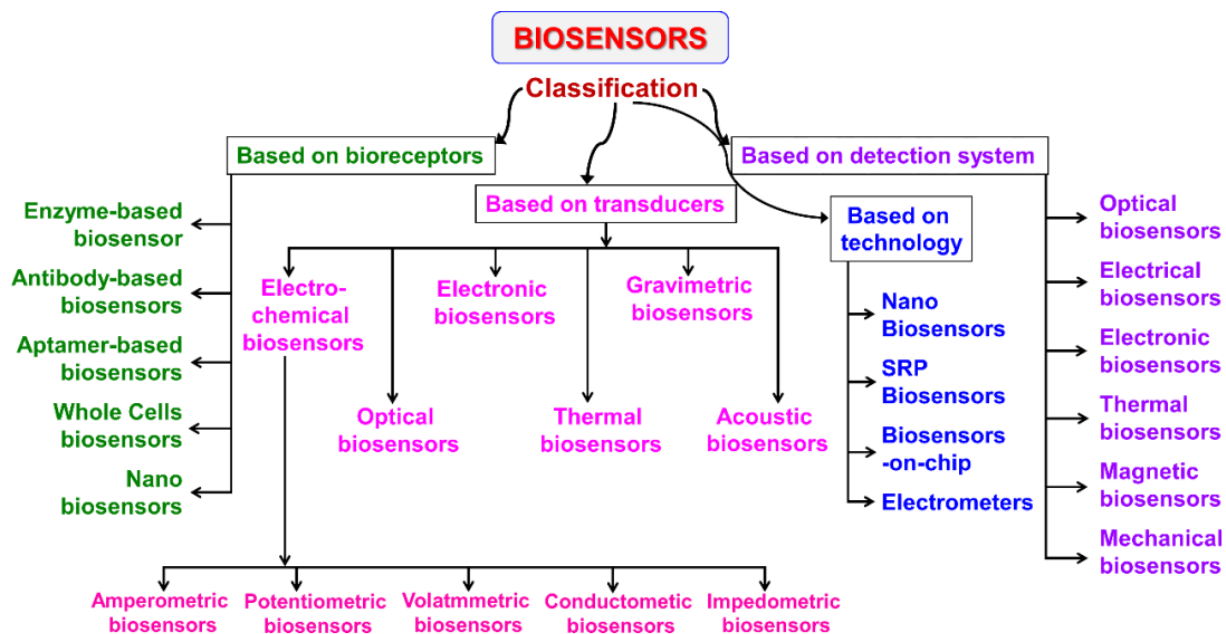


*Εικόνα 1.2: Σχηματικό διάγραμμα τυπικού βιοαισθητήρα που αποτελείται από βιοϋποδοχέα, μορφοτροπέα, ηλεκτρονικό σύστημα (ενισχυτή και επεξεργαστή) και οθόνη (H/Y ή εκτυπωτή), όπως και διάφοροι τύποι βιοϋποδοχέων και μορφοτροπέων που χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες. [9]*

Μία δεύτερη ταξινόμηση γίνεται με βάση το μορφοτροπέα της διάταξης, συνεπώς οι αισθητήρες κατηγοριοποιούνται ως ηλεκτροχημικοί (οι οποίοι ομαδοποιούνται περαιτέρω ως ποτενσιομετρικοί, αμπερομετρικοί, εμπέδησης και αγωγιμομετρικοί), ως θερμικοί ή οπτικοί κ.λπ. Επιπλέον, ανάλογα με το σύστημα ανίχνευσης, οι αισθητήρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως οπτικοί, ηλεκτρικοί, ηλεκτρονικοί, θερμικοί, μαγνητικοί και μηχανικοί.

Ακόμη, για να υπάρχει ανταπόκριση στις ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις των πολλαπλών πεδίων διεπιστημονικού ενδιαφέροντος, έχουν εισαχθεί νέες προσεγγίσεις στην τεχνολογία αισθητήρων χάρη στην πρόοδο στους τομείς της νανοτεχνολογίας και της νανοεπιστήμης και την επέκτασή τους στις επιστήμες και τη βιομηχανία. Η ικανότητα χειρισμού και ελέγχου των υλικών σε ατομικό και μοριακό επίπεδο και η επακόλουθη κατανόηση των θεμελιωδών διεργασιών στη νανοκλίμακα έχει οδηγήσει σε νέους δρόμους ανάπτυξης βιοαισθητήρων. Το πιο αξιοσημείωτο στη χρήση υλικών στη νανοκλίμακα είναι ότι η διαστατικότητα παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των χαρακτηριστικών τους, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών, χημικών, βιολογικών, ηλεκτρικών και οπτικών ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, κάνοντας χρήση διαφόρων νανοϋλικών, όπως νανοσωματιδίων (μεταλλικών και με βάση τα οξείδια), νανοσυρμάτων, νανοράβδων, νανοσωλήνων άνθρακα, κβαντικών τελειών και νανοςύνθετων (δενδριμερή), παρέχεται η δυνατότητα βελτίωσης των επιδόσεων των

βιοαισθητήρων, καθώς και αύξηση της ισχύος ανίχνευσης μέσω του ελέγχου του μεγέθους και της μορφολογίας τους. Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να γίνει μία τελευταία ταξινόμηση των βιοαισθητήρων ανάλογα με τη χρήση ή όχι νανοτεχνολογικών μεθόδων για την κατασκευή τους.



Εικόνα 1.3: Ταξινόμηση βιολογικών αισθητήρων [9]

Όπως θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια της προκείμενης εργασίας, οι αισθητήρες που κατασκευάστηκαν ανήκουν στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων, καθώς μετρήθηκαν οι αλλαγές στην αντίσταση τους υπό την παρουσία βαρέων μετάλλων. Επιπλέον, ως βιοϋποδοχείς χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες DNAzymes, ενώ στα υποστρώματα είχε προηγηθεί εναπόθεση νανοσωματιδίων πριν τις διαδικασίες ακινητοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων. [9]

#### 1.4.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένοι βιολογικοί αισθητήρες, των οποίων οι αρχές λειτουργίας βασίζονται στις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του μορίου-στόχου (αναλύτη) και του μορφοτροπέα. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ικανότητα ανίχνευσης. Ο μηχανισμός λειτουργίας τους βασίζεται σε μια ηλεκτροχημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του μορφοτροπέα μεταξύ του βιοϋποδοχέα και του αναλύτη, με αποτέλεσμα την παραγωγή ανιχνεύσιμων ηλεκτροχημικών σημάτων σε όρους τάσης, ρεύματος, εμπέδησης και χωρητικότητας.

Βάσει του σήματος εξόδου, μπορεί να γίνει η εξής κατηγοριοποίηση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων [9]:

- i. στους *ποτενσιομετρικούς αισθητήρες*, η λειτουργία των οποίων στηρίζεται στη συσσώρευση φορτίου λόγω της αλληλεπίδρασης του αναλύτη και του βιοϋποδοχέα στη διεπαφή του ηλεκτροδίου σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς υπό μηδενικό ρεύμα. Για να μετατραπεί μια βιοχημική αντίδραση σε δυναμικό, λαμβάνει χώρα μία αντίδραση οξειδοαναγωγής, κατά την οποία το δυναμικό αξιοποιείται για την ποσοτικοποίηση των ειδών που συμμετείχαν στην αντίδραση.
- ii. στους *αμπερομετρικούς* αισθητήρες που λειτουργούν με συστοιχίες δύο ή τριών ηλεκτροδίων. Οι αισθητήρες αυτοί μετρούν το ρεύμα που παράγεται λόγω οξειδοαναγωγής των ηλεκτροδραστικών ειδών στο εν λειτουργία ηλεκτρόδιο όταν εφαρμόζεται σε αυτό σταθερό δυναμικό σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Το ρεύμα που παράγεται είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη που υπάρχει στο διάλυμα. Σε σύγκριση με τους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες, η μέθοδος αυτή επιτρέπει πιο ευαίσθητες, γρήγορες και ακριβείς μετρήσεις με γραμμική απόκριση, γεγονός που τους καθιστά πιο κατάλληλους για μαζική παραγωγή. Ωστόσο, η κακή επιλεκτικότητα και οι παρεμβολές στο σήμα από άλλες ηλεκτροδραστικές ουσίες παρουσιάζουν μειονεκτήματα.
- iii. στους *αγωγιμομετρικούς* βιοαισθητήρες που ποσοτικοποιούν τη μεταβολή της αγωγιμότητας μεταξύ του ζεύγους ηλεκτροδίων λόγω μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης (μεταβολή των ιδιοτήτων αγωγιμότητας του αναλύτη).
- iv. στους αισθητήρες *εμπέδησης* που μετρούν την εμπέδηση που δημιουργείται στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη όταν εφαρμόζεται ημιτονοειδές σήμα. Περιλαμβάνει την εφαρμογή τάσης εναλλασσόμενου ρεύματος χαμηλού πλάτους στο ηλεκτρόδιο και στη συνέχεια τη μέτρηση της απόκρισης του ρεύματος ως συνάρτηση του συχνότητας.
- v. στους βιοαισθητήρες *βολτομετρίας*, οι οποίοι ανιχνεύουν τον αναλύτη μετρώντας την τιμή του ρεύματος κατά την ελεγχόμενη μεταβολή του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Πλεονεκτήματα των συγκεκριμένων αισθητήρων περιλαμβάνουν την εξαιρετική ευαισθησία και την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών.

## 1.5 Νανοσωματίδια

Τα νανοϋλικά αποτελούν υλικά που δομούνται από συστατικά μικρότερα του ενός μικρομέτρου σε τουλάχιστον μία διάσταση. Κατά την μετάβαση από ένα μακροσκοπικό (bulk) υλικό στην νανοκλίμακα, πολλές από τις κρίσιμες παραμέτρους που καθορίζουν τις ιδιότητες του υλικού μεταβάλλονται. Αυτή η μεταβολή των μακροσκοπικών ιδιοτήτων του υλικού είναι που έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον γύρω από τα νανοδομημένα υλικά.

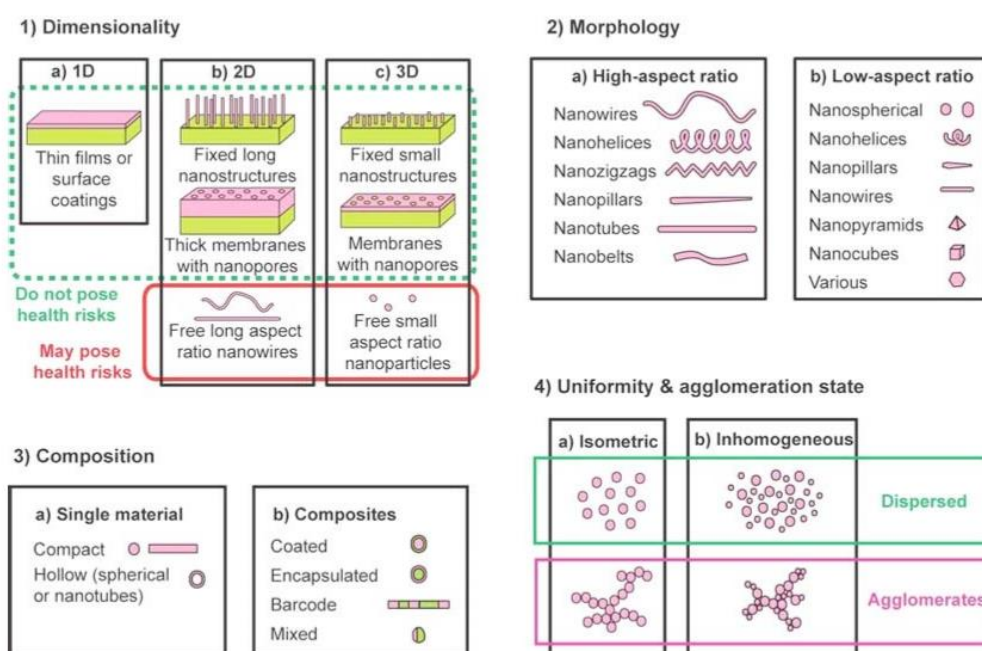
Τα νανοσωματίδια είναι η απλούστερη δομή στη νανοκλίμακα, καθώς αποτελούν σωματίδια με τουλάχιστον μία διάσταση μικρότερη του ενός μικρομέτρου και δυνητικά ως μικρότερα από ατομικές και μοριακές κλίμακες μήκους (~0,2 nm). Τα νανοσωματίδια μπορεί να έχουν άμορφη ή κρυσταλλική μορφή και οι επιφάνειές τους μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς υγρών σταγονιδίων ή αερίων. Σε κάποιο βαθμό, η νανοσωματιδιακή ύλη θα πρέπει να θεωρείται μια ξεχωριστή κατάσταση ύλης, εκτός από τα στερεά, υγρά, αέρια και του πλάσματος, λόγω των ξεχωριστών ιδιοτήτων της (μεγάλη επιφάνεια και κβαντικής φύσεως φαινόμενα). Παραδείγματα υλικών σε κρυσταλλική μορφή νανοσωματιδίων είναι τα φουλερένια και οι νανοσωλήνες άνθρακα, ενώ τυπικές κρυσταλλικές στερεές μορφές είναι ο γραφίτης και το διαμάντι. Πολλοί συγγραφείς περιορίζουν το μέγεθος των νανοϋλικών σε 50 nm ή 100 nm, με την επιλογή αυτού του ανώτατου ορίου να δικαιολογείται από το γεγονός ότι ορισμένες φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων πλησιάζουν εκείνες των μακροσκοπικών υλικών όταν το μέγεθός τους φτάσει σε αυτές τις τιμές. Ωστόσο, αυτό το όριο μεγέθους ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του υλικού και δεν μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μία τέτοια ταξινόμηση. Ένας θεμιτός ορισμός επεκτείνει αυτό το ανώτατο όριο μεγέθους στο 1 μm.

Οι δύο θεμελιώδεις παράγοντες που προκαλούν στα νανοϋλικά διαφοροποίηση στη συμπεριφορά από τα συμβατικά υλικά σχετίζονται με επιφανειακά και κβαντικά φαινόμενα. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν τόσο τη χημική δραστηριότητα των υλικών, όσο και τις μηχανικές, οπτικές, ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητές τους.[5] Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα που καταδεικνύει τις αλλαγές κατά τη μετάβαση από το μακροσκοπικό υλικό στη νανοκλίμακα είναι ο χρυσός. Ο χρυσός είναι γνωστός ως ένα λαμπερό, ευγενές, μη μαγνητικό μέταλλο που λιώνει στους 1336 βαθμούς Kelvin. Ωστόσο, σωματίδια του ίδιου στοιχείου, διαμέτρου 10 nm, απορροφούν το πράσινο φως και έτσι εμφανίζονται κόκκινα, ενώ η θερμοκρασία τήξης μειώνεται δραματικά όσο ελαττώνεται το μέγεθος. Επιπλέον, ο χρυσός παύει να είναι ευγενής και

τα νανοσωματίδια των 2-3 nm είναι εξαιρετικοί καταλύτες που παρουσιάζουν επίσης μαγνητικές ιδιότητες. Σε αυτό το μέγεθος εξακολουθούν να είναι μεταλλικά, αλλά σε μικρότερη κλίμακα αποκτούν μονωτική συμπεριφορά. [10]

Τα νανοσωματίδια μπορούν να ταξινομηθούν βάσει των εξής χαρακτηριστικών τους [11]:

- i. Διάσταση, δηλαδή πόσες από τις τρεις τους διαστάσεις βρίσκονται στη νανοκλίμακα. Συνεπώς, γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στα 1D νανοσωματίδια με μία διάσταση στα νανόμετρα (λεπτά υμένια), τα 2D και 3D με δύο και τρεις, αντίστοιχα, διαστάσεις στη νανοκλίμακα.
- ii. Μορφολογία, η οποία σχετίζεται με την επιπεδότητα, τη σφαιρικότητα και το λόγο των διαστάσεών τους (aspect ratio).
- iii. Σύσταση του υλικού, η οποία εξαρτάται από το αν αποτελείται αποκλειστικά από ένα στοιχείο ή αν είναι συνδυασμός υλικών, δηλαδή νανοςύνθετο υλικό.
- iv. Ομοιομορφία και συσσωματώσεις, που βασίζονται στη χημικές και στις ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.



**Εικόνα 1.4:** Ταξινόμηση των νανοδομημένων υλικών βάσει (1) των διαστάσεων στη νανοκλίμακα, (2) της μορφολογίας, (3) της σύστασης και (4) της ομοιομορφίας και των συσσωματώσεων. [11]

Οι εξελίξεις στα όργανα χαρακτηρισμού, ιδίως στη μικροσκοπία, έχουν επιτρέψει στους επιστήμονες να παρατηρούν υλικά και φαινόμενα με ανάλυση επιπέδου angstrom, οδηγώντας σε πολύ βαθύτερη κατανόηση των νανοδομημένων υλικών με ποικίλες τεχνικές και οργανολογίες. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να παραχθεί η

καλύτερη δυνατή εικόνα παρατήρησης κα χαρακτηρισμού για την κατανομή των νανοσωματιδίων στο χώρο που εναποτέθηκαν. Οι δύο τύποι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, για παράδειγμα, η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM), χρησιμοποιούν δέσμη ηλεκτρονίων αντί για φως για την ανάλυση εικόνων, γεγονός που οδηγεί σε όρια ανάλυσης στη νανοκλίμακα, αλλά παράλληλα και στην απόκτηση τοπογραφικών πληροφοριών. Ενώ οι εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, το σχήμα, τη σύνθεση κ.λπ., θα πρέπει να επιβεβαιώνονται από μία πιο μακροσκοπική τεχνική όπως η περίθλαση ακτίνων-X (XRD), ώστε να υπάρχουν αντιπροσωπευτικές εικόνες ολόκληρου του δείγματος κι όχι μόνο μίας μικρής περιοχής του. Εκτός από τις τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, οι εξελίξεις στις τεχνικές σάρωσης έχουν επίσης επιτρέψει την οπτικοποίηση και ακόμη και τη δυνατότητα χειρισμού της ύλης σε ένα νέο επίπεδο. Μερικές χαρακτηριστικές τεχνικές αυτού του τύπου είναι η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και η μικροσκοπία σάρωσης σήραγγας (STM). [12] Τέλος, η σκέδαση του φωτός είναι μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων, με χαρακτηριστικές τεχνικές τη δυναμική και τη στατική σκέδαση του φωτός (DLS και SLS αντίστοιχα). [14] Ακολουθεί πίνακας αντιστοίχισης της κατάλληλης οργανολογίας για το χαρακτηρισμό διαφόρων φυσικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων.

	Instruments and methods <sup>a</sup>
<i>Physical properties/metrics</i>	
Diameter	EM, AFM, Flow-FFF, DLS,
Volume	Sed-FFF
Area	EM, AFM
Mass	LC-ESMS
Surface charge	z-Potential, electrophoretic mobility
Crystal structure	XRD, TEM-XRD (SAED)
Aspect ratio or other shape factor	
<i>Chemical composition/analytes</i>	
Elemental composition	Bulk: ICP-MS, ICP-OES, single nanoparticle: TEM-EDX, particle population: FFF-ICP-MS
Fluorophores	Fluorescence spectroscopy
Fullerene ("molecules")	UV-vis, IR, NMR, MS, HPLC
Total organic carbon	High temp chemical oxidation
<i>Other properties not falling within the above classes</i>	
Aggregation state	DLS, AFM, ESEM, etc.
Hydrophobicity	Liquid-liquid extraction chromatography
Dissolution rate	Dialysis or voltammetry or spectrometry
Surface chemistry, coating composition, # of proton exchanging surface sites	Optical or X-ray spectroscopic methods, acid-base titrations

**Πίνακας 1.2:** Λίστα φυσικών ιδιοτήτων και χημικών συνθέσεων των αναλυτών σε αντιστοιχία με τις κατάλληλες μεθόδους χαρακτηρισμού τους. [13]

## 1.6 Μηχανισμοί αγωγιμότητας νανοσωματιδίων

Μία από τις βασικότερες προκλήσεις που σχετίζονται με τη μελέτη των μηχανισμών αγωγιμότητας σε νανοσωματαδιακές δομές είναι ότι περιλαμβάνει έννοιες από διάφορους επιστημονικούς κλάδους, όπως τη χημεία, την επιστήμη των υλικών, τη μηχανική (ιδίως την ηλεκτρονική), τη φυσική και τη φυσικοχημεία. Εξετάζοντας τις ηλεκτρονικές ιδιότητες των φιλμ νανοσωματιδίων, μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των εξής τριών περιπτώσεων:

- i. τη *μονωτική κατάσταση*, στην οποία το φιλμ αποτελείται από μεμονωμένα και ηλεκτρικά απομονωμένα από τα γειτονικά τους κέντρα νανοσωματίδια,
- ii. την *quasi μακροσκοπική κατάσταση*, όπου η επιφανειακή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων είναι αρκετά μεγάλη ώστε οι νησίδες συσσωματωμένων νανοσωματιδίων να συγχωνεύονται και να σχηματίζουν αρκετούς αγωγίμους δρόμους διαμέσου του φιλμ,
- iii. μια *ενδιάμεση κατάσταση μετάβασης*, η οποία κινείται προσεγγιστικά στο όριο μεταξύ της μετάβασης από τη μονωτική στη μακροσκοπική κατάσταση. Αξίζει να σημειωθεί πως το όριο πάνω από το οποίο σημειώνεται η μετάβαση στην μακροσκοπική κατάσταση αγωγιμότητας συμβαίνει τη στιγμή που τουλάχιστον ένα συνεχές αγωγίμο μονοπάτι έχει διαμορφωθεί διαμέσου του φιλμ (percolation threshold).

Παρά τη διάκριση μεταξύ των τριών αυτών καταστάσεων αγωγιμότητας, οι μηχανισμοί μεταφοράς φορτίου αποτελούν ένα πολυσύνθετο αντικείμενο, το οποίο δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, ενώ οι προσπάθειες ανάπτυξης ενός ολοκληρωμένου μοντέλου περιγραφής βρίσκονται σε εξέλιξη. Ωστόσο, έχει εξακριβωθεί πως ορισμένα φυσικά φαινόμενα παίζουν σημαντικό ρόλο στις παραπάνω διαδικασίες ανάλογα βέβαια και με τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδιακών δομών. Αυτά περιλαμβάνουν το φαινόμενο σήραγγας (tunneling), φαινόμενα φόρτισης ηλεκτρονίου (single electron charging), αλμάτων φορτίου (electron hopping), φαινόμενα χωρικής διαταραχής και διαταραχής φορτίου, φαινόμενα percolation, σκέδασης ηλεκτρονίων κ.ά. [14] Στη συνέχεια, θα αναλυθούν εκτενώς το φαινόμενο σήραγγας και τα φαινόμενα φόρτισης ηλεκτρονίου που φαίνεται ότι κυριαρχούν στις διατάξεις της παρούσας εργασίας.

### 1.6.1 Φαινόμενο σήραγγας (tunneling)

Τα φαινόμενα σήραγγας επιτρέπουν την ροή φορτίου μεταξύ ασθενώς συζευγμένων νησίδων νανοσωματιδίων. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό

αγωγιμότητας των νανοσωματιδίων. Για να εξάγουμε ένα μοντέλο περιγραφής της αγωγιμότητας, θεωρούμε ένα σύστημα αποτελούμενο από δύο 1D αγώγιμα, μεταλλικά ηλεκτρόδια που χωρίζονται από έναν μονωτή διηλεκτρικής σταθεράς  $\epsilon_r$  και ορισμένου ενεργειακού ύψους. Για τη μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από το ένα ηλεκτρόδιο στο άλλο, θα πρέπει να φύγει από μία ενεργειακή κατάσταση του πρώτου μετάλλου και να μεταβεί σε μία κενή ενεργειακή κατάσταση του δεύτερου σύμφωνα με την αρχή του Pauli. Το ρεύμα λόγω φαινομένου σήραγγας υπολογίζεται από τη σχέση [14]:

$$I = \frac{4\pi e}{\hbar} \int_0^{+\infty} \rho(E)\rho(E + eV_b)|T(E)|^2[f(E) - f(E + eV_b)]dE \quad (1.1)$$

όπου  $e$  το φορτίο του ηλεκτρονίου,  $\rho(E)$  η πυκνότητα των ενεργειακών καταστάσεων,  $V_b$  η εφαρμοζόμενη τάση,  $T(E)$  ο συντελεστής διέλευσης και  $f(E)$  η πιθανότητα εύρεσης μίας κατειλημμένης ενεργειακής κατάστασης στο μέταλλο σύμφωνα με την κατανομή Fermi-Dirac.

Για χαμηλές τιμές πόλωσης ( $eV_b \ll E_F$ ) και σε θερμοκρασία δωματίου, τα ενεργειακά επίπεδα κοντά στην ενέργεια Fermi κυριαρχούν στα φαινόμενα σήραγγας. Συνεπώς, η σχέση (1.1) μπορεί να απλοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη την πυκνότητα καταστάσεων και το συντελεστή διέλευσης με τις αντίστοιχες τιμές τους για την ενέργεια Fermi:

$$I = \frac{\sigma_0}{e} \int_0^{+\infty} [f(E)f(E + eV_b)]dE \quad (1.2)$$

όπου  $\sigma_0$  ορίζεται ως:

$$\sigma_0 = \frac{4\pi e^2}{\hbar} \rho(E)^2 |T(E_F)|^2 \quad (1.3)$$

Λύνοντας αναλυτικά το ολοκλήρωμα στη σχέση (1.2) προκύπτει η λύση  $eV_b$  και κατά συνέπεια το ρεύμα σήραγγας γίνεται:

$$I = \sigma_0 V_b \quad (1.4)$$

Η εξίσωση (1.4) αποδεικνύει πως  $\sigma_0$  είναι η αγωγιμότητα σήραγγας για χαμηλές τιμές πόλωσης, καθώς:

$$\sigma_0 = dI/dV_b \quad (1.5)$$

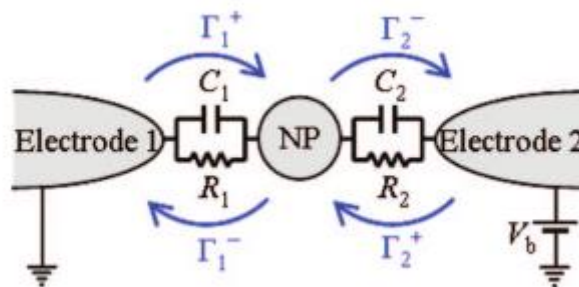
Αφού η αγωγιμότητα εξαρτάται από το  $|T(E_F)|^2 \simeq \exp(-2kL)$ , είναι προφανές ότι φθίνει εκθετικά με την αύξηση της απόστασης των ηλεκτροδίων και είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία.



### 1.6.2 Επίδραση φαινομένων φόρτισης

Δεδομένου των μικρών μεγεθών των νανοσωματιδίων, τα φαινόμενα φόρτισης ηλεκτρονίου μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τις ηλεκτρονικές ιδιότητές τους. Όταν ένα ηλεκτρόνιο μεταβαίνει μέσω του φαινομένου σήραγγας σε ένα νανοσωματίδιο, αυτό αποκτά φορτίο. Στο απόλυτο μηδέν, η ενέργεια που απαιτείται για να γίνει αυτή η μετάβαση παρέχεται από αρκετά μεγάλη εξωτερική πόλωση, αλλιώς δεν μπορεί να υπάρξει ροή του ρεύματος. Δηλαδή, κάτω από ένα κατώφλι τάσης, το ρεύμα και η αγωγιμότητα είναι μηδενικά. Αυτό είναι γνωστό ως «φραγή Coulomb» (Coulomb Blockade). Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, τα ηλεκτρόνια είναι σε θέση να ξεπεράσουν τη φραγή Coulomb θερμικά, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρεύματος και της αγωγιμότητας. [15]

Μπορούμε να αποκτήσουμε βαθύτερη κατανόηση του ρόλου των φαινομένων φόρτισης θεωρώντας ένα απλό σύστημα όπου ένα μεταλλικό νανοσωματίδιο είναι συζευγμένο με δύο μεταλλικά ηλεκτρόδια μέσω ζεύξης σήραγγας (Εικόνα 1.5). Βάσει αυτού του μοντέλου, κάθε ζεύξη μπορεί προσομοιαστεί με μία παράλληλη σύνδεση ενός πυκνωτή με μία αντίσταση.



*Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση ισοδύναμου κυκλώματος ζεύξης σήραγγας. [14]*

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει συσχέτιση της μεταφοράς φορτίου με το ελάχιστο ποσό ενέργειας που απαιτείται για την μεταφορά φορτίου μεταξύ σωματιδίων (ενέργεια ενεργοποίησης). Συγκεκριμένα, όσο ελαττώνεται η διάμετρος των νανοσωματιδίων απαιτούνται όλο και μεγαλύτερα ποσά ενέργειας προκειμένου να γίνει η μεταφορά. Για να βρεθεί η ενέργεια φόρτισης ενός νανοσωματιδίου, μπορεί προσεγγιστικά το νανοσωματίδιο (ακτίνας  $R$ ) να θεωρηθεί απομονωμένο, με μία μέση απόσταση  $s$ , από ένα αγωγίμο περιβάλλον νανοσωματιδίων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6. Ανάμεσα στο νανοσωματίδιο και στο αγωγίμο περιβάλλον μπορεί γενικά να υποθεθεί διηλεκτρικό με διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon_r$ . Σε αυτήν την προσέγγιση η χωρητικότητα του νανοσωματιδίου μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση [14]:

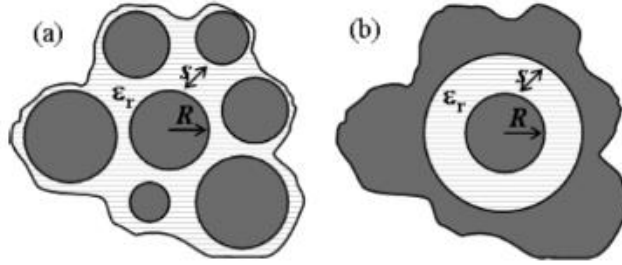
$$C = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r\left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R+s}\right)^{-1} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r\frac{R(R+s)}{s} \quad (1.6)$$

Συνεπώς, η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$E_C = \frac{e^2}{8\pi\epsilon_0\epsilon_r}\left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R+s}\right) = \frac{e^2}{8\pi\epsilon_0\epsilon_r}\frac{s}{R(R+s)} \quad (1.7)$$

Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται και η παρατήρηση πως, καθώς η ακτίνα των νανοσωματιδίων μειώνεται, απαιτείται μεγαλύτερη ενέργεια ενεργοποίησης:

$$\frac{\Delta E_C}{E_C} = -\Delta R\left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R+s}\right) \simeq -2\frac{\Delta R}{R} \quad (R \gg s) \quad (1.8)$$



**Εικόνα 1.6:** (a) Αγωγίμο νανοσωματίδιο ακτίνας  $R$  διαχωρισμένο από αγωγίμο περιβάλλον με διηλεκτρικό μέσο σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς  $\epsilon_r$  και με μία μέση απόσταση  $s$ . (b) Μοντελοποίηση του νανοσωματιδίου της (a). [14]

Η αγωγιμότητα για μηδενικές τιμές πόλωσης, εντός της φραγής Coulomb, προκύπτει από ηλεκτρόνια με τιμές ενέργειας υψηλότερες από  $E_C + E_F$ . Ο αριθμός αυτών των ηλεκτρονίων μπορεί να υπολογιστεί από την κατανομή Fermi-Dirac:

$$\int_{E_C+E_F}^{\infty} f(E)dE = \int_{E_C+E_F}^{\infty} \frac{dE}{1+\exp\left[\frac{E-E_F}{k_B T}\right]} \sim \int_{E_C+E_F}^{\infty} e^{-\frac{(E-E_F)}{k_B T}} dE = k_B T e^{-\frac{E_C}{k_B T}} \simeq e^{-\frac{E_C}{k_B T}} \quad (1.9)$$

Στη σχέση (1.9) η κατανομή Fermi-Dirac προσεγγίζεται από την κατανομή Boltzmann, ενώ η συνεισφορά του συντελεστή  $k_B T$  είναι αμελητέα σε σχέση με αυτήν του εκθετικού όρου.

Συνδυάζοντας κανείς τις σχέσεις (1.5) και (1.9) και θεωρώντας πως στη γενική περίπτωση ένα φιλμ νανοσωματιδίων έχει τυχαία κατανομή των νανοσωματιδίων και καμία συμμετρία, μπορεί να οδηγηθεί στο συμπέρασμα πως η αγωγιμότητα του φιλμ προκύπτει από το συνδυασμό των δύο αγωγιμοτήτων που οφείλονται στα φαινόμενα φόρτισης και σήραγγας. Έτσι, καταλήγει κανείς σε ένα γενικευμένο μοντέλο θερμικά ενεργοποιούμενου φαινομένου σήραγγας τύπου Arrhenius:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-2kL} \cdot e^{-\frac{E_c}{k_B T}} \quad (1.10)$$

Οι μηχανισμοί που αναλύθηκαν αποτελούν τους κυρίαρχους μηχανισμούς αγωγιμότητας στις διατάξεις που κατασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί πως δεν είναι καθόλου σπάνιο δύο ή περισσότεροι διαφορετικοί μηχανισμοί αγωγιμότητας, όπως αυτοί που αναλύθηκαν ήδη (θερμικά ενεργοποιούμενο φαινόμενο σήραγγας) ή άλλα φαινόμενα να εμφανίζονται συνδυαστικά σε διαφορετικά θερμοκρασιακά εύρη για την ίδια διάταξη.

### 1.7 Μηχανισμοί αγωγιμότητας στο DNA

Οι αλυσίδες του DNA έχουν μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες ως προς τις ηλεκτρικές τους ιδιότητες τους αναφορικά με τη μεταφορά φορτίου. Το ερευνητικό ενδιαφέρον, το οποίο μοιράζονται φυσικοί, χημικοί και βιολόγοι, αφορά στις δυνατότητες της μεταφοράς φορτίου μέσω μορίων DNA για παροχή πιο ευαίσθητου σήματος και με εφαρμογές είτε στην κατασκευή βιολογικών νανοαισθητήρων είτε ως ενζυμικό εργαλείο για την ανίχνευση βλαβών στο γονιδίωμα. Η μεταφορά φορτίου εξαρτάται από τη σύνδεση, τη δομή και τη δυναμική της σύνθεσης του DNA. [15]

Το κυρίαρχο μοντέλο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του DNA βασίζεται στην επικάλυψη μεταξύ τροχιακών  $\pi$  σε γειτονικά ζεύγη βάσεων. [16] Οι μηχανισμοί αγωγιμότητας ποικίλλουν και σχετίζονται με την απόσταση, δηλαδή με τη στοίβαξη των βάσεων (base stacking). Στην περίπτωση τόσο του δίκλωνου, όσο και του μονόκλωνου DNA, το φαινόμενο σήραγγας και ο μηχανισμός της υπερανταλλαγής άγουν το φορτίο σε μικρές αποστάσεις, ενώ ο μηχανισμός με θερμικά ενεργοποιούμενα άλματα σε μεγαλύτερες. [17] Η διαφορά στην αγωγιμότητα μεταξύ μονόκλωνων και δίκλωνων μορίων έγκειται στο γεγονός πως είναι τάξεις μεγέθους χαμηλότερη για την πρώτη περίπτωση. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις πως συγκεκριμένα ζεύγη βάσεων στο μόριο του DNA διευκολύνουν τη μεταφορά φορτίου, ενώ άλλα ζεύγη αζωτούχων βάσεων δρουν ως ηλεκτρικοί φραγμοί. [18] Γενικώς, οι μηχανισμοί μεταφοράς φορτίου στο DNA αποτελούν ένα πολυσύνθετο, ανοιχτό ερευνητικό ερώτημα με κυρίαρχη θεώρηση μέχρι σήμερα πως η αγωγιμότητα του δίκλωνου DNA σε υδατικά περιβάλλοντα βασίζεται τόσο στη στοίβαξη βάσεων τροχιακών  $\pi$  όσο και στη μεταφορά φορτίου μέσω του φωσφοδιεστερικού σακχάρου στην εξωτερική ραχοκοκαλιά του DNA, συμπεριλαμβανομένων δεσμευμένων μορίων νερού. [19]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: Βιολογικοί αισθητήρες για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων-Μεθοδολογία κατασκευής

### 2.1 Ιοντοβολή (Sputtering)

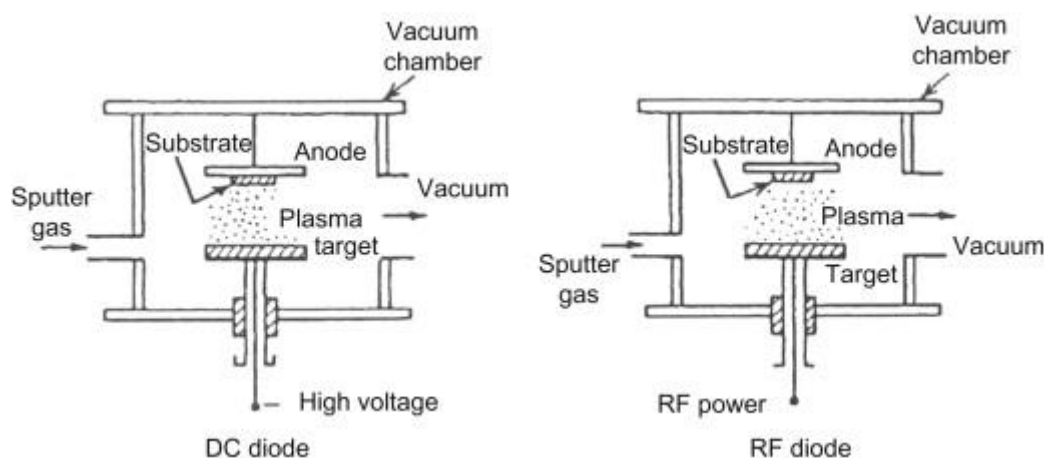
Η ιοντοβολή (sputtering) αποτελεί μία τεχνική εναπόθεσης λεπτών υμενίων (thin films) και ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία άτομα ή μόρια ενός υλικού εκτοξεύονται από ένα στερεό λόγω του βομβαρδισμού του με σωματίδια υψηλής ενέργειας. Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την οπισθοσκέδαση των ατόμων της επιφάνειας του στερεού εξαιτίας των κρούσεων με τα προσπίπτοντα ιόντα. Ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων φυσικής εναπόθεσης ατμού (Physical Vapor Deposition), καθώς η πηγή του υλικού που πρόκειται να εναποτεθεί προέρχεται από τους ατμούς ενός στερεού. [20][21]

Για να λειτουργήσει η ιοντοβολή ως αξιόπιστη διαδικασία εναπόθεσης πρέπει να πληρούνται ορισμένα κριτήρια. Αρχικά, τα ιόντα επαρκούς ενέργειας πρέπει να δημιουργηθούν και να κατευθυνθούν προς έναν στόχο ώστε να εκτοξευτούν άτομα από την επιφάνειά του. Κατά δεύτερον, τα άτομα που εκτοξεύονται πρέπει να μπορούν να κινούνται ελεύθερα προς το υπόστρωμα που πρόκειται να επικαλυφθεί, έχοντας μικρή παρεμπόδιση στην κίνησή τους. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η εναπόθεση με sputtering οφείλει να γίνεται υπό συνθήκες κενού. Οι χαμηλές πιέσεις είναι απαραίτητες τόσο για τη διατήρηση των υψηλών ενεργειών των ιόντων, αλλά και για να αποφευχθούν πολλές συγκρούσεις ατόμων-αερίου μετά την εκτίναξη από το στόχο. Σημείο-κλειδί εδώ αποτελεί η έννοια της μέσης ελεύθερης διαδρομής (Mean Free Path), δηλαδή η μέση απόσταση που μπορούν να διανύσουν τα άτομα χωρίς να συγκρουστούν με άλλο άτομο αερίου. [22]

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για την εναπόθεση λεπτών υμενίων μέσω ιοντοβολής περιλαμβάνει την καθοδική ιοντοβολή με χρήση μαγνήτρου (magnetron sputtering). Μέσω αυτής της τεχνικής, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού μεταξύ του υποστρώματος που πρόκειται να επικαλυφθεί με το υλικό (άνοδος) και του στόχου (κάθοδος) που περιέχει το υλικό. Έχοντας διοχετεύσει κάποιο αδρανές αέριο στην ενδιάμεση περιοχή ανόδου-καθόδου (συνήθως αργό ως ευγενές αέριο), ξεσπά ηλεκτρική εκκένωση, η οποία ενισχύεται με χρήση μαγνήτρου κι έτσι δημιουργείται πλάσμα. Ως πλάσμα ορίζεται το μερικώς ιονισμένο αέριο, δηλαδή εκείνο που αποτελείται από ουδέτερα φορτία, ηλεκτρόνια και ιόντα. Καθώς ο στόχος βομβαρδίζεται με ιόντα, λαμβάνουν χώρα μια σειρά από διαδικασίες: (i) Απελευθέρωση ουδέτερων ατόμων, (ii)

Ουδετεροποίηση και οπισθοσκέδαση των προσπιπτόντων ιόντων (backscattered particles), (iii) Εκπομπή ακτίνων X (X – ray emission) (iv) Παραγωγή – γένεση φωτονίων (photon generation), (v) Εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων (secondary electron emission) και (vi) Διασκορπισμός των ατόμων του αερίου που βρίσκονται στην επιφάνεια του στόχου (gas desorption). [23]

Η ιοντοβολή αποτελεί, επομένως, μία ευρέως διαδεδομένη διαδικασία εναπόθεσης λεπτών υμενίων, διότι συνιστά μία απλή διαδικασία που δεν προαπαιτεί την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, συνεπώς είναι ιδανική για εναπόθεση κεραμικών και πυρίμαχων υλικών που έχουν υψηλό σημείο τήξης. Για την τροφοδοσία του στόχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνεχές ρεύμα (DC) για αγώγιμους στόχους, ραδιοσυχνότητα (RF) για μη αγώγιμους στόχους και μια ποικιλία άλλων μεθόδων εφαρμογής παλμών ρεύματος ή/και τάσης.



**Εικόνα 2.1:** Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ιοντοβολής με τροφοδοσία συνεχούς ρεύματος DC (αριστερά) και ραδιοσυχνότητας RF (δεξιά). [21]

## 2.2 RF Sputtering

Λόγω των πολλαπλών ελαστικών σκεδάσεων των ιόντων του στόχου, παράγονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, παράλληλα με την εκπομπή ακτίνων X και φωτονίων, λόγω διέγερσης και αποδιέγερσης των ιόντων, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Για να αποφευχθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα για μη αγώγιμους στόχους, ο στόχος πολώνεται με τη χρήση εναλλασσόμενης τάσης και ραδιοσυχνότητας (εξού και ο όρος RF-Radio Frequency) προκειμένου να αποφευχθεί το προαναφερθέν πρόβλημα. Επειδή τα ιόντα αντιδρούν στο εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο πιο αργά από ότι τα ηλεκτρόνια κατά τη διάρκεια μιας περιόδου συχνότητας, τα ιόντα βομβαρδίζουν συνεχώς την επιφάνεια του στόχου. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ηλεκτρόνια ακολουθούν τις εναλλαγές του ηλεκτρικού πεδίου, ενώ τα ιόντα όχι. Στην περίπτωση αυτή, η

σύγκρουση των ηλεκτρονίων κατά το δεύτερο μισό της περιόδου εναλλασσόμενης τάσης εξισορροπεί τη συσσώρευση θετικού φορτίου στην επιφάνεια του στόχου. Ως αποτέλεσμα, τα θετικά ιόντα μπορούν να προσκρούσουν ανεμπόδιστα στην επιφάνεια του μονωτή και το πλάσμα μπορεί να παραμείνει σταθερό στο εσωτερικό του θαλάμου.

Το ηλεκτρόδιο του στόχου και η άνοδος -λόγω της ταλάντωσης του φορτίου των ηλεκτρονίων- αναπτύσσουν ένα συνεχές δυναμικό, πιο αρνητικό από αυτό του πλάσματος, έτσι ώστε τα πιο αργά ιόντα αερίου κατά τη διάρκεια της ταλάντωσης του πεδίου να "αισθάνονται" ένα μέσο συνεχές πεδίο και να βομβαρδίζουν το στόχο. Ταυτόχρονα, βομβαρδίζεται και το ηλεκτρόδιο της ανόδου, αλλά η αναλογία των δυναμικών ανόδου και καθόδου εξαρτάται από την αναλογία των επιφανειών των ηλεκτροδίων. Καθώς η επιφάνεια της ανόδου είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του στόχου (η άνοδος είναι γειωμένη μαζί με τα τοιχώματα του θαλάμου), η τάση που πέφτει πάνω στο στόχο θα είναι πολύ μεγαλύτερη, συνεπώς ο ιονισμός θα είναι πολύ πιο έντονος στην επιφάνεια του στόχου. Με το RF sputtering, ο ιονισμός των ατόμων του αερίου, λόγω της ενέργειας του εναλλασσόμενου πεδίου, γίνεται πιο αποτελεσματικός, επιτρέποντας τη λειτουργία σε χαμηλότερες πιέσεις. Με την τεχνική αυτή μπορεί να γίνει εναπόθεση λεπτών μεμβρανών μετάλλων, ημιαγωγών και μονωτικών υλικών, όπως οξειδίων και νιτριδίων μετάλλων. [24]

### 2.3 DC Sputtering

Σε αυτήν την τεχνική, η οποία πραγματοποιείται με συνεχές ρεύμα (εξού και ο όρος DC-Direct Current), ο στόχος πολώνεται υπό σταθερή αρνητική τάση μερικών εκατοντάδων έως μερικών χιλιάδων Volts σε θάλαμο πολύ χαμηλής πίεσης. Παράλληλα, το υπόστρωμα είναι γειωμένο στο ηλεκτρόδιο ανόδου μαζί με τα τοιχώματα του θαλάμου. Στο εσωτερικό του θαλάμου υπάρχει ένα αδρανές αέριο, το οποίο, με την εφαρμογή της αρνητικής τάσης, μετατρέπεται σε πλάσμα, με ένα μέρος των ατόμων του να είναι θετικά ιόντα και ελεύθερα ηλεκτρόνια σε θεωρητικά ίσους πληθυσμούς, ενώ τα υπόλοιπα είναι ουδέτερα άτομα του αερίου. Τα ιόντα κατευθύνονται προς τον αρνητικά πολωμένο στόχο, συγκρούονται με την επιφάνειά του και η ενέργεια που μεταφέρουν σπάει τους δεσμούς των ατόμων του στόχου, με αποτέλεσμα την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια. Στη συνέχεια οι ατμοί των ατόμων του στόχου ταξιδεύουν προς το υπόστρωμα και εναποτίθενται στην επιφάνειά του σχηματίζοντας ένα λεπτό υμένιο.

Κατά τη διάρκεια του DC sputtering ο στόχος πρέπει να είναι αγωγίμος, συνεπώς μόνο μέταλλα μπορούν να εναποτεθούν. Αν υπήρξε εφαρμογή τάσης συνεχούς ρεύματος στην περίπτωση μονωτικών υλικών, όπως τα οξειδία μετάλλων, θα είχε ως αποτέλεσμα στη συσσώρευση φορτίου στην επιφάνεια του μονωτικού λόγω της σύγκρουσης των ιόντων αερίου, εμποδίζοντας τα επόμενα ιόντα από το να φθάσουν στην επιφάνεια. Έτσι, θα μειωνόταν η εφαρμοζόμενη τάση στο στόχο και τελικά θα προέκυπτε απόσβεση του πλάσματος. [24]

#### 2.4 Παραγωγή νανοσωματιδίων μέσω ιοντοβολής

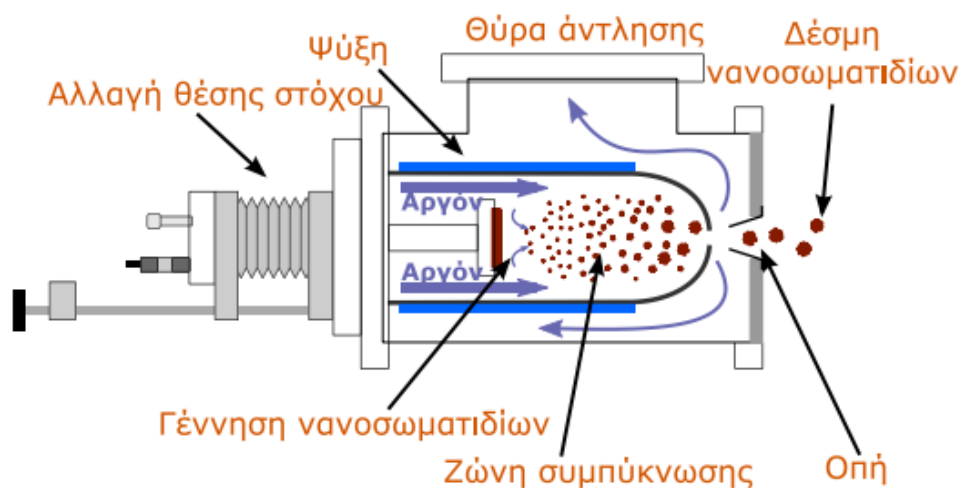
Η τεχνική παραγωγής νανοσωματιδίων μέσω των μεθόδων της ιοντοβολής και της εξάχνωσης, αποτελούν δύο τεχνικές της φυσικής εναπόθεσης ατμών (Physical Vapor Deposition – PVD). Η μέθοδος σύνθεσης νανοσωματιδίων που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μπορεί να περιγραφεί ως μια τεχνική «διακοπτόμενης συμπύκνωσης αερίου», καθώς τα νανοσωματίδια παράγονται μέσω DC magnetron sputtering, ακολουθούμενη από συμπύκνωση αέριας φάσης. Τα νανοσωματίδια που παράγονται κατέχουν ένα πλεονάζον ηλεκτρόνιο, το οποίο επιτρέπει τον ηλεκτροστατικό χειρισμό τους. Ανάλογα με την επιτάχυνση των νανοσωματιδίων μπορεί να δημιουργηθεί ένα ευρύ φάσμα μορφολογιών, από μεμονωμένες νησίδες μέχρι πολύ λεπτά υμένα επικάλυψης. [25]

Σε ένα σύστημα DC sputtering, η κατάσταση πλάσματος συνεχούς ρεύματος δημιουργείται χάρη στο μαγνητικό πεδίο του DC magnetron sputtering, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ατμών του στόχου από τα άτομά του. Στη ζώνη συσσωμάτωσης όπου υπάρχει το αέριο, πραγματοποιούνται οι διαδικασίες της συμπύκνωσης και της πυρηνοποίησης για τη δημιουργία μιας κατανομής νανοσωματιδίων με ποικίλα μεγέθη. Τα άτομα του στόχου με πολύ υψηλές κινητικές ενέργειες ψύχονται από το αέριο (ισοδύναμα οδηγούνται σε καταστάσεις χαμηλότερης κινητικής ενέργειας) προκαλώντας την πυρηνοποίηση των σωματιδίων-στόχων. Η πυρηνοποίηση αυτών των μικρών σωματιδίων ακολουθείται από την ανάπτυξή τους σε μεγαλύτερα σωματίδια (clusters) που σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις διατομικές συγκρούσεις. Δεδομένου ότι το αδρανές αέριο είναι κυρίως υπεύθυνο για τη συμπύκνωση, η πίεσή του χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της κατανομής μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Επομένως, το σχήμα των νανοσωματιδίων επηρεάζεται από ποικίλες παραμέτρους. Η κεφαλή του magnetron sputtering μπορεί να μετακινηθεί εντός της ζώνης

συμπύκνωσης. Μειώνοντας την απόσταση από την κεφαλή μέχρι το πρώτο άνοιγμα εκτόνωσης, μειώνεται η απόσταση και ο χρόνος όπου συμβαίνει η συμπύκνωση και επομένως ελαττώνεται το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, η πηγή επιτρέπει την εισαγωγή αδρανούς αερίου που θα λειτουργήσει ως φορέας των παραγόμενων νανοσωματιδίων. Αυξάνοντας το ρυθμό ροής του αερίου παρατηρείται μείωση του μέσου μεγέθους των παραγόμενων νανοσωματιδίων, εξαιτίας της μείωσης του χρόνου παραμονής τους στη ζώνη συσσωμάτωσης. Η πίεση στη ζώνη άντλησης των νανοσωματιδίων είναι περίπου  $1 \times 10^{-3}$  mbar, ενώ η πίεση στο θάλαμο εναπόθεσης είναι περίπου  $5 \times 10^{-5}$  mbar. Λόγω αυτής της βαθμίδας στην πίεση, τα νανοσωματίδια παρασύρονται στον θάλαμο εναπόθεσης και επικάθονται στο δείγμα.

Η ανάπτυξη των clusters σταματά καθώς εισέρχονται μέσα από μία μικρή οπή στο θάλαμο όπου επικρατεί σημαντικά χαμηλότερη πίεση. Στη φάση αυτή σχηματίζονται τα νανοσωματίδια που θα εναποθεθούν στο υπόστρωμα. Οι συνθήκες εναπόθεσης που επηρεάζουν την επιφανειακή πυκνότητα των νανοσωματιδίων και την κατανομή του μεγέθους τους, είναι η θερμοκρασία του υποστρώματος, ο χρόνος εναπόθεσης, η ισχύς της εναπόθεσης και ο ρυθμός ροής του αδρανούς αερίου.



**Εικόνα 2.2:** Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παραγωγής νανοσωματιδίων υπό κενό που είναι διαθέσιμη στον καθαρό χώρο του τομέα Φυσικής του Ε.Μ.Π. [72]

## 2.5 Εξάχνωση μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίων (e-gun evaporation)

Η εξάχνωση με δέσμη ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται οδηγώντας μια δέσμη ηλεκτρονίων που παράγεται από τη θερμιονική εκπομπή ηλεκτρονίων μέσω νήματος βολφραμίου, στο στόχο. Η δέσμη ηλεκτρονίων διαγράφει καμπύλη τροχιά και προσπίπτει στην επιφάνεια του στόχου, με την κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων να

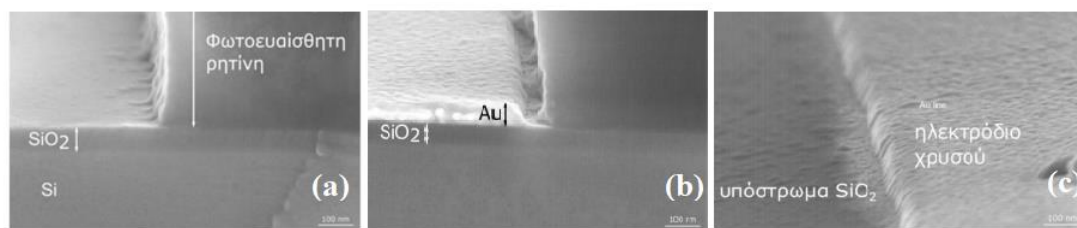


μετατρέπεται σε θερμική μετά την πρόσκρουση. Έτσι δημιουργεί τοπικά, σε μια επιφάνεια διαμέτρου 1 - 2 mm, μια μικρή περιοχή υλικού στην επιφάνεια του στόχου, η οποία εξατμίζεται. Οι ατμοί συμπυκνώνονται στο υπόστρωμα σχηματίζοντας λεπτό υμένιο του υλικού.

Τα περισσότερα μέταλλα μπορούν να εξατμιστούν με τον τρόπο αυτό, ενώ σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η επιτυχής εξάτμιση ακόμα και πολύ δύστηκτων μετάλλων, όπως το βολφράμιο. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο σχετικά μικρός κώνος εκπομπής και η έντονη εξάρτηση του ρυθμού εξάτμισης από το ρεύμα της δέσμης ηλεκτρονίων. Η μέθοδος e-gun evaporation χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη μικροηλεκτρονική για την κατασκευή των μεταλλικών επαφών στα κυκλώματα, καθώς η φύση της τεχνικής επιτρέπει την επιλεκτική εναπόθεση υλικού σε δομές που αποτυπώνονται στο υπόστρωμα με λιθογραφία. Μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής εναπόθεσης μετάλλου παράχθηκαν τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια για την κατασκευή των αισθητήρων της παρούσας εργασίας. [26]

## 2.6 Κατασκευή ηλεκτροδίων

Για την ολοκληρωμένη κατασκευή των ηλεκτροδίων των αισθητήρων απαιτείται κατάλληλη τροποποίηση μέσω οπτικής λιθογραφίας ενός υποστρώματος (είτε πυριτίου είτε πολυϊμιδίου) με οξείδιο πάχους 300 nm. Η διάταξη της μάσκας λιθογραφίας περιλαμβάνει ηλεκτρόδια με αποστάσεις 10 μm. Στη συνέχεια, η επιμετάλλωση των υποστρωμάτων επιτυγχάνεται μέσω της τεχνικής e-gun evaporation, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5. Έπειτα, απαραίτητη είναι η αφαίρεση του περιττού μετάλλου (χρυσού) μέσω του Lift-off. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για να προκύψουν ηλεκτρόδια με ομαλό και συνεχές προφίλ, χωρίς φυσική επαφή με τα νανοσωματίδια, περιλαμβάνει την παραμονή των δειγμάτων εντός ακετόνης για τουλάχιστον τρεις ώρες. Με αυτόν τον τρόπο, η ακετόνη σταδιακά διαλύει τη φωτοευαίσθητη ρητίνη που έχει παραμείνει μετά την οπτική λιθογραφία. Μετά το πέρας των τριών ωρών σειρά έχει η εμβάπτιση για 60 sec εντός λουτρού υπερήχων, για την οριστική απομάκρυνση λοιπών υπολειμμάτων ρητίνης και χρυσού.[20]



**Εικόνα 2.3:** Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (a) μετά την εμφάνιση της φωτοευαίσθητης ρητίνης, (b) μετά την επιμετάλλωση χρυσού και (c) lift-off μετά από παραμονή στην ακετόνη για 3 ώρες. [72]

## 2.7 Βιολογική τροποποίηση αισθητήρων

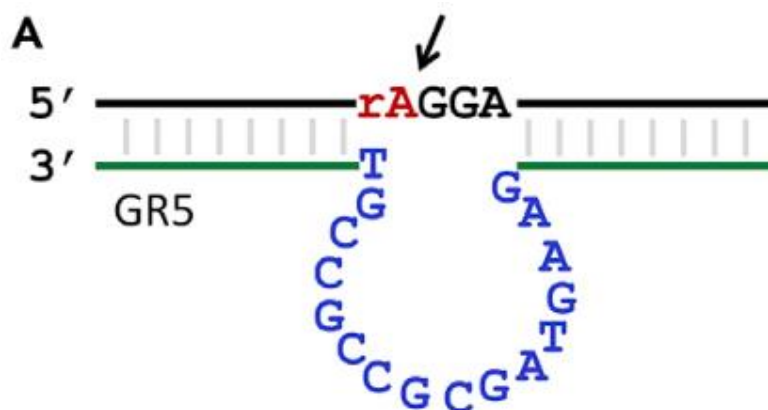
### 2.7.1 DNAzymes

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων με προτίμηση για *in vitro* επιλεκτικότητα οδήγησε στην ανακάλυψη μιας νέας κατηγορίας νουκλεϊκών οξέων, των DNAzymes. [27] Τα DNAzymes-αλλιώς ένζυμα DNA, καταλυτικό DNA ή δεοξυριβόζυμα- είναι ένας σημαντικός τύπος λειτουργικού DNA που διαθέτει δύο μοναδικές ιδιότητες: την αναγνώριση του στόχου αντίχενωσης και την ικανότητα διάσπασης της δίκλωνης έλικας. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν στα συγκεκριμένα βιομόρια να χρησιμοποιούνται ως βιοϋποδοχείς στη θέση πρωτεϊνικών ενζύμων ή αντισωμάτων. [28]

Με τον όρο DNAzymes αναφέρεται κανείς σε νουκλεϊκά οξέα DNA που είναι ικανά να καταλύουν χημικές αντιδράσεις, όπως η διάσπαση του RNA [29], η διάσπαση του DNA [30], η απολίπωση του DNA [31], η φωσφορυλίωση του DNA [32] και η μετάλλωση πορφυρίνης [33]. Επιπλέον, τα DNAzymes μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα αναλυτών-στόχων, συμπεριλαμβανομένων ιόντων μετάλλων, πρωτεϊνών, ακόμη και ολόκληρων κυττάρων μέσω *in vitro* επιλογής [34]. Σε αντίθεση με το αντίστοιχο ριβόζυμο, το οποίο είναι ένα φυσικό μόριο RNA ικανό να καταλύει συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις [35], όλα τα DNAzymes έχουν συντεθεί εργαστηριακά, δηλαδή δεν έχουν βρεθεί δείγματα καταλυτικού DNA σε βιολογικά συστήματα μέχρι στιγμής.

Το πρώτο DNAzyme, γνωστό ως GR-5, ανακαλύφθηκε το 1994 από τους Breaker και Joyce [29]. Η Εικόνα 2.4 δείχνει τη δομή του. Η επάνω αλυσίδα (με μαύρο χρώμα) είναι το DNA-υπόστρωμα (substrate DNA) που αποτελείται εξ ολοκλήρου από νουκλεοτίδια DNA και μία ριβο-αδενοσίνη (rA επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα) στη μέση. Αυτό το μόριο αδενοσίνης χρησιμεύει ως θέση διάσπασης του RNA. Κάτω από το DNA-υποστρώματος βρίσκεται η αλυσίδα του ενζύμου, η οποία έχει έναν καταλυτικό πυρήνα που αποτελείται από 15 μονόκλινα νουκλεοτίδια (σημειωμένα με

μπλε χρώμα), τα οποία πλαισιώνονται από δύο περιοχές σύζευξης βάσεων (σημειωμένες με πράσινο χρώμα). Το GR-5 καταλύει την αντίδραση διάσπασης του RNA υπό την παρουσία του βαρέος μετάλλου του μολύβδου ( $Pb^{2+}$ ), με ρυθμό κατάλυσης περίπου  $1 \text{ min}^{-1}$  σε θερμοκρασία  $23^{\circ}\text{C}$  και pH ίσο με 7. Αυτός ο ρυθμός είναι περίπου  $10^5$  φορές υψηλότερος από τη χημική αντίδραση υπό τις ίδιες συνθήκες και απουσία κατάλυσης. Ύστερα από την κατασκευή του GR-5, πολλά άλλα DNAzymes που αποκόπτουν κομμάτια RNA έχουν παραχθεί με επιτυχία.



*Εικόνα 2.4: Δομή του DNAzyme GR-5. Η αλυσίδα υποστρώματος και ενζύμου απεικονίζονται με μαύρο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Η θέση διάσπασης επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα και υποδεικνύεται με βέλος.[70]*

Υπάρχουν πολυάριθμοι λόγοι για τους οποίους οι ερευνητές εστιάζουν όλο και περισσότερο στα DNAzymes ως βιοϋποδοχείς για ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Αρχικά, τα DNAzymes μπορούν να απομονωθούν μέσω *in vitro* επιλογής για να ανιχνεύσουν ουσιαστικά οποιονδήποτε στόχο, συμπεριλαμβανομένων στόχων για τους οποίους είναι δύσκολο να ληφθούν αντισώματα, όπως μόρια με χαμηλή ανοσογονικότητα και τοξικά ιόντα μετάλλων, που είναι και ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας. Κατά δεύτερον, τα ένζυμα DNA θεωρούνται κατάλληλα για βιολογικούς αισθητήρες λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους, της υψηλής επιλεκτικότητας και της ικανότητάς τους να πραγματοποιούν ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο. [28] Επιπλέον, τα ένζυμα DNA συντίθενται αποκλειστικά χημικά. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς η διαδικασία χημικής σύνθεσης είναι εύκολα προσαρμόσιμη, παράγει επαναληψιμότητα και ομοιογένεια από παρτίδα σε παρτίδα κατασκευής και εξαλείφει τη βιολογική μόλυνση από ιούς και βακτήρια. Επιπλέον, η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη χημική τροποποίηση των DNAzymes για την ενίσχυση της σταθερότητάς τους και τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ακόμη, η εισαγωγή χαρακτηριστικών ομάδων επιτρέπει ενδιαφέρουσες χημικές συζεύξεις, όπως η σύνδεση νουκλεϊκών οξέων με μικρά μόρια (χρωστικές ουσίες,

υδατάνθρακες και αμινοξέα), πρωτεΐνες και διάφορα νανοϋλικά, όπως τα νανοσωματίδια που είναι και το ζητούμενο της παρούσας εργασίας. Τέλος, τα DNAzymes είναι σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες και μπορούν να αναδιπλωθούν στη φυσική τους δομή και να διατηρήσουν τη δραστηρότητά τους. Αναμφίβολα, η ευελιξία που παρέχουν αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τους ερευνητές και αποτέλεσαν το κύριο κίνητρο για την ανάπτυξη πολλών καινοτόμων βιοαισθητήρων με βιοϋποδοχείς τα DNAzymes.[36] [37] [38]

### 2.7.2 Χρήση βιοαισθητήρων για ανίχνευση βαρέων μετάλλων

Σύμφωνα με τα σημερινά δεδομένα όσον αφορά στην ποσότητα και στην ποικιλομορφία των περιβαλλοντικών ρύπων, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για αποτελεσματικές και αξιόπιστες λύσεις ανίχνευσης ρύπων που να οδηγούν σε ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση σε φυσικούς πόρους, όπως ο αέρας ή το νερό. Τα ιόντα βαρέων μετάλλων, τα φυτοφάρμακα, τα μεταλλοειδή, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα αντιβιοτικά είναι μεταξύ των πιο κοινών αναλυτών, ενώ το νερό βρύσης, λίμνης, ποταμού, τα υπόγεια ύδατα και τα λύματα είναι οι πιο συνηθισμένες περιβαλλοντικές μήτρες. Η ανίχνευση των ρύπων έχει αποδειχθεί με τη σειρά της ως δύσκολο έργο λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας, καθώς και της πολυπλοκότητας της μήτρας του δείγματος, απαιτώντας έτσι ιδιαίτερα ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης που επιτρέπουν την επιλεκτική ανίχνευση με χαμηλά όρια ανίχνευσης. [39]

Τα ιόντα βαρέων μετάλλων, τα οποία συχνά βρίσκονται στο νερό, είναι ένα από τα πιο επικίνδυνα παραπροϊόντα της ραγδαίας εκβιομηχάνισης και αποτελούν μία από τις κυριότερες απειλές τόσο για την ανθρώπινη ζωή, όσο και για την πανίδα. Η μόλυνση του νερού είναι εξαιρετικά κρίσιμη, καθώς η είσοδος των ρύπων στο πόσιμο ή αρδευτικό νερό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους σε όλη την τροφική αλυσίδα. Επιπλέον, η μόλυνση από ιόντα βαρέων μετάλλων μπορεί να βλάψει τα φυτά και το έδαφος, καθώς χαρακτηρίζεται από δυσμενή επίδραση στη γονιμότητα των φυτών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατό τους.

Το κάδμιο ( $Cd^{2+}$ ) είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα και επικίνδυνα ιόντα μετάλλων που μπορούν να διεισδύσουν στο περιβάλλον και ειδικότερα στο νερό.[40] [41] Ο χρόνος ημιζωής του καδμίου είναι περίπου 10-30 χρόνια [42], δηλαδή δεν αποδομείται φυσικά, αλλά συσσωρεύεται σε ζωτικά όργανα όπως το έντερο, το ήπαρ, τα νεφρά κ.λπ.[43] Η τοξικότητα του  $Cd^{2+}$  μπορεί να φανεί ξεκάθαρα από την παρεμπόδιση του

στη σωστή κυτταρική λειτουργία του, καθώς εμποδίζει την απορρόφηση του σιδήρου, του ασβεστίου ή του ψευδαργύρου στο έντερο [44], με αποτέλεσμα τη βραδεία ανάπτυξη, τη δυσλειτουργία του ήπατος και των νεφρών, την αναιμία και την οστική βλάβη. Το κάδμιο μπορεί επίσης να καταλαμβάνει θέσεις δέσμησης πρωτεϊνών, να παρεμβαίνει στην έκκριση και τη ρύθμιση των ορμονών που σχετίζονται με πρωτεάσες, να μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού και να προκαλεί βλάβες σε όργανα και ιστούς.

Ο μόλυβδος ( $Pb^{2+}$ ) είναι επίσης ένας από τους πιο ανθεκτικούς και τοξικούς ρύπους. Οι πηγές ρύπανσης από μόλυβδο περιλαμβάνουν κυρίως τις χρησιμοποιημένες μπαταρίες, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων, την εξόρυξη και την τήξη μετάλλων [45][46] κι έχουν ως αποτέλεσμα την είσοδό του στην τροφική αλυσίδα, καθώς και τη ρύπανση των υδάτινων πόρων [47][48]. Ακόμη και χαμηλές δόσεις  $Pb^{2+}$  μπορούν να συσσωρευτούν στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ έχει αποδειχθεί ότι είναι δύσκολο να απεκκριθούν- η μακροχρόνια έκθεση ή η υπερβολική πρόσληψη  $Pb^{2+}$  μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες σε όργανα ή οικοσυστήματα. Ειδικότερα, το  $Pb^{2+}$  μπορεί να είναι πιο αποτρεπτικό για τα παιδιά από ό,τι για τους ενήλικες, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του εγκεφάλου και του ύψους. [49]

Το χρώμιο χρησιμοποιείται συνήθως στην επεξεργασία χάλυβα, σε υλικά επιστρώσεων, χρωστικές ουσίες και στην κατάλυση, ωστόσο είναι μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο.[50] Η τοξικότητά του και οι εφαρμογές του έχουν εγείρει σοβαρές περιβαλλοντικές ανησυχίες. Το χρώμιο έχει εννέα διαφορετικές καταστάσεις οξείδωσης με το τρισθενές  $Cr^{3+}$  και το εξασθενές  $Cr^{6+}$  να είναι οι πιο κοινές. Η τοξικότητα του χρωμίου σχετίζεται στενά με την κατάσταση οξείδωσής του.[51] Για παράδειγμα, ένα ίχνος ποσότητας  $Cr^{3+}$  είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό της γλυκόζης και του λίπους και, συνεπώς, θεωρείται απαραίτητο για τη ζωή.[52] Ωστόσο, το τρισθενές χρώμιο εξακολουθεί να είναι τοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις και ταξινομείται επί του παρόντος ως καρκινογόνο τύπου 3. [53]

Λόγω της επικινδυνότητας των ιόντων βαρέων μετάλλων, ιδίως εντός του νερού, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευσή τους. Οι αισθητήρες, και ειδικότερα εκείνοι που βασίζονται σε νανοϋλικά, έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν τις αναλυτικές τεχνικές μέσω του επιτόπιου ελέγχου των υδάτινων σωματιδίων και τελικά να αντικαταστήσουν πολλούς από τους αισθητήρες ποιότητας του νερού που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων. [54] Επιπλέον, πλεονεκτούν ως προς το κόστος, τη χαμηλή

κατανάλωση ενέργειας, καθώς και τη φορητότητα, ενώ παράλληλα μπορούν να συνδυαστούν με αναδυόμενες τεχνολογίες, όπως το Διαδίκτυο των Πραγμάτων (Internet of Things). [55] Η ενσωμάτωση βιοϋλικών όπως τα DNAzymes είναι επίσης συνήθης τακτική στην ανάπτυξη εξαιρετικά ευαίσθητων και επιλεκτικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων. Τα DNAzymes παρουσιάζουν υψηλή επιλεκτικότητα κι ευαισθησία έναντι ιόντων μετάλλων, όπως εξηγήθηκε αναλυτικά και στην προηγούμενη παράγραφο, καθώς η δέσμευση ιόντων μετάλλων σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας DNA οδηγεί σε διάσπαση των αλυσίδων.

Στην παρούσα εργασία, κατασκευάστηκαν ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες σε βάση νανοσωματιδίων πλατίνας και με βιοϋποδοχείς DNAzymes, για την ταυτόχρονη ανίχνευση στόχων ιόντων βαρέων μετάλλων, συγκεκριμένα των  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  και  $Cr^{3+}$ . Το δισδιάστατο υμένιο νανοσωματιδίων εναποτίθεται μεταξύ των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων (Interdigitated Electrodes) χρυσού, δηλαδή στην ενεργό περιοχή του αισθητήρα. Για την επιλεκτική ανίχνευση όλων των ιόντων έχουν επιλεγεί κατάλληλα για τον στόχο DNAzymes, τα οποία, εκτός από την καταλυτική δράση τους παρουσία ιόντων βαρέων μετάλλων, προσφέρουν αυξημένη αγωγιμότητα στη διάταξη. Παρουσία του υλικού-στόχου, η αγωγιμότητα μειώνεται λόγω της κατάρρευσης της αγωγίμης γέφυρας που δημιουργούν τα DNAzymes μεταξύ νανοσωματιδίων. Για την επιφανειακή ακινητοποίηση των DNAzymes χρησιμοποιήθηκαν δύο χαρακτηριστικές ομάδες (ομάδες θειόλης και αμινομάδες) και αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην απόδοση του αισθητήρα.

### 2.7.3 Πρωτόκολλα ακινητοποίησης DNAzymes

Για την τροποποίηση των επιφανειών των αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές. Η πρώτη μέθοδος κάνει χρήση τροποποιημένων αλληλουχιών DNA με αμινομάδες, ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες DNA τροποποιημένες με θειόλη. Πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε βήμα των διαδικασιών που ακολουθούν, χρησιμοποιείται μόνο η ενεργός περιοχή των αισθητήρων, δηλαδή η επιφάνεια των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων. [56]

#### 2.7.3.1 Επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες

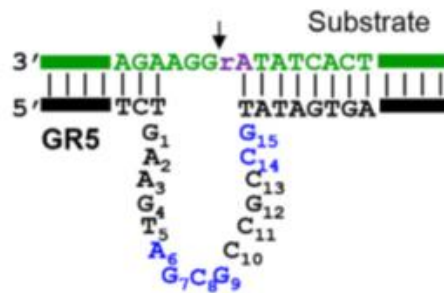
Για τη συγκεκριμένη τεχνική ακινητοποίησης των DNAzymes, αρχικά απαιτείται η ενεργοποίηση της επιφάνειας του πυριτίου-οξειδίου του πυριτίου. Αυτό επιτυγχάνεται με πλάσμα οξυγόνου, που κάνει την επιφάνεια υδρόφιλη. Στη συνέχεια, στα

υποστρώματα έγινε ακινητοποίηση (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), ενός αμινοσιλανίου που αποσκοπεί στη διαδικασία της σιλανοποίησης, η οποία συνεπάγεται τη δημιουργία ριζών αλκοξυσιλανίου. Αυτό είναι απαραίτητο για το επόμενο βήμα της διαδικασίας, όπου δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της γλουταραλδεΐδης με τα μόρια του αλκοξυσιλανίου. Συγκεκριμένα, η ομάδα αμίνης που υπάρχει στο APTES μπορεί να αντιδράσει με μια ομάδα αλδεΐδης στη γλουταραλδεΐδη σε μια αντίδραση συμπύκνωσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ομάδας ιμίνης, γνωστής ως βάσης Schiff. [57]

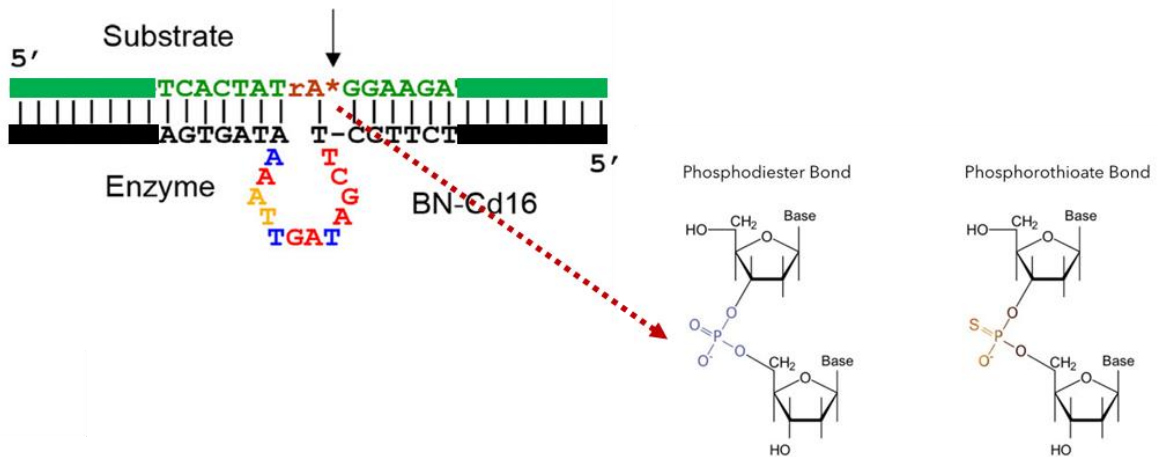
Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για τις παραπάνω διεργασίες αρχικά περιλαμβάνει κατασκευή διαλύματος με περιεκτικότητα 95% αιθανόλη και 5% νερό (Διάλυμα Α). Έπειτα, παρασκευάζεται νέο διάλυμα (Διάλυμα Β) που περιέχει 5% APTES και 95% από το Διάλυμα Α, σε ξεχωριστή φιάλη για κάθε δείγμα. Είναι σημαντικό η σιλανοποίηση σε αυτό το βήμα να γίνει βηματικά για κάθε υπόστρωμα, δηλαδή αρχικά να εισαχθεί η υπολογισμένη ποσότητα 95% διαλύματος Α στη φιάλη κάθε δείγματος, μετά να εμβαπτιστεί σε αυτό ο κάθε αισθητήρας και τέλος να προστεθεί η υπολογισμένη 5% ποσότητα του APTES. Κάθε φιάλη πρέπει να ανακινείται ελαφρώς για την ανάμιξη του διαλύματος Β που προκύπτει, ενώ τα δείγματα πρέπει να παραμείνουν σε συνθήκες σκότους για 2 ώρες. Μετά το πέρας των δύο ωρών, γίνονται διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το Διάλυμα Α και άμεσο στέγνωμά τους με άζωτο. Για να ολοκληρωθεί η σιλανοποίηση, οι αισθητήρες πρέπει να θερμανθούν στους 110°C για μία ώρα. Σε επόμενο βήμα, η γλουταραλδεΐδη διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS1x (pH=7.4) σε ποσοστό 5%. Τα δείγματα πρέπει να παραμείνουν σε αυτό το διάλυμα για 1 ώρα και, στη συνέχεια, να ξεπλυθούν με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS1x, απιονισμένο νερό και να στεγνώσουν με άζωτο.

Μετά από την αρχική τροποποίηση των επιφανειών, ακολουθεί η ακινητοποίηση του DNAzyme. Συγκεκριμένα, για κάθε μέταλλο ανίχνευσης επιλέχθηκαν διαφορετικά DNAzymes: (a) το GR5 για τα ιόντα μολύβδου, καθώς εμφανίζει μεγάλη επιλεκτικότητα όσον αφορά στην ανίχνευσή τους, (b) το CD16 για τα ιόντα καδμίου, το οποίο έχει ακριβώς την ίδια αλυσίδα υπόστρωμα όπως και το DNAzyme του μολύβδου, με τη διαφορά ότι η ριβονουκλεϊκή βάση διαθέτει άτομο θείου αντί για οξυγόνο και (c) το Ce13d, που περιλαμβάνει την ίδια αλυσίδα υπόστρωμα όπως και στην περίπτωση του DNAzyme για τον μόλυβδο, ενώ η αλυσίδα που λειτουργεί ενζυματικά είναι διαφορετική. Η σχηματική αναπαράσταση όλων των DNAzymes που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στις Εικόνες 2.5-2.7, ενώ στον Πίνακα 2.1

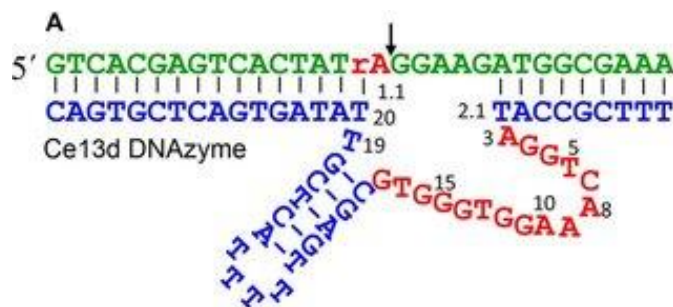
παρουσιάζονται οι αλληλουχίες όλων των DNAzymes που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 2.5: Η αλληλουχία του GR5 για την ανίχνευση ιόντων μολύβδου.



Εικόνα 2.6: Το DNAzyme CD16 για την ανίχνευση ιόντων καδμίου και το άτομο θείου στο καταλυτικό κέντρο του δίκλωνου μορίου.



Εικόνα 2.7: Το DNAzyme Ce13d για την ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου.



Sequence name	Sequence (5'-3')
PO Substrate Strand	AGTCACTATrAGGAAGATGGCGAAC
Ps Substrate Strand	AGTCACTATrA*GGAAGATGGCGAAC
Gr5 Enzyme Strand	GTTCGCCATCTGAAGTAGCGCCCGTATAGTGACT
Gr5 DNAzyme Single chain	AGTCACTATrAGGAAGATGGCGAACCCCCGTTCGCCATCTGAAGTAGCGCCG CCGTATAGTGACT
Cd16 Enzyme Strand	GTTCGCCATCTTCCTTCGATAGTTAAAATAGTGACT
Ce13d Enzyme Strand	TTGTTCGCCATAGGTCAAAGGTGGGTGCGAGTTTTTACTCGTTATAGTGACT

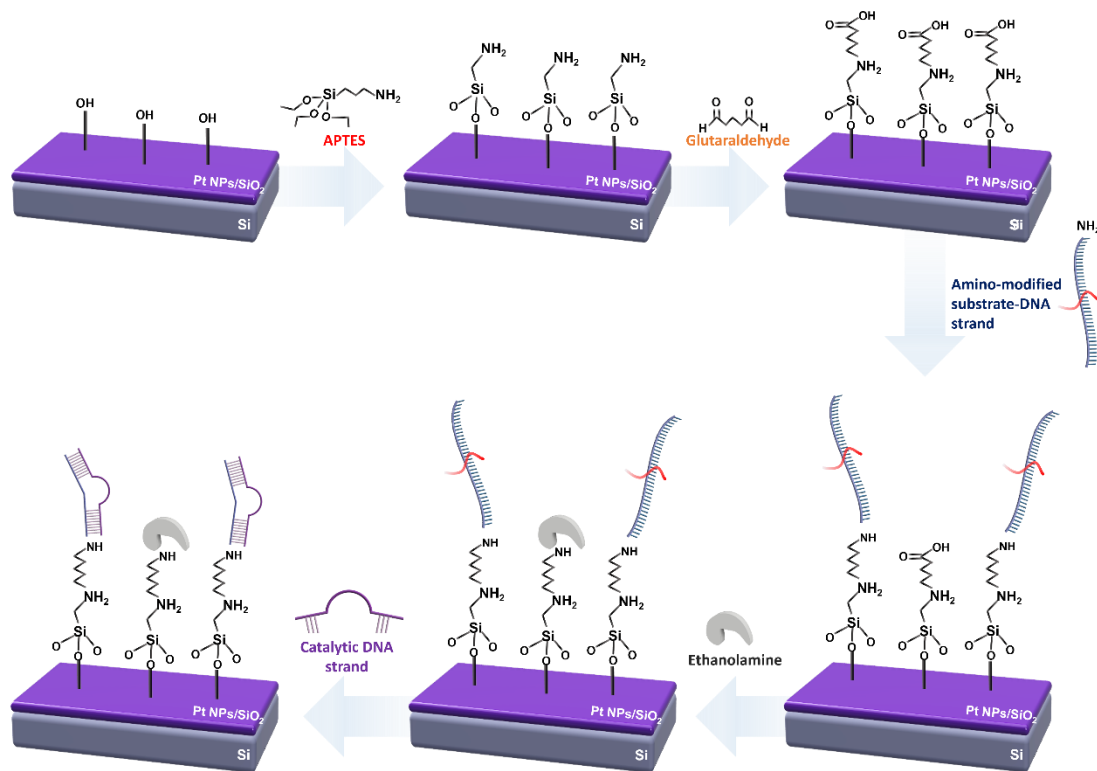
**Πίνακας 2.1:** Οι αλληλουχίες των DNAzymes που χρησιμοποιήθηκαν για τους βιοαισθητήρες της παρούσας εργασίας.

Σε πρώτο στάδιο της τροποποίησης των DNAzymes στα δείγματα, πρέπει να ακινητοποιηθεί το DNA-υπόστρωμα (substrate DNA), το οποίο θα προσδεθεί μέσω των ολιγονουκλεοτιδίων του που έχουν τροποποιηθεί με αμινομάδες. Συγκεκριμένα, θα γίνει αντίδραση με τη δεύτερη αλδεϋδική ομάδα της γλουταραλδεϋδης κι έτσι θα επέλθει η ακινητοποίηση του πρώτου κλώνου του DNAzyme. Πρακτικά, αυτό επιτυγχάνεται μέσω drop-casting στα IDEs κάθε αισθητήρα περίπου 2μL του substrate-DNA, διαλυμένου εντός ρυθμιστικού διαλύματος PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8, 0.001% tween20), σε συγκέντρωση 5μM, ενώ απαιτείται αναμονή μίας ώρας εντός περιβάλλοντος υγρασίας. Πριν το επόμενο βήμα, πρέπει να γίνουν διαδοχικές πλύσεις με PB, απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.

Μετά την ομοιοπολική σύζευξη μεταξύ γλουταραλδεϋδης και substrate DNA, χρησιμοποιείται αιθανολαμίνη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8, 0.001% tween20), σε συγκέντρωση 10μM, για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένων καταλυτικών αλυσίδων DNA από την επιφάνεια. Η παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος γίνεται με ανάμιξη 3 μL ethanolamine εντός 5 mL buffer. Ως εκ τούτου, οι εναπομένουσες ενεργοποιημένες καρβοξυλικές ομάδες

(εκείνες που δε συνδέονται με τις αλληλουχίες του substrate DNA) μπλοκάρονται με τη χρήση αιθανολαμίνης. Επιπλέον, τα μόρια της αιθανολαμίνης έχουν την ιδιότητα να διαχωρίζουν τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-υποστρώματος, καθώς εναποτίθενται με τέτοιο τρόπο ώστε να εμποδίζουν την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Και πάλι η αιθανολαμίνη εισάγεται σε ποσότητα περίπου 2μL μέσω drop-casting στα IDEs κάθε αισθητήρα, ενώ απαιτείται αναμονή μίας ώρας σε συνθήκες υγρασίας. Ύστερα από το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα δείγματα ξεπλένονται διαδοχικά με PB, απιονισμένο νερό και στεγνώνουν με άζωτο.

Το τελικό στάδιο όλης της διεργασίας περιλαμβάνει τον υβριδισμό των αλληλουχιών του DNAzyme με τις ακινητοποιημένες αλυσίδες του substrate-DNA. Το ενζυματικό DNA είναι διαλυμένο είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (50 mM MOPS/25 mM NaCl, pH=7.5) για την περίπτωση ανίχνευσης  $Pb^{2+}$  και  $Cd^{2+}$ , είτε σε MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) (50 mM MES/25 mM NaCl/0.8 mM Phosphate Buffer, pH=6) για ανίχνευση  $Cr^{3+}$ , σε συγκέντρωση 5μM. Η υβριδοποίηση επιτυγχάνεται μέσω drop-casting στα IDEs κάθε αισθητήρα, σε ποσότητα περίπου 2μL, κι έπειτα απαιτείται αναμονή μίας ώρας σε περιβάλλον υγρασίας. Μετά από μία ώρα γίνονται διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (MOPS/MES για ανίχνευση  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}/Cr^{3+}$ , αντίστοιχα), απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.



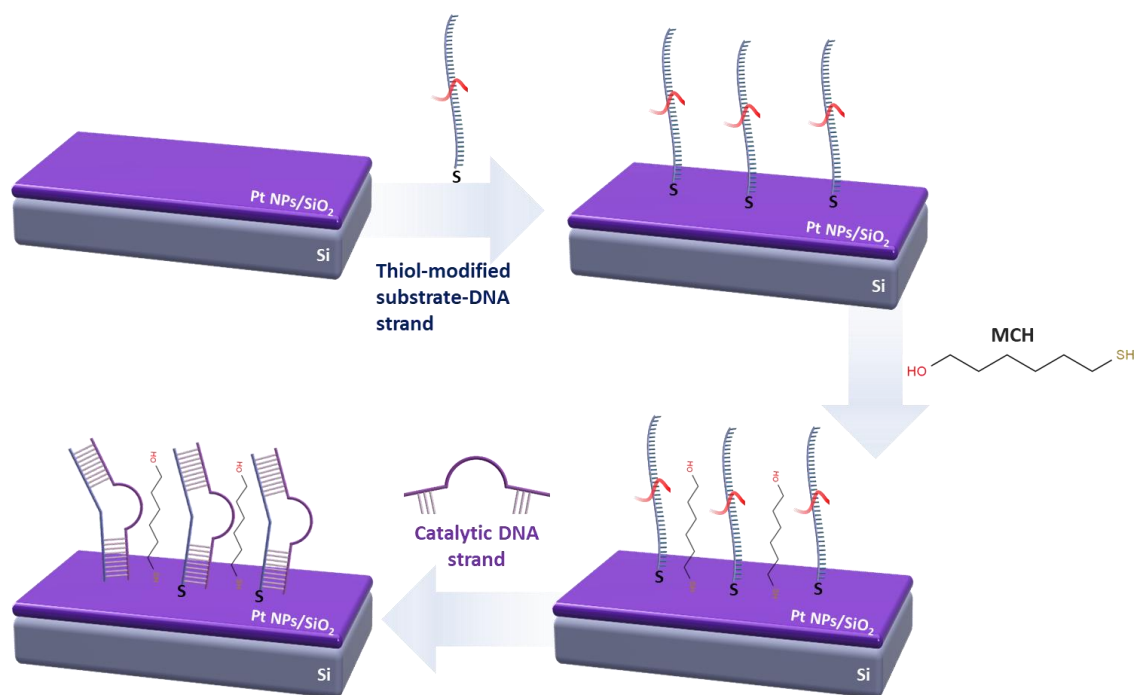
Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ακινητοποίησης DNAzymes με αμινομάδες

### 2.7.3.2 Επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης

Για την τεχνική ακινητοποίησης του τροποποιημένου με ομάδες θειόλης DNAzyme, δεν υπάρχει ανάγκη τροποποίησης της επιφάνειας. Συνεπώς, η όλη διαδικασία απλοποιείται, ωστόσο είναι πολύ παρόμοια με το πρωτόκολλο που ακολουθείται για τις αμινομάδες. Σε πρώτη φάση, θα ακινητοποιηθεί το DNA-υπόστρωμα (substrate DNA), το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8, 0.001% tween20), σε συγκέντρωση 5μM. Αρχικά, πρέπει να θερμανθεί στους 95°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια να εναποτεθεί με drop-casting στα IDEs κάθε αισθητήρα σε ποσότητα περίπου 2μL. Τα δείγματα πρέπει να μείνουν σε περιβάλλον υγρασίας για μία ώρα και μετά το πέρας της να ξεπλυθούν διαδοχικά με PB, απιονισμένο νερό και να στεγνώσουν με άζωτο. Στη συνέχεια, γίνεται με αντίστοιχο τρόπο drop-casting 6-mercapto-1-hexanol (MCH) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PB (παρασκευή διαλύματος με ανάμιξη 7 μL MCH εντός 5 mL PB), προκειμένου να έχει παρόμοια λειτουργία με την αιθανολαμίνη στις αμινο-τροποποιημένες αλληλουχίες DNA- να απομακρύνει τυχόν μη δεσμευμένες αλυσίδες substrate-DNA από την επιφάνεια των δειγμάτων και να μπλοκάρει την αλληλεπίδραση των ακινητοποιημένων αλυσίδων substrate-DNA. Οι αισθητήρες πρέπει να παραμείνουν σε συνθήκες

υγρασίας για μία ώρα και μετά το πέρας της να ξεπλυθούν διαδοχικά με PB, απιονισμένο νερό και να στεγνώσουν με άζωτο.

Το τελικό στάδιο της διεργασίας περιλαμβάνει-όπως και στο πρωτόκολλο τροποποίησης με αμινομάδες-τον υβριδισμό των αλληλουχιών του DNAzyme με τις ακινητοποιημένες αλυσίδες του substrate-DNA. Το ενζυματικό DNA είναι διαλυμένο είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (50 mM MOPS/25 mM NaCl, pH=7.5) για την περίπτωση ανίχνευσης  $Pb^{2+}$  και  $Cd^{2+}$ , είτε σε MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) (50 mM MES/25 mM NaCl/0.8 mM Phosphate Buffer, pH=6) για ανίχνευση  $Cr^{3+}$ , σε συγκέντρωση 5 $\mu$ M. Η υβριδοποίηση γίνεται με drop-casting στα IDEs κάθε αισθητήρα, σε ποσότητα περίπου 2 $\mu$ L, κι έπειτα απαιτείται αναμονή μίας ώρας σε περιβάλλον υγρασίας. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, γίνονται διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (MOPS/MES για ανίχνευση  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ / $Cr^{3+}$ , αντίστοιχα), απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.

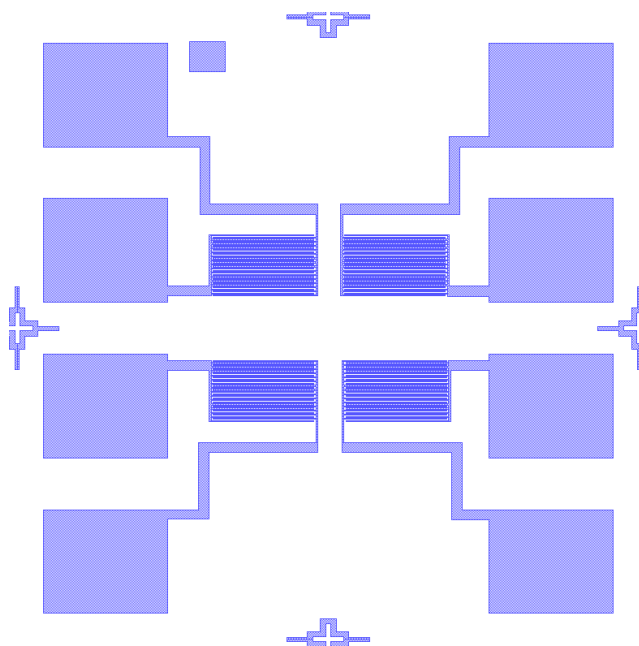


**Εικόνα 2.9:** Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ακινητοποίησης DNAzymes με ομάδες θειόλης.

## 2.8 Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευής βιοαισθητήρων

Σε αυτήν την παράγραφο θα περιγραφούν αναλυτικά τα στάδια κατασκευής των διατάξεων που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα, θα γίνει αναφορά στα τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευής των βιολογικών αισθητήρων ανίχνευσης ιόντων βαρέων μετάλλων. Για την ανάπτυξη των

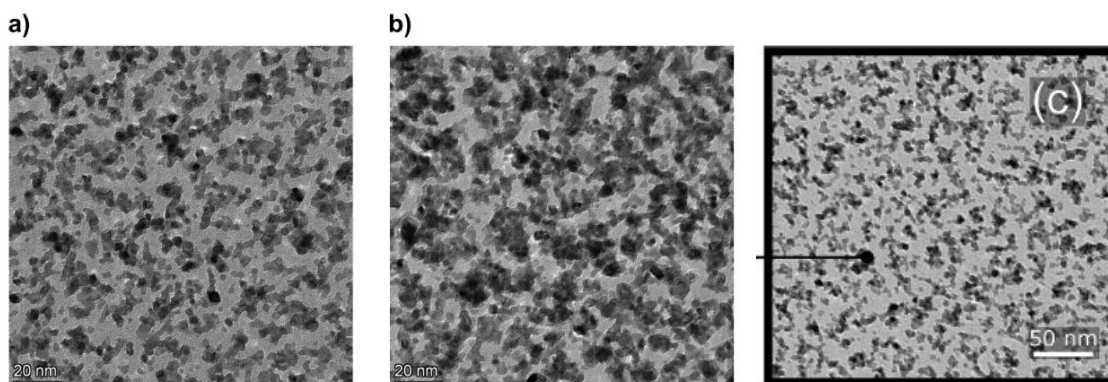
αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα πυριτίου και πολυϊμιδίου (Karton), με θερμικό στρώμα οξειδίου  $\text{SiO}_2$  για την περίπτωση του πυριτίου, πάχους 300 nm. Ακολούθησε η λιθογραφία για το σχηματισμό των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων χρυσού, τα οποία δημιουργήθηκαν με την τεχνική της εξάχνωσης μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίων (e-gun evaporation). Η μάσκα που χρησιμοποιήθηκε για την λιθογραφία παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.10. Αποτελείται από σχέδια που αντιστοιχούν σε ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια με διάκενο 10  $\mu\text{m}$ . Τιτάνιο (πάχους 10 nm) χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο στρώμα πρόσφυσης μεταξύ  $\text{SiO}_2$  και Au και πολυϊμιδίου - χρυσού, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα το συνολικό πάχος του interdigitated electrode να είναι 40 nm. Όπως είναι εμφανές, κάθε δείγμα αποτελείται από μία συστοιχία τεσσάρων αισθητήρων.



*Εικόνα 2.10: Μάσκα ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων[73]*

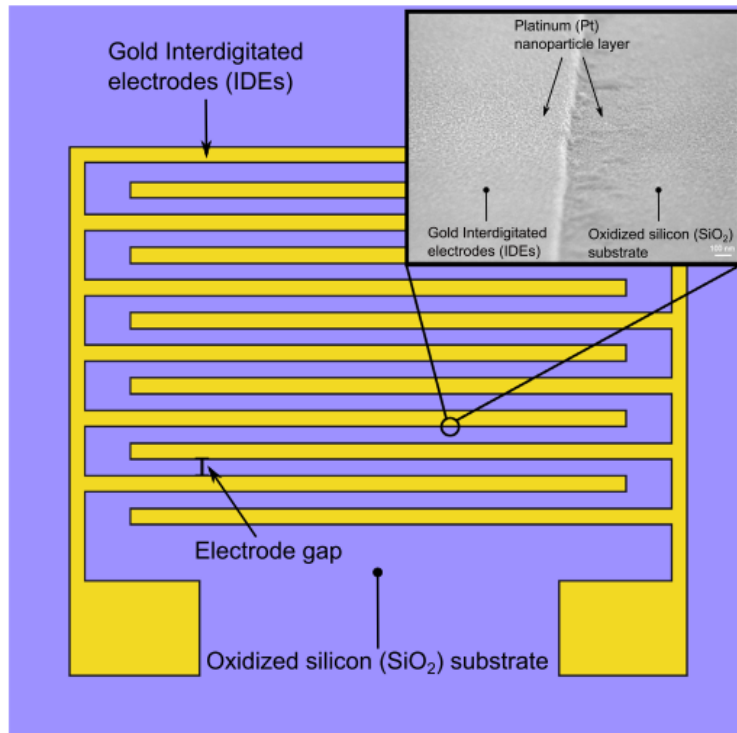
Στη συνέχεια, έγινε εναπόθεση νανοσωματιδίων πλατίνας μέσω της τεχνικής DC magnetron sputtering. Η αντίσταση κάθε διάταξης παρακολουθείτο in-situ κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των νανοσωματιδίων και σταματούσε μόλις καταγραφόταν η τιμή της επιθυμητής αντίστασης. Οι αισθητήρες παρασκευάστηκαν με επικάλυψη της επιφάνειάς τους ακριβώς κάτω από το κατώφλι διήθησης (percolation threshold) των

νανοσωματιδίων για βέλτιστη ευαισθησία της διάταξης (βέλτιστη επιφανειακή κάλυψη νανοσωματιδίων περίπου ίση με 46%). [58] Τέλος, πραγματοποιήθηκε η βιολογική τροποποίηση των επιφανειών των αισθητήρων, η οποία περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 2.7.



**Εικόνα 2.11:** Εικόνες TEM των νανοσωματιδίων πλατίνας για επιφανειακή κάλυψη (a) 49%, (b) 73% [71] και (c) 46% [59]

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως τα υμένα νανοσωματιδίων πλατίνας που παρασκευάζονται από τη συμπύκνωση αέριας φάσης κι εναποτίθενται στα υποστρώματα των αισθητήρων δεν παράγουν επιφάνειες όπου τα σωματίδια οργανώνονται με περιοδικό και επαναλαμβανόμενο τρόπο (όπως στην περίπτωση μιας χημικά τροποποιημένης επιφάνειας). Αντιθέτως, τα νανοσωματίδια αυτο-οργανώνονται στο υπόστρωμα κι έχουν την τάση να συσσωματώνονται δημιουργώντας συστάδες (clusters). Καθώς ο χρόνος εναπόθεσης αυξάνεται, όλο και περισσότερα νανοσωματίδια συσσωματώνονται, πολλαπλασιάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα διαθέσιμα αγωγιμα μονοπάτια όλου του υμενίου και μειώνοντας την αντίσταση της διάταξης. Η αγωγιμότητα σε αυτό το δίκτυο μεταλλικών νανοσωματιδίων μπορεί να περιγραφεί επαρκώς από το θερμικά ενεργοποιούμενο φαινόμενο σήραγγας, το οποίο αναλύθηκε στην ενότητα 1.6.2. Η βέλτιστη επιφανειακή κάλυψη των νανοσωματιδίων, που μεταφράζεται σε συγκεκριμένο εύρος τιμών αντίστασης/αγωγιμότητας των διατάξεων, έχει διερευνηθεί πως αντιστοιχεί σε ένα ποσοστό 42-46% (ή αλλιώς εκατοντάδες kΩ έως 1-10MΩ αντίσταση των αισθητήρων). Σε αυτές τις τιμές, η ευαισθησία και η αποδοτικότητα των διατάξεων έχει διαπιστωθεί πως είναι βέλτιστη, ενώ η επιφανειακή κάλυψη των νανοσωματιδίων πλησιάζει ουσιαστικά την κρίσιμη πυκνότητα των φαινομένων διήθησης σε 2-D υμένα.

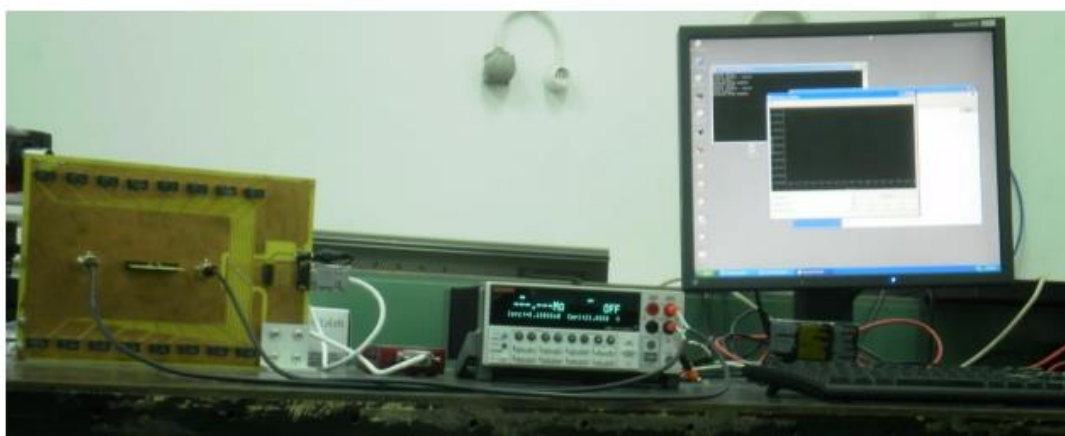


*Εικόνα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων χρυσού. Ένθετη εικόνα: λήψη SEM (υπό γωνία 72°) του φιλμ νανοσωματιδίων πλατίνας, το οποίο καλύπτει τόσο τα ηλεκτρόδια χρυσού όσο και το υπόστρωμα διοξειδίου του πυριτίου. [58]*

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: Πειραματική διαδικασία μετρήσεων και παρουσίαση αποτελεσμάτων

### 3.1 Οργανολογία μετρήσεων

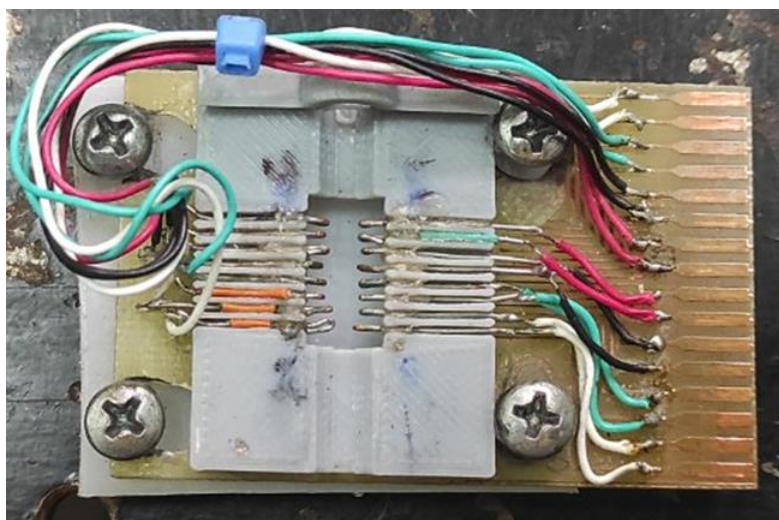
Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των βιοαισθητήρων ανίχνευσης βαρέων μετάλλων βασίζεται στη μεταγωγή κυκλωμάτων για τη διαδοχική μέτρηση όλης της συστοιχίας κάθε δείγματος. Η διάταξη αποτελείται από οκτώ αυτόνομα κυκλώματα τα οποία έχουν κοινή είσοδο και κοινή έξοδο. Η είσοδος και έξοδος, αντίστοιχα, συνδέονται με το μετρητικό όργανο (Keithley 2400 Multimeter). Η πειραματική διάταξη συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, σε γραφικό περιβάλλον LabVIEW, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η διαχείριση της πλακέτας και του οργάνου.



*Εικόνα 3.1: Μετρητική διάταξη*

Το μετρητικό όργανο (Keithley 2400 Multimeter) είναι ρυθμισμένο ώστε να μετράει αντίσταση, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως πηγή ρεύματος με ένα βολτόμετρο συνδεδεμένο παράλληλα στους ακροδέκτες εξόδου. Το συνεχές ρεύμα από το μετρητικό όργανο εισέρχεται στον αισθητήρα (είσοδος του κυκλώματος) και δημιουργεί μία διαφορά δυναμικού η οποία ανιχνεύεται στην έξοδο του κυκλώματος (είσοδο του μετρητικού οργάνου). Στην είσοδο και στην έξοδο κάθε αισθητήρα χρησιμοποιούνται δύο ρελέ για να τον απομονώνουν από το υπόλοιπο κύκλωμα και τους υπόλοιπους αισθητήρες της συστοιχίας. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι ο κάθε αισθητήρας δεν επηρεάζεται από δυναμικά ή χωρητικότητες που αναπτύσσονται στο κύκλωμα εξαιτίας των υπολοίπων στη συστοιχία.





*Εικόνα 3.2: Πλακέτα τυπωμένου κυκλώματος (PCB)*

Για τη σύνδεση του κυκλώματος μεταγωγής με τη συστοιχία των αισθητήρων χρησιμοποιήθηκε μία πλακέτα τυπωμένου κυκλώματος (PCB) (Εικόνα 3.2), η οποία ενώνεται με τις επαφές του κυκλώματος και μέσω ειδικών απολήξεων καταλήγει σε ευθυγραμμισμένα ηλεκτρόδια χαλκού που βρίσκονται στον κενό χώρο, υπό των οποίων ευθυγραμμίζεται και τελικώς μετράται η συστοιχία των αισθητήρων.

Το πρόγραμμα απεικόνισης είναι υπεύθυνο για τη μεταγωγή των ηλεκτρικών κυκλωμάτων, για το συγχρονισμό των μετρήσεων και τη λήψη-αποθήκευση των δεδομένων. Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα επιλογής των αισθητήρων που συμπεριλαμβάνονται στην εκάστοτε μέτρηση, το χρονικό διάστημα μεταξύ των αλλαγών στα κυκλώματα και της τάσης πόλωσης (bias) που εφαρμόζεται. Το χρονικό διάστημα που επιλέχθηκε σε όλα τα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας ήταν τα 0,5 sec, ενώ εφαρμόστηκε χαμηλή τάση 1 V.

### 3.2 Πειραματική διαδικασία

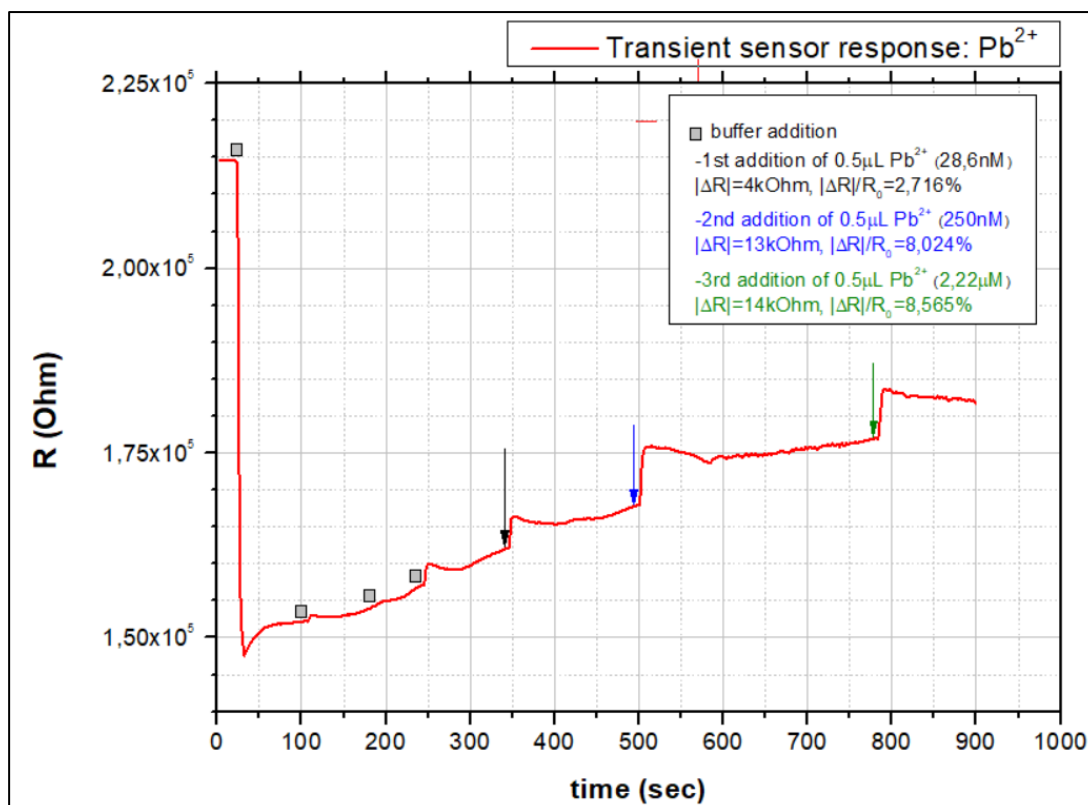
Έπειτα από την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πλακέτα και την κατάλληλη επιλογή των παραμέτρων του λογισμικού, όπως εξηγήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, κάθε τετράδα αισθητήρων είναι έτοιμη για ταυτόχρονη μέτρηση-ανίχνευση. Τα μόρια-στόχοι βαρέων μετάλλων βρίσκονται διαλυμένα σε ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ οι ρίψεις διαλυμάτων γίνεται με την τεχνική drop-casting. Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι οποιαδήποτε αλλαγή στη μετρούμενη αντίσταση των αισθητήρων οφείλεται αποκλειστικά στην αναγνώριση του στόχου από τα ακινητοποιημένα βιομόρια DNAzymes, αρχικά προστίθενται 2  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού

διαλύματος (buffer) πάνω από τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια (IDEs) μέχρι το σύστημα να φτάσει σε σταθερή κατάσταση. Πριν από την προσθήκη οποιουδήποτε στόχου ιόντων βαρέων μετάλλων, προστίθενται επιπλέον ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος πάνω από τα IDEs, βηματικά σε ποσότητα 0,5  $\mu\text{L}$  μέσω dropcasting. Αυτό συμβαίνει σε κάθε μέτρηση, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι η κατάσταση ισορροπίας δεν αλλοιώνεται από το διάλυμα στο οποίο περιέχονται οι στόχοι των ιόντων βαρέων μετάλλων, καθώς κρίνεται απαραίτητο να αποδοθεί κάθε μεταβολή της αντίστασης των δικτύων των νανοσωματιδίων πλατίνας αποκλειστικά στην ανίχνευση των μορίων-στόχων. Εάν η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος εξακολουθεί να μετατοπίζει τη μετρούμενη αντίσταση, γίνεται προσθήκη επιπλέον ποσότητας στο σύστημα μέχρι να επιτευχθεί και πάλι ισορροπία (σημείο κορεσμού). [59]

Στην πλειοψηφία των μετρήσεων, το σύστημα ισορροπεί με την προσθήκη 3,5  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος (2  $\mu\text{L}$  +0,5  $\mu\text{L}$  +0,5  $\mu\text{L}$  +0,5  $\mu\text{L}$  βηματικά). Τα ρυθμιστικά διαλύματα στα οποία είναι διαλυμένα τα ιόντα βαρέων μετάλλων ταυτίζονται με εκείνα του ενζυματικού DNA. Συνεπώς, για την περίπτωση ανίχνευσης  $\text{Pb}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$  χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (M, pH ), ενώ για ανίχνευση  $\text{Cr}^{3+}$  ο buffer MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

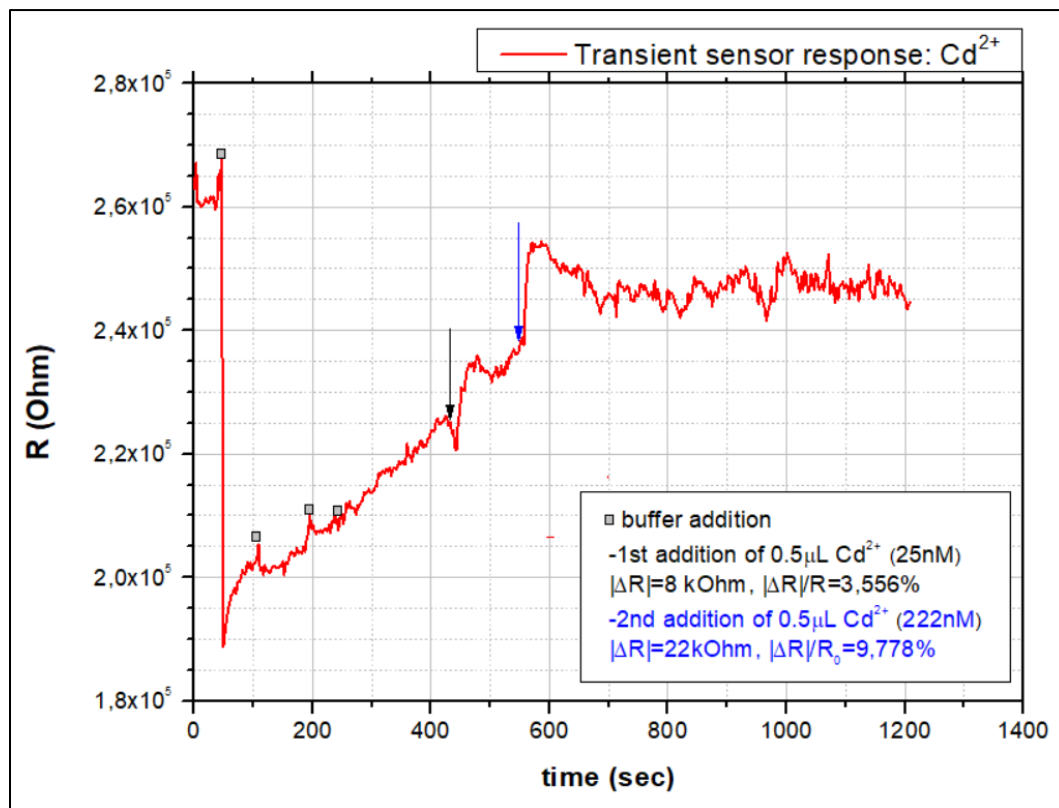
### 3.3 Παρουσίαση πειραματικών αποτελεσμάτων

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αισθητήρων πραγματοποιήθηκε πληθώρα ηλεκτρικών μετρήσεων, με χρήση της οργανολογίας που περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 3.2. Οι δυναμικές μετρήσεις αποτέλεσαν τη βάση για την παρακολούθηση της ανίχνευσης των ιόντων βαρέων μετάλλων σε πραγματικό χρόνο. Ακολουθούν ορισμένες ενδεικτικές γραφικές παραστάσεις της αντίστασης συναρτήσει του χρόνου για αισθητήρες σε υποστρώματα πυριτίου και πολυϊμιδίου και ανίχνευση  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  και  $\text{Cr}^{3+}$ . Πρέπει να σημειωθεί πως το πρωτόκολλο επιφανειακής τροποποίησης με αμινομάδες πραγματοποιήθηκε μόνο για υποστρώματα πυριτίου, ενώ η τροποποίηση με ομάδες θειόλης διεξήχθη και για τα δύο είδη υποστρωμάτων.

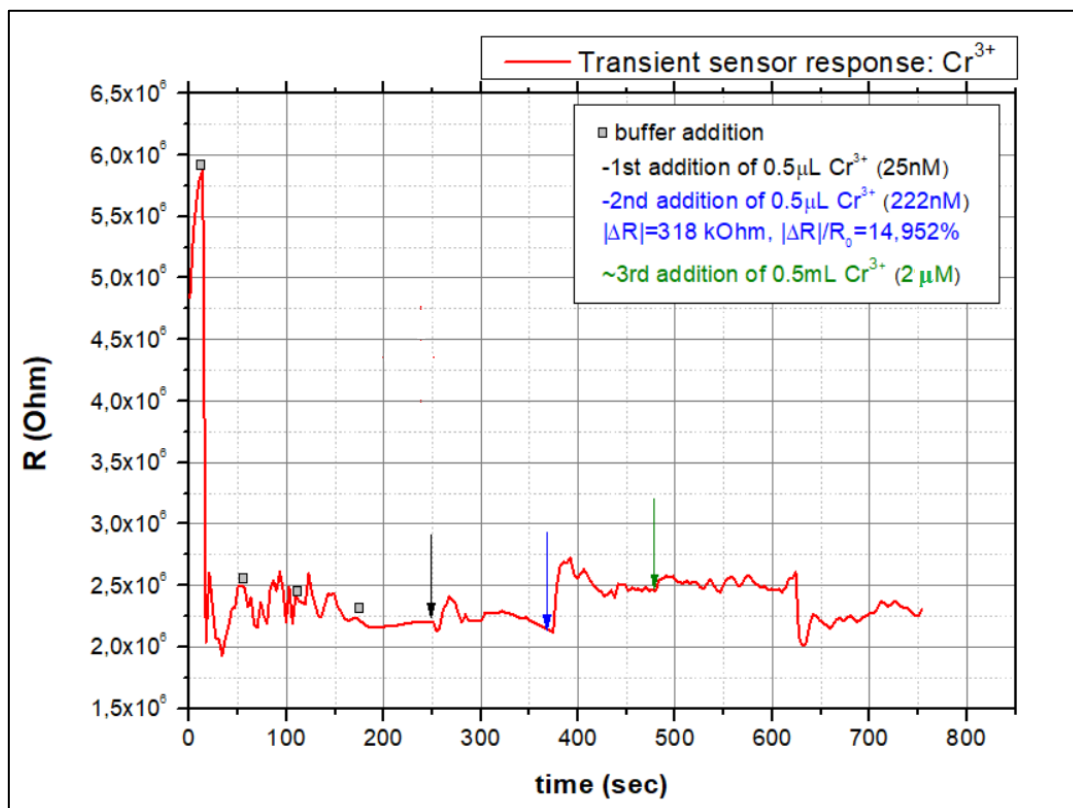


*Διάγραμμα 3.1: Δυναμική μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα μολύβδου. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Όριο ανίχνευσης: 28,6 nM.*

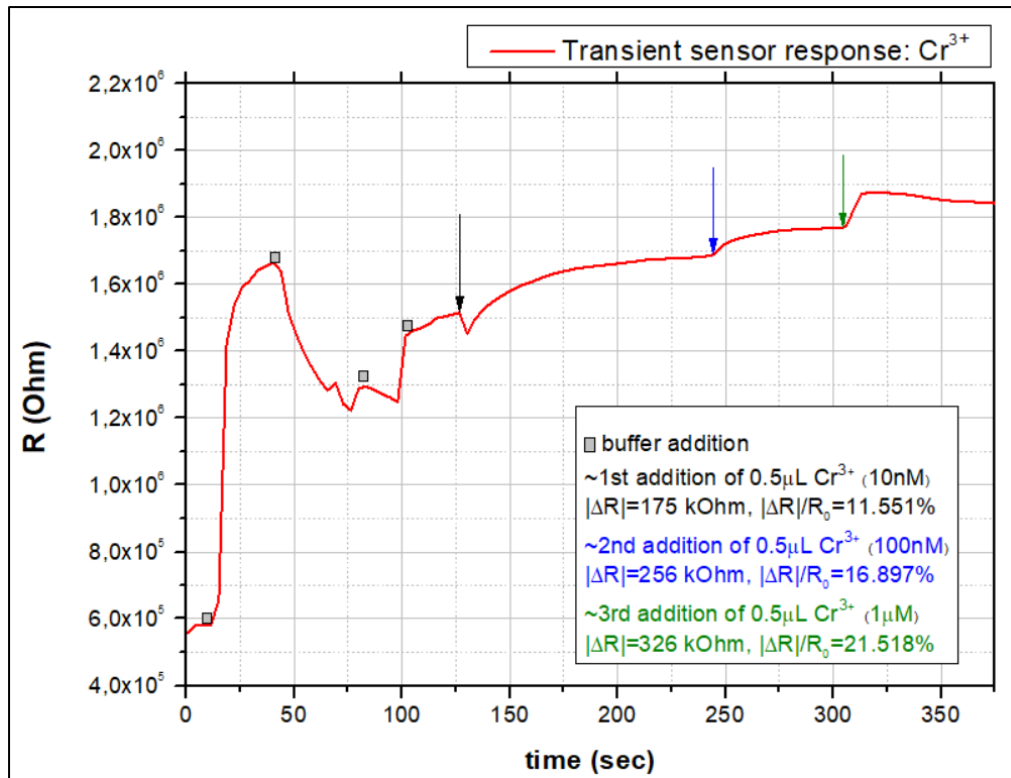
Όπως είναι εμφανές από τα διαγράμματα, η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στους αισθητήρες έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της αντίστασής τους, έως ότου επιτευχθεί νέα σταθερή τιμή της αντίστασης, συνήθως με ποσότητα buffer 3,5 µL. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος εμπλουτισμένου με δεδομένη συγκέντρωση ιόντων βαρέων μετάλλων ανιχνεύεται ως απότομη αύξηση της αντίστασης και στη συνέχεια σταθεροποίηση της τιμής της (step-up).



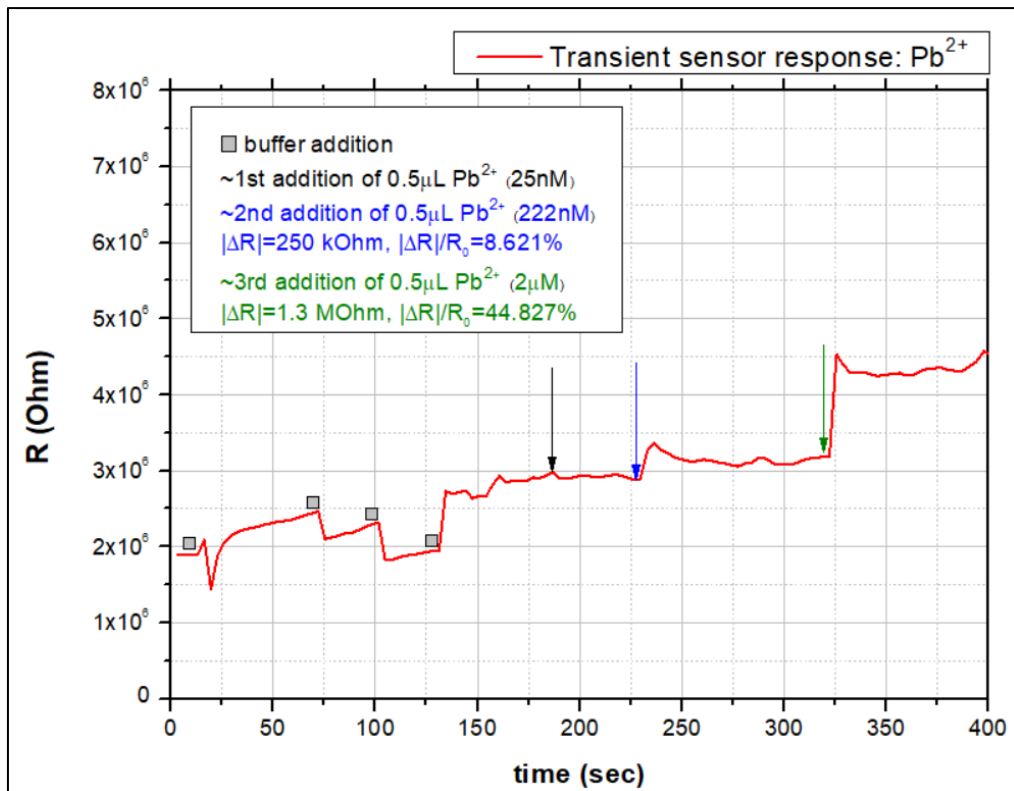
Διάγραμμα 3.2: Δυναμική μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα καδμίου. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Όριο ανίχνευσης: 25nM.



Διάγραμμα 3.3: Δυναμική μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα χρωμίου. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 222nM.

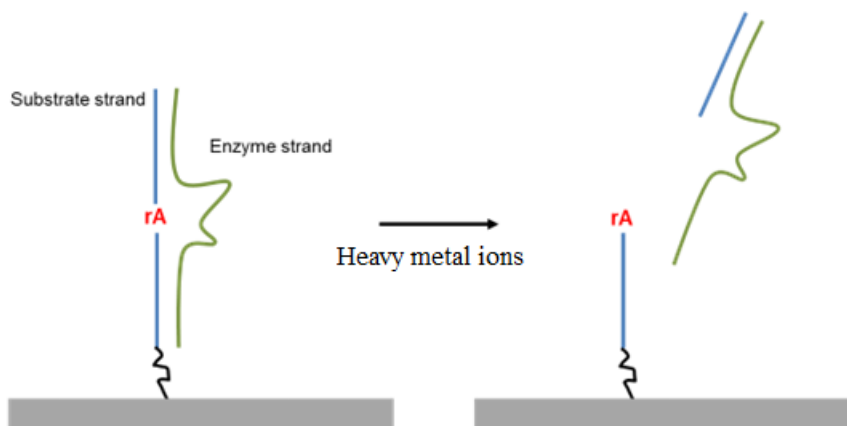


Διάγραμμα 3.4: Δυναμική μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πολυϊμιδίου με απόκριση σε ιόντα χρωμίου. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 10nM.

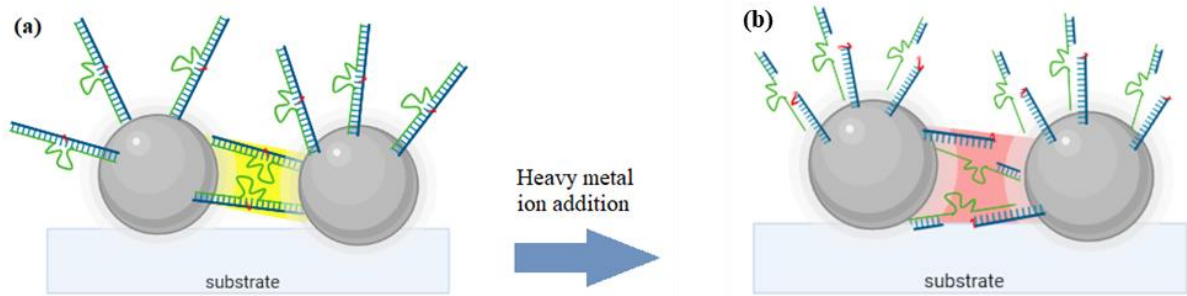


Διάγραμμα 3.5: Δυναμική μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα μολύβδου. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 222nM.

Οι μηχανισμοί αγωγιμότητας για φιλμ νανοσωματιδίων που εναποτίθενται μέσω sputtering περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 1.6, ενώ για αισθητήρες με επιφανειακή κάλυψη ακριβώς κάτω από το κατώφλι διήθησης έγινε εκτενής αναφορά στην ενότητα 2.8 της παρούσας εργασίας. Εν συντομία, ο μηχανισμός αγωγιμότητας διέπεται από κβαντομηχανικά φαινόμενα όπως το φαινόμενο σήραγγας ή/και φαινόμενα φόρτισης κ.λπ. Συνεπώς, οι διατάξεις που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία, εν προκειμένω οι βιοαισθητήρες, περιγράφονται επαρκώς από ένα μοντέλο θερμικά ενεργοποιούμενου φαινομένου σήραγγας τύπου Arrhenius που προσομοιάζει έναν ημιαγωγό. Η μεταφορά φορτίου στα μόρια DNA (εν προκειμένω ενζυματικού DNA) κατά μήκος της δίκλωνης έλικας, αλλά και στην περίπτωση μονόκλωνων μορίων, φαινόμενα που αναλύθηκαν στην ενότητα 1.7, οδηγεί σε αυξημένη αγωγιμότητα, όταν παρατηρείται στοίβαξή τους σε μορφή γεφύρωσης. Συνεπώς, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.4(a), τα DNAzymes ανάμεσα στα νανοσωματίδια καταφέρνουν να ενισχύσουν την αγωγιμότητα της συνολικής διάταξης λόγω των επιπλέον αγωγίμων μονοπατιών που δημιουργούν. Με τη χρήση ενζυματικού DNA, επιλεκτικού κάθε φορά προς ένα συγκεκριμένο μέταλλο και παρουσία ιόντων αυτού, τα DNAzymes αυτοκαταλύουν την υδρόλυση της ίδιας τους της αλυσίδας, σπάζοντάς την σε επιμέρους τμήματα. Μάλιστα, η βιολογική τροποποίηση των επιφανειών σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε κατόπιν αυτοκατάλυσης του δίκλωνου μορίου να απομακρύνεται όλη η ενζυματική αλυσίδα μαζί με ένα μέρος της αλυσίδας υποστρώματος. Όπως είναι αναμενόμενο, η αγωγίμη γέφυρα που δημιουργεί το DNAzyme καταρρέει επιλεκτικά παρουσία των ιόντων του εκάστοτε βαρέος μετάλλου, με αποτέλεσμα την αύξηση της μετρούμενης αντίστασης της διάταξης (Εικόνα 3.4 (b)). [58] [59]

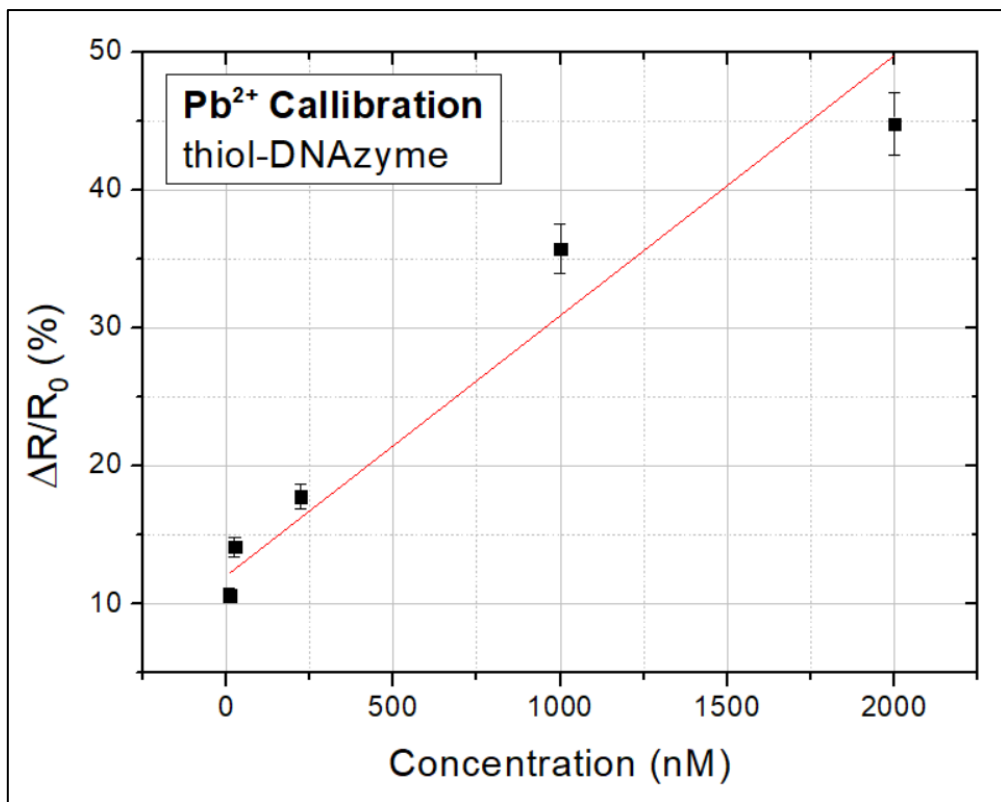


**Εικόνα 3.3:** Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου υδρόλυσης των DNAzymes παρουσία ιόντων επιλεγμένου βαρέος μετάλλου. Κατόπιν αυτοκατάλυσης του δίκλωνου μορίου, απομακρύνεται όλη η ενζυματική αλυσίδα μαζί με ένα μέρος της αλυσίδας υποστρώματος.

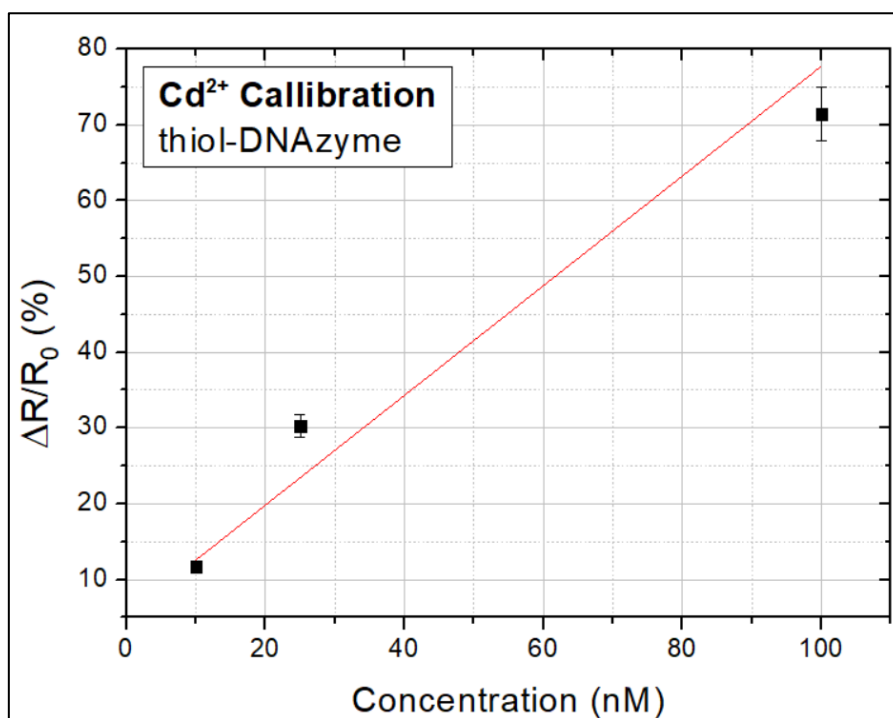


**Εικόνα 3.4:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού λειτουργίας των βιοαισθητήρων ανίχνευσης βαρέων μετάλλων, όπου φαίνεται η γεφύρωση των DNAzymes ανάμεσα στα νανοσωματίδια πλατίνας (Pt) (a). Οι αγώγιμες γέφυρες που δημιουργούν τα DNAzymes καταρρέουν επιλεκτικά παρουσία συγκεκριμένων ιόντων βαρέων μετάλλου, καθώς οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA τους σπάνε σε επιμέρους κομμάτια (b).

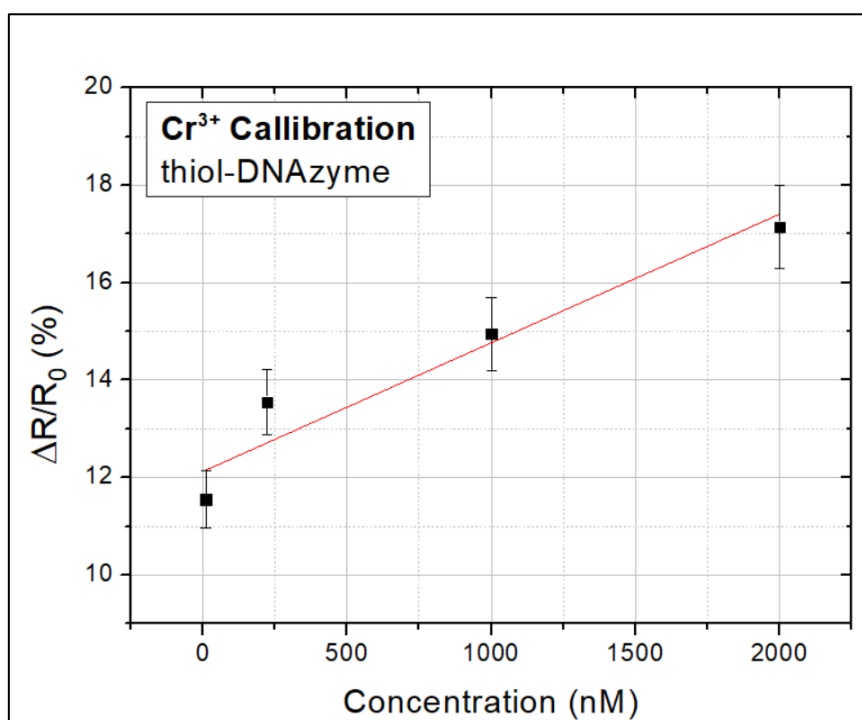
Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης των υπό μελέτη βιοαισθητήρων ανίχνευσης  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  και  $Cr^{3+}$ , για DNAzymes τροποποιημένα με ομάδες θειόλης και αμινομάδες, σε υποστρώματα πυριτίου. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν την αύξηση της αντίστασης των διατάξεων κατά την ανίχνευση -λόγω της διάσπασης της αλυσίδας υποστρώματος σε δύο μικρότερα τμήματα- σε σχετική μεταβολή της αντίστασης ( $\Delta R/R_0\%$ ).



**Διάγραμμα 3.6:** Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις  $Pb^{2+}$ . Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 10 nM. Ευαισθησία:  $0,01886 \pm 0,00313 \text{ nM}^{-1}$ .

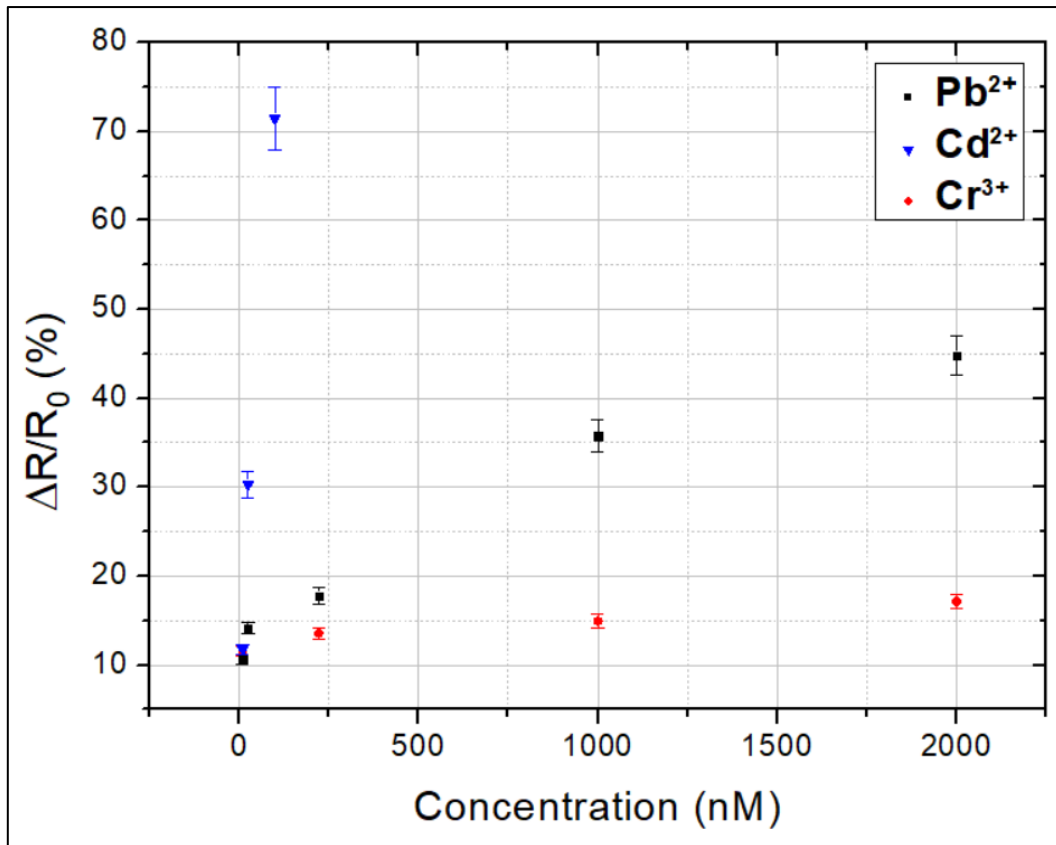


*Διάγραμμα 3.7: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Cd<sup>2+</sup>. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο αντίχενωσης: 10 nM. Ευαισθησία: 0,72382±0,19354 nM<sup>-1</sup>.*



*Διάγραμμα 3.8: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Cr<sup>3+</sup>. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο αντίχενωσης: 10 nM. Ευαισθησία: 0,00264±0,000565 nM<sup>-1</sup>.*

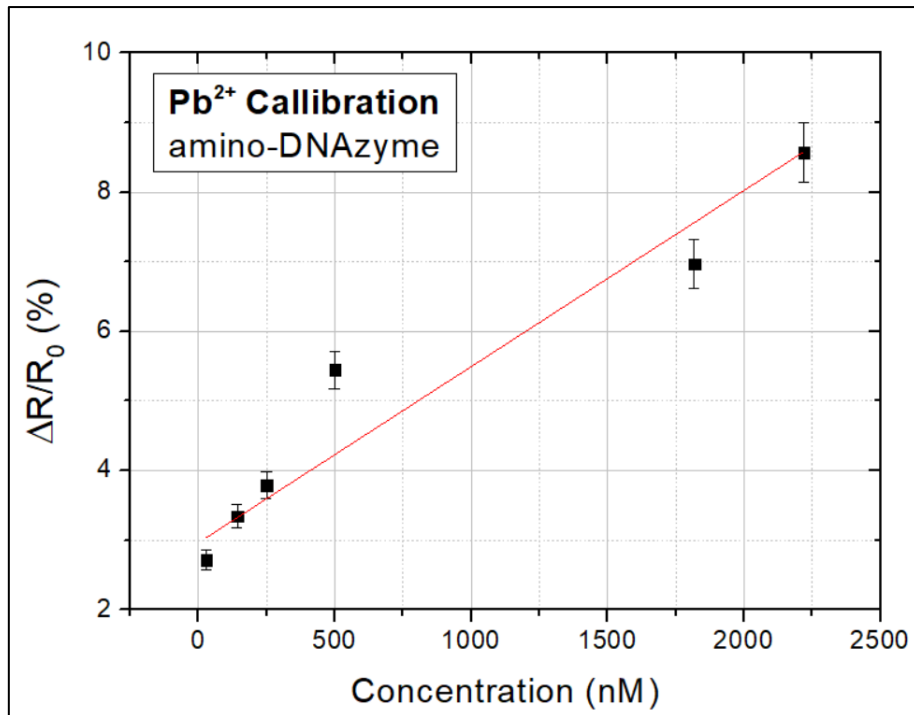




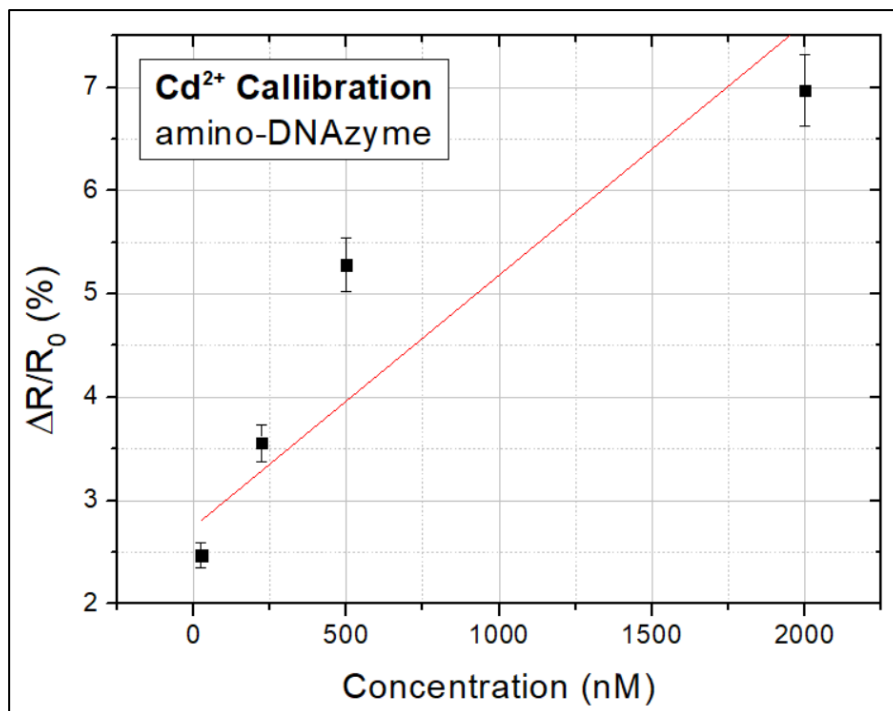
**Διάγραμμα 3.9:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα βαθμονόμησης αισθητήρων για ανίχνευση των τριών ειδών ιόντων βαρέων μετάλλων Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> και Cr<sup>3+</sup>. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης.

Για την τεχνική επιφανειακής τροποποίησης με ομάδες θειόλης, οι αισθητήρες διακρίνονται από όριο ανίχνευσης στα 10 nM για κάθε μέταλλο, ενώ παρουσιάζουν γραμμική απόκριση μεταξύ 10 nM και 2 μM για ιόντα μολύβδου και τρισθενούς χρωμίου και μεταξύ 10 nM και 100 nM για ιόντα καδμίου. Η ευαισθησία με την τυπική της απόκλιση για ιόντα μολύβδου υπολογίστηκε ίση με  $0,01886 \pm 0,00313 \text{ nM}^{-1}$ , για ιόντα καδμίου  $0,72382 \pm 0,19354 \text{ nM}^{-1}$  και για ιόντα τρισθενούς χρωμίου  $0,00264 \pm 0,000565 \text{ nM}^{-1}$ .

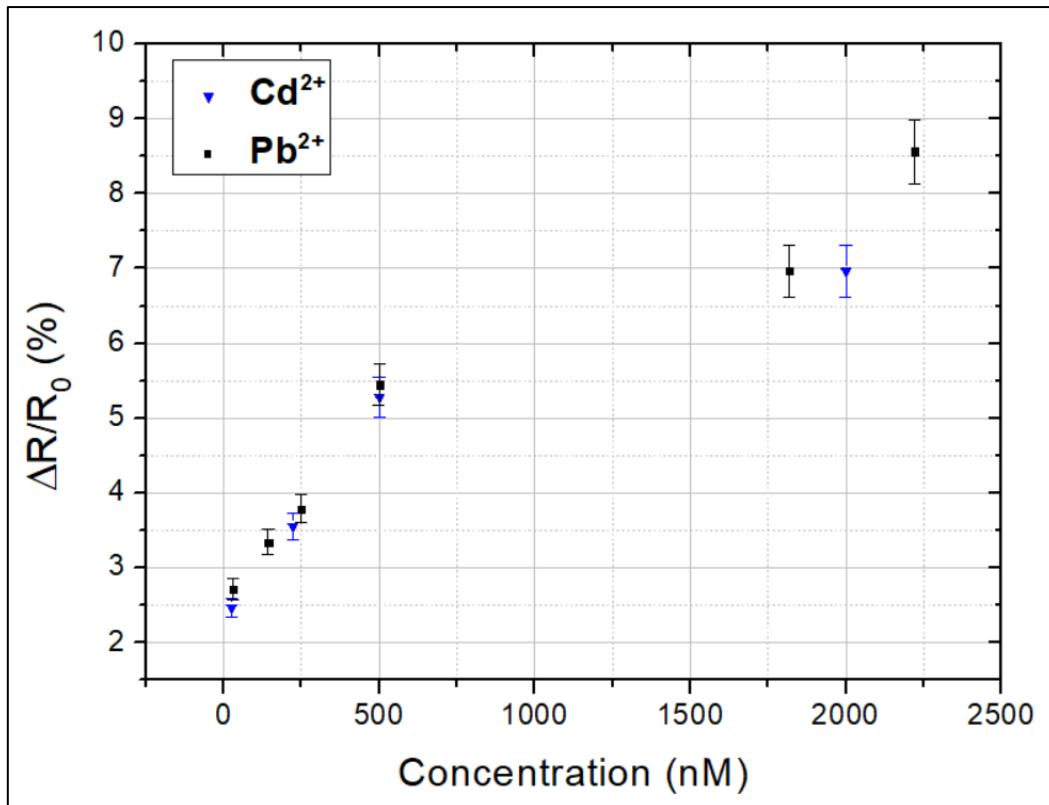
Για την τεχνική επιφανειακής τροποποίησης με αμινομάδες, οι αισθητήρες διακρίνονται από όρια ανίχνευσης στα 28,6 nM και 25 nM για ιόντα μολύβδου και καδμίου, αντίστοιχα, ενώ παρουσιάζουν γραμμική απόκριση μεταξύ 25 nM και 2 μM. Η ευαισθησία για ιόντα μολύβδου υπολογίστηκε στα 0,253% και για ιόντα καδμίου  $0,72382 \pm 0,19354 \text{ nM}^{-1}$  στα 0,244%, με τυπικές αποκλίσεις 0,0004% και 0,0008%, αντίστοιχα. Ανίχνευση τρισθενούς χρωμίου με τη συγκεκριμένη τεχνική κατάφερε να γίνει μόνο στα 222 nm με  $\Delta R/R_0\%$  ίσο με 1,828%, συνεπώς δεν υπήρχαν επαρκή δεδομένα για βαθμονόμηση αισθητήρων και στα συγκεκριμένα ιόντα μετάλλου.



*Διάγραμμα 3.10: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Pb<sup>2+</sup>. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Όριο ανίχνευσης: 28,6 nM. Ευαισθησία: 0,00253±0,000407nM<sup>-1</sup>.*



*Διάγραμμα 3.11: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Cd<sup>2+</sup>. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Όριο ανίχνευσης: 25 nM. Ευαισθησία: 0,00244±0,000805 nM<sup>-1</sup>.*

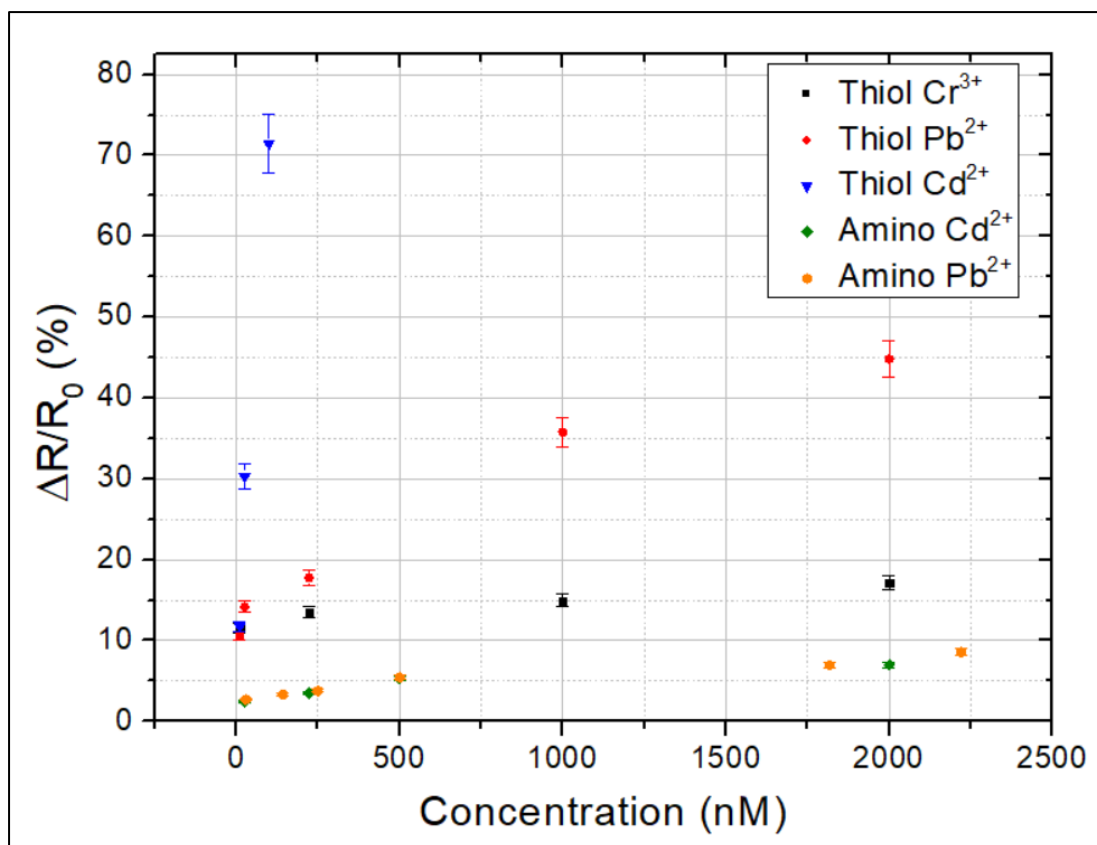


**Διάγραμμα 3.12:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα βαθμονόμησης αισθητήρων για ανίχνευση δύο ειδών ιόντων βαρέων μετάλλων  $\text{Pb}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$ . Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες.

Πρέπει να σημειωθεί πως πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατασκευής βιοαισθητήρων με επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης και σε εύκαμπτα υποστρώματα πολυϊμιδίου (Karton). Ωστόσο το δείγμα των chips που μετρήθηκαν ήταν μικρό και κατά συνέπεια δεν μπορούν να εξαχθούν καμπύλες βαθμονόμησης. Ωστόσο, ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας αντιστοίχισης του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection) και της απόκρισης  $\Delta R/R_0\%$  στα τρία είδη ιόντων μετάλλου.

Μέταλλο Ανίχνευσης	Συγκέντρωση (nM)	( $\Delta R/R_0$ )%
$\text{Cr}^{3+}$	10	11,551
$\text{Cd}^{2+}$	25	8,878
$\text{Pb}^{2+}$	2000	43,750

**Πίνακας 3.1:** Συγκεντρωτικός πίνακας αντιστοίχισης του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection) και της απόκρισης  $\Delta R/R_0\%$  στα τρία είδη ιόντων μετάλλου για υποστρώματα Karton. Η επιφανειακή τροποποίηση έχει πραγματοποιηθεί με ομάδες θειόλης.



**Διάγραμμα 3.13:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα βαθμονόμησης αισθητήρων για ανίχνευση των τριών ειδών ιόντων βαρέων μετάλλων  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  και  $Cr^{3+}$  για κάθε περίπτωση επιφανειακής τροποποίησης.

Όπως είναι εμφανές από τα διαγράμματα, η τροποποίηση των DNAzymes με διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες έχει επίδραση στην απόδοση των αισθητήρων. Συγκεκριμένα, τα τροποποιημένα με ομάδες θειόλης DNAzymes παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτά που έχουν τροποποιηθεί με αμινομάδες. Γενικώς, τα νανοσωματίδια πλατίνας παρουσιάζουν υψηλή βιο-συμβατότητα με μία πληθώρα βιοϋλικών και υπάρχουν πολλές αναφορές για την πετυχημένη ακινητοποίηση βιολογικών μορίων σε αυτά, με επιφανειακή τροποποίηση τόσο με χρήση αμινομάδων [60], αλλά και ομάδων θειόλης [61]. Μία πρώτη εξήγηση που προκύπτει από τη βιβλιογραφία, βασίζεται στη δημιουργία ισχυρότερων δεσμών μεταξύ των χαρακτηριστικών ομάδων θειόλης με μεταλλικά νανοσωματίδια, όπως αυτά της πλατίνας. [18] Επομένως, η καλύτερη ποιότητα δεσμών μπορεί να βελτιώσει τη μεταφορά φορτίου κατά τη γεφύρωση των DNAzymes ανάμεσα στα νανοσωματίδια, άρα και να την επηρεάσει σε μεγαλύτερο βαθμό κατά την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση πολλών επιφανειακών λειτουργικών στρωμάτων για την ακινητοποίηση των τροποποιημένων με αμινομάδες DNAzymes φαίνεται ότι επίσης έχει επίδραση στην αγωγιμότητα της διάταξης. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 2.7.7, το πρωτόκολλο για αυτή την περίπτωση τροποποίησης, επιτάσσει μόρια αμινοσιλανίου APTES να ακινητοποιούνται αρχικά ώστε να ακολουθήσει ο ομοιοπολικός δεσμός του με τη γλουταραλδεΐδη και τελικά με τους κλώνους DNA-υποστρώματος μέσω καρβονυλικών ομάδων. Μία τέτοια διαδικασία, μπορεί μιν να ενισχύει τους δεσμούς μεταξύ αμινομάδων και νανοσωματιδίων, ωστόσο ταυτόχρονα φαίνεται να διαταράσσει τη μεταφορά φορτίου, καθώς εξαναγκάζει τους φορείς αγωγιμότητας να διέλθουν μέσω πρόσθετων ακινητοποιημένων χημικών ομάδων και δεσμών μεταξύ των στιβάδων τους. Συμπερασματικά, στην περίπτωση των τροποποιημένων με ομάδες θειόλης DNAzymes, εκτός από τη βελτιωμένη απόκριση ανίχνευσης, αξιοσημείωτη είναι η πολύ απλούστερη διεργασία κατασκευής αντίστοιχων αισθητήρων και ο σημαντικά ελαττωμένος χρόνος προετοιμασίας σε σχέση με το πρωτόκολλο ακινητοποίησης τροποποιημένων με αμινομάδες DNAzymes. Ως εκ τούτου, το πρωτόκολλο με την ενσωμάτωση ομάδων θειόλης κρίνεται κι εξαιρετικά οικονομικότερο για τέτοιου τύπου βιοαισθητήρες.

Τέλος, η ακινητοποίηση των DNAzymes με διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες πραγματοποιείται σε διαφορετικά σημεία της επιφάνειας των βιοαισθητήρων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των DNAzymes με αμινομάδες, η τροποποίηση είναι τέτοια ώστε η πρόσδεση του DNA να γίνεται σε όλη την ενεργοποιημένη από το πλάσμα επιφάνεια του υποστρώματος διοξειδίου του πυριτίου και κατά συνέπεια, τα βιολογικά μόρια παρεμβάλλονται ανάμεσα σε γειτονικά νανοσωματίδια και τις νανοσωματιδιακές συσσωματώσεις τους. Αντίθετα, για τα τροποποιημένα με ομάδες θειόλης DNAzymes, οι διεργασίες που ακολουθούνται οδηγούν στην ακινητοποίηση του ενζυματικού DNA μόνο πάνω στο υμένιο των νανοσωματιδίων πλατίνας. Σε κάθε περίπτωση, η εισαγωγή των τριών στόχων ιόντων βαρέων μετάλλων οδηγεί σε αύξηση της αντίστασης, η σχετική διαφορά της οποίας υπερτερεί στα DNAzymes θειόλης. Είναι πιθανό στα DNAzymes αμίνης, η ύπαρξη διασκορπισμένων μορίων DNA σε όλη την επιφάνεια των IDEs των αισθητήρων, τα οποία σπάνε σε μονόκλωνες αλυσίδες κατά την εισαγωγή του μετάλλου-στόχου, να εμποδίζει την απρόσκοπτη μεταφορά φορτίου εξαιτίας του φορτίου του μονόκλωνου DNA. Το μονόκλωνο DNA αποτελεί ένα αρνητικά φορτισμένο βιομόριο που μπορεί να λειτουργήσει ως φίλτρο στη διέλευση φορέων αγωγιμότητας και να διακόψει τη μεταφορά φορτίου σε όλο το φιλμ

νανοσωματιδίων μέσω φαινομένων επίδρασης πεδίου (Field-Effect). Πρόκειται για παρόμοιο φαινόμενο με αυτό που παρατηρείται σε βιοαισθητήρες τύπου FET (FET-biosensors)[62]. Ωστόσο, ο κυρίαρχος μηχανισμός μεταφοράς φορτίου παραμένει η γεφύρωση μέσω δίκλωνων DNAzymes, εξού και ο κοινός τρόπος απόκρισης και στις δύο τεχνικές ακινητοποίησης με αύξηση της αντίστασης κατά την ανίχνευση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα και προοπτικές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάστηκε η κατασκευή ενός υβριδικού τύπου ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα σε νανοσωματίδια πλατίνας/DNAzymes για την ανίχνευση τριών μεταλλικών ιόντων ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  και  $Cr^{3+}$ ). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [64] [65] [66] [67], υπάρχουν μέχρι στιγμής λίγες διατάξεις που ενσωματώνουν τα DNAzymes και εξετάζουν την επιτυχή ανίχνευση ιόντων  $Cr^{3+}$  με τη χρήση αισθητήρων, ανεξάρτητα από την επιλογή της αρχής ανίχνευσης. Ο αισθητήρας βασίζεται στο συνδυασμό ευγενών μεταλλικών νανοσωματιδίων (πλατίνα) και επιφανειακή ακινητοποίηση DNAzymes. Ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με χρήση καταλυτικών αλυσίδων DNA, ειδικά τροποποιημένων ώστε να ανιχνεύουν συγκεκριμένα ιόντα βαρέων μετάλλων, που μπορούν να συνδεθούν στην επιφάνεια του αισθητήρα μέσω δύο διαφορετικών χαρακτηριστικών ομάδων που χρησιμοποιούνται συχνά στη βιβλιογραφία, δηλαδή λειτουργικές ομάδες θειόλης και αμίνης. Ο βιοαισθητήρας κατάφερε να ανιχνεύσει και τα τρία ιόντα βαρέων μετάλλων σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις που βρίσκονται κάτω από τα επιτρεπόμενα επίπεδα στο νερό της βρύσης και για τις δύο ομάδες τροποποίησης. [68] Ωστόσο, για τα DNAzymes τροποποιημένα με ομάδες θειόλης, τα αποτελέσματά έδειξαν ότι η άμεση προσκόλληση των καταλυτικών DNA στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων οδηγεί σε αισθητήρες που σε μεγάλο βαθμό υπερτερούν έναντι των αισθητήρων που χρησιμοποιούν DNAzymes τροποποιημένα με ομάδες αμίνης. Χρησιμοποιήθηκε μια πιο σύνθετη τεχνική επιφανειακής τροποποίησης για την ενίσχυση της δύναμης πρόσδεσης των αμινο-τροποποιημένων DNAzymes στην επιφάνεια των αισθητήρων, ωστόσο οι αισθητήρες που ενσωματώνουν τροποποιημένα με θειόλη DNAzymes υπερτερούν έναντι των αντίστοιχων αμινομάδων, ενώ ταυτόχρονα προσφέρουν μια πολύ απλούστερη, σύντομη και συνεπώς οικονομικά αποδοτική διαδικασία κατασκευής.

Συνολικά, οι αισθητήρες αποδείχθηκαν αξιόπιστοι, με καλή ευαισθησία, ακρίβεια και επαρκές δυναμικό εύρος που μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω, αν χρειαστεί, για την ανίχνευση πρόσθετων περιβαλλοντικών ρύπων, όπως τα ιόντα υδραργύρου και εξασθενούς χρωμίου. Παράλληλα, οι βιοαισθητήρες προσφέρουν απλή οργανολογία μέτρησης για την ανίχνευσης, δηλαδή μέτρησης αντίστασης της διάταξης υπό χαμηλή πόλωση (1V). Αυτό αναδεικνύει περαιτέρω την απλότητα και την αξία της διάταξης,

ενώ οι ιδιότητες χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας μαζί με την εύκολη αυτοματοποίησή της την καθιστούν κατάλληλη για απομακρυσμένα και αυτόνομα συστήματα περιβαλλοντικής παρακολούθησης, προχωρώντας στην εποχή του Internet of Things.

Μελλοντικές προοπτικές περιλαμβάνουν την επανεξέταση των πρωτοκόλλων ακινητοποίησης των βιοϋλικών, ώστε να διευκολυνθεί περαιτέρω η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της διάταξης. Επιπλέον, απαιτείται βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ακινητοποίησης των τροποποιημένων με ομάδες αμίνης DNAzymes, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ευαισθησία και υψηλότερη επιλεκτικότητα. Ακόμη, ενδείκνυται η μέτρηση όλων των αισθητήρων να πραγματοποιείται εντός μικροροϊκών συστημάτων για καλύτερο έλεγχο των πειραματικών παραμέτρων. Επίσης, θα ήταν δόκιμο να μελετηθούν περαιτέρω τέτοιου τύπου βιοαισθητήρες σε εύκαμπτα υποστρώματα πολυϊμιδίου (Kapton), λόγω του έντονου τεχνολογικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν και των προοπτικών εφαρμογών τους. Συνεπώς, συνολικά υπάρχει ερευνητικό περιθώριο για βελτιστοποίηση του yield τέτοιου τύπου διατάξεων, που γενικώς παρουσιάζουν μια αστάθεια λόγω της ενσωμάτωσης πολλών βιολογικών και χημικών μορίων.

Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη η ενσωμάτωση 2-D υλικών, όπως το διθειούχο μολυβδένιο, στις διατάξεις των αισθητήρων, τόσο σε υποστρώματα πυριτίου όσο και σε πολυϊμιδίου. Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί ήδη στη εργαστήριο, το διθειούχο μολυβδένιο αποδείχτηκε πως είναι ικανό να ανιχνεύσει ιόντα βαρέων μετάλλων, με μικρή ωστόσο επιλεκτικότητα. Η ενσωμάτωσή του στις διατάξεις που κατασκευάστηκαν για την παρούσα εργασία, είτε χωρίς νανοσωματίδια, είτε με νανοσωματίδια πλατίνας με την προοπτική λειτουργίας ως FET biosensor, αποκαλύπτει μια πληθώρα προοπτικών για πολύ πιο ευαίσθητη και επιλεκτική ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων.



## Βιβλιογραφία

1. Javaid Mohd, Abid Haleem, Shanay Rab, Ravi Pratap Singh and Rajiv Suman. "Sensors for daily life: A review." *Sensors International* 2 (2021): 100121.
2. Vetelino John and Aravind Reghu. *Introduction to sensors*. CRC press, 2017.
3. Gardner Julian W., Vijay K. Varadan and Osama O. Awadelkarim. *Microsensors, MEMS, and smart devices*. Wiley, 2001.
4. Δημήτρης Τσουκαλάς, «Απόσπασμα Σημειώσεων του Μεταπτυχιακού Μαθήματος "Μίκρο-Νανοαισθητήρες",» Αθήνα, 2010.
5. Bryzek Janusz. "Impact of MEMS technology on society." *Sensors and Actuators A: Physical* 56, no. 1-2 (1996): 1-9.
6. Jan Korvink, Oliver Paul. *MEMS: A Practical Guide to Design, Analysis, and Applications*, William Andrew, Inc., 2006.
7. Wilson Jon S. *Sensor technology handbook*. Elsevier, 2004.
8. Fraden Jacob. *Handbook of modern sensors: physics, designs, and applications*. Vol. 3. New York: springer, 2010.
9. Naresh Varnakavi and Nohyun Lee. "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors." *Sensors* 21, no. 4 (2021): 1109.
10. Roduner Emil. "Size matters: why nanomaterials are different." *Chemical society reviews* 35, no. 7 (2006): 583-592.
11. Buzea Cristina, Ivan I. Pacheco and Kevin Robbie. "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity." *Biointerphases* 2, no. 4 (2007): MR17-MR71.
12. Klabunde Kenneth J. and Ryan M. Richards, eds. *Nanoscale materials in chemistry*. John Wiley & Sons, 2009.
13. Hassellöv Martin, James W. Readman, James F. Ranville and Karen Tiede. "Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles." *Ecotoxicology* 17 (2008): 344-361.
14. Zabet-Khosousi Amir and Al-Amin Dhirani. "Charge transport in nanoparticle assemblies." *Chemical reviews* 108, no. 10 (2008): 4072-4124.
15. Genereux Joseph C. and Jacqueline K. Barton. "Mechanisms for DNA charge transport." *Chemical reviews* 110, no. 3 (2010): 1642-1662.
16. Porath Danny, Alexey Bezryadin, Simon De Vries and Cees Dekker. "Direct measurement of electrical transport through DNA molecules." *Nature* 403, no. 6770 (2000): 635-638.
17. Giese Bernd. "Electron transfer in DNA." *Current opinion in chemical biology* 6, no. 5 (2002): 612-618.
18. Sebechlebská Táňa, Viliam Kolivoška, Jakub Šebera, Jiří Fukal, David Řeha, Miloš Buděšínský, Ivan Rosenberg et al. "Additive transport in DNA molecular circuits." *Journal of Materials Chemistry C* 10, no. 33 (2022): 12022-12031.
19. Wang Kun. "DNA-based single-molecule electronics: from concept to function." *Journal of functional biomaterials* 9, no. 1 (2018): 8.
20. Plummer James D. *Silicon VLSI technology: fundamentals, practice and modeling*. Pearson Education India, 2009.
21. Adachi Hideaki and Kiyotaka Wasa. "Thin films and nanomaterials." *Handbook of Sputter Deposition Technology: Fundamentals and Applications for Functional Thin Films, Nano-Materials and MEMS*, (2012): 3-39.

22. Depla Diederik, Stijn Mahieu and J. E. Greene. "Sputter deposition processes." In Handbook of deposition technologies for films and coatings, pp. 253-296. William Andrew Publishing, 2010.
23. Tudose Ioan Valentin, Florin Comanescu, Petronela Pascariu, Stefan Bucur, Laurentiu Rusen, Felicia Iacomi, Emmanuel Koudoumas and Mirela Petruta Suchea. "Chemical and physical methods for multifunctional nanostructured interface fabrication." Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications (2019): 15-26.
24. Mattox Donald M. "Physical sputtering and sputter deposition (sputtering)." Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing (2010): 237-286.
25. Smentkowski Vincent S. "Trends in sputtering." Progress in Surface Science 64, no. 1-2 (2000): 1-58.
26. Farnsworth H. E. "A Simple Contamination-Free Electron Gun." Review of Scientific Instruments 21, no. 1 (1950): 102-102.
27. Jijakli Kenan, Basel Khraiweh, Weiqi Fu, Liming Luo, Amnah Alzahmi, Joseph Koussa, Amphun Chaiboonchoe, Serdal Kirmizialtin, Laising Yen and Kourosh Salehi-Ashtiani. "The in vitro selection world." Methods 106 (2016): 3-13.
28. Aguirre Sergio D., M. Monsur Ali, Bruno J. Salena and Yingfu Li. "A sensitive DNA enzyme-based fluorescent assay for bacterial detection." Biomolecules 3, no. 3 (2013): 563-577.
29. Breaker Ronald R. and Gerald F. Joyce. "A DNA enzyme that cleaves RNA." Chemistry & biology 1, no. 4 (1994): 223-229.
30. Carmi Nir, Shameelah R. Balkhi and Ronald R. Breaker. "Cleaving dna with dna." Proceedings of the National Academy of Sciences 95, no. 5 (1998): 2233-2237.
31. Sreedhara Alavattam, Yingfu Li and Ronald R. Breaker. "Ligating DNA with DNA." Journal of the American Chemical Society 126, no. 11 (2004): 3454-3460.
32. Li Yingfu and Ronald R. Breaker. "Phosphorylating DNA with DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences 96, no. 6 (1999): 2746-2751.
33. Li Yingfu and Dipankar Sen. "A catalytic DNA for porphyrin metallation." Nature Structural Biology 3, no. 9 (1996): 743-747.
34. Gysbers Rachel, K. T. Tram, Sepehr Manochchery, Dingran Chang and Yingfu Li. "Selection and application of catalytically active oligonucleotides." Aptamers; Pan Stanford: Boca Raton, FL, USA (2016): 75-112.
35. Kruger Kelly, Paula J. Grabowski, Arthur J. Zaug, Julie Sands, Daniel E. Gottschling and Thomas R. Cech. "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." cell 31, no. 1 (1982): 147-157.
36. Liu Juewen, Zehui Cao and Yi Lu. "Functional nucleic acid sensors." Chemical reviews 109, no. 5 (2009): 1948-1998.
37. Tram Kha, Pushpinder Kanda and Yingfu Li. "Lighting up RNA-cleaving DNAzymes for biosensing." Journal of Nucleic Acids 2012 (2012).
38. Jenne Andreas, Walter Gmelin, Nikolai Raffler and Michael Famulok. "Real-Time Characterization of Ribozymes by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)." Angewandte Chemie International Edition 38, no. 9 (1999): 1300-1303.
39. Vikesland, Peter J. "Nanosensors for water quality monitoring." Nature nanotechnology 13, no. 8 (2018): 651-660.
40. Bruning-Fann Colleen S. and J. B. Kaneene. "The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review." Veterinary and human toxicology 35, no. 6 (1993): 521-538.

41. Davis Timothy W., Matthew J. Harke, M. Alejandra Marcoval, Jennifer Goleski, Celia Orano-Dawson, Dianna L. Berry and Christopher J. Gobler. "Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms." *Aquatic Microbial Ecology* 61, no. 2 (2010): 149-162.
42. Wang Hao, Anna K. Engstrom and Zhengui Xia. "Cadmium impairs the survival and proliferation of cultured adult subventricular neural stem cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases." *Toxicology* 380 (2017): 30-37.
43. Ni H. J., F. F. Liu, X. Liang, Y. L. Yin and G. Liu. "The role of zinc chelate of hydroxy analogue of methionine in cadmium toxicity: effects on cadmium absorption on intestinal health in piglets." *animal* 14, no. 7 (2020): 1382-1391.
44. Ma Huanhuan, Feng Gao, Xiaoxian Zhang, Bingjian Cui, Yuan Liu and Zhongyang Li. "Formation of iron plaque on roots of *Iris pseudacorus* and its consequence for cadmium immobilization is impacted by zinc concentration." *Ecotoxicology and environmental safety* 193 (2020): 110306.
45. Verstraeten Sandra V., Lucila Aimo and Patricia I. Oteiza. "Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity." *Archives of toxicology* 82 (2008): 789-802.
46. Kang Wenjing, Xing Pei, Cory A. Rusinek, Adam Bange, Erin N. Haynes, William R. Heineman and Ian Papautsky. "Determination of lead with a copper-based electrochemical sensor." *Analytical chemistry* 89, no. 6 (2017): 3345-3352.
47. Cui Lin, Jie Wu and Huangxian Ju. "Electrochemical sensing of heavy metal ions with inorganic, organic and bio-materials." *Biosensors and Bioelectronics* 63 (2015): 276-286.
48. Dahaghin Zohreh, Hassan Zavvar Mousavi and S. Maryam Sajjadi. "A novel magnetic ion imprinted polymer as a selective magnetic solid phase for separation of trace lead (II) ions from agricultural products, and optimization using a Box–Behnken design." *Food Chemistry* 237 (2017): 275-281.
49. Xie Xiyue, Yaqin Chai, Yali Yuan and Ruo Yuan. "Dual triggers induced disassembly of DNA polymer decorated silver nanoparticle for ultrasensitive electrochemical Pb<sup>2+</sup> detection." *Analytica Chimica Acta* 1034 (2018): 56-62.
50. Lin Yang-Wei, Chi-Wei Liu and Huan-Tsung Chang. "Fluorescence detection of mercury (II) and lead (II) ions using aptamer/reporter conjugates." *Talanta* 84, no. 2 (2011): 324-329.
51. Standeven Andrew M. and Karen E. Wetterhahn. "Chromium (VI) toxicity: uptake, reduction, and DNA damage." *Journal of the American College of Toxicology* 8, no. 7 (1989): 1275-1283.
52. Beyersmann Detmar and Andrea Hartwig. "Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms." *Archives of toxicology* 82 (2008): 493-512.
53. Anderson, R. A. "The role of GTF in human body as nutrition." *Regul Toxicol Pharmacol* 26 (1997): 534-541.
54. Wan Zhuo, Zhangrun Xu and Jianhua Wang. "Flow injection on-line solid phase extraction for ultra-trace lead screening with hydride generation atomic fluorescence spectrometry." *Analyst* 131, no. 1 (2006): 141-147.
55. Akash K. Thirumala, R. S. Upendra, K. Samvrudhi and Mohammed Riyaz Ahmed. "Design of IOT Enabled Integrative Biosensor to Detect Toxic Heavy Metal Contaminants in Water Reservoirs." *Water and Energy International* 65, no. 8 (2022): 21-27.

56. E. Aslanidis, E. Skotadis, C. Panagopoulou, A. Rapesi, G. Tzourmana, G. Tsekenis, D. Tsoukalas. Nanoparticle/DNAzyme based biosensors for heavy-metal ion detection: Effect of DNAzyme surface modifications on device sensitivity 3rd International Electronic Conference on Biosensors
57. Khan Shadman, Brenda Burciu, Carlos DM Filipe, Yingfu Li, Kristen Dellinger and Tohid F. Didar. "DNAzyme-based biosensors: immobilization strategies, applications, and future prospective." *ACS nano* 15, no. 9 (2021): 13943-13969.
58. Skotadis Evangelos, Konstantinos Voutyras, Marianneza Chatzipetrou, Georgios Tsekenis, Lampros Patsiouras, Leonidas Madianos, Stavros Chatzandroulis, Ioanna Zergioti and Dimitris Tsoukalas. "Label-free DNA biosensor based on resistance change of platinum nanoparticles assemblies." *Biosensors and Bioelectronics* 81 (2016): 388-394.
59. Skotadis Evangelos, Georgios Tsekenis, Marianneza Chatzipetrou, Lampros Patsiouras, Leonidas Madianos, Panagiotis Bousoulas, Ioanna Zergioti and Dimitris Tsoukalas. "Heavy metal ion detection using DNAzyme-modified platinum nanoparticle networks." *Sensors and Actuators B: Chemical* 239 (2017): 962-969.
60. Ramakrishnan Sathish Kumar, Marta Martin, Thierry Cloitre, Lucyna Firlej and Csilla Gergely. "Design rules for metal binding biomolecules: understanding of amino acid adsorption on platinum crystallographic facets from density functional calculations." *Physical Chemistry Chemical Physics* 17, no. 6 (2015): 4193-4198.
61. Kwon Donghoon, Wonjae Lee, Wuseok Kim, Hojin Yoo, Ho-Chul Shin and Sangmin Jeon. "Colorimetric detection of penicillin antibiotic residues in pork using hybrid magnetic nanoparticles and penicillin class-selective, antibody-functionalized platinum nanoparticles." *Analytical Methods* 7, no. 18 (2015): 7639-7645.
62. Syu Yu-Cheng, Wei-En Hsu and Chih-Ting Lin. "Field-effect transistor biosensing: Devices and clinical applications." *ECS Journal of Solid State Science and Technology* 7, no. 7 (2018): Q3196.
63. Zhu Longjiao, Miao Miao, Xiangli Shao, Zaihui Du, Kunlun Huang, Yunbo Luo and Wentao Xu. "A universal electrochemical biosensor using nick-HCR nanostructure as molecular gate of nanochannel for detecting chromium (III) ions and microRNA." *Analytical chemistry* 91, no. 23 (2019): 14992-14999.
64. Zhou Wenhui, Mahsa Vazin, Tianmeng Yu, Jinsong Ding and Juewen Liu. "In vitro selection of chromium-dependent DNAzymes for sensing chromium (III) and chromium (VI)." *Chemistry—A European Journal* 22, no. 28 (2016): 9835-9840.
65. Wu Xiaotong, Lei Tan, Yuling Li, Wanqiong Liu, Zhihua Peng, Yanshan Dong, Zeyu Huang, Lin Zhang and Yong Liang. "Novel sensor array distinguishes heavy metal ions based on multiple fluorescence channels from dendritic mesoporous silica nanoparticles." *Analytica Chimica Acta* 1240 (2023): 340749.
66. Zhang Yuan, Tianxiang Xue, Liangfen Cheng, Jiayi Wang, Ruitao Shen and Juan Zhang. "Smartphone-assisted colorimetric biosensor for on-site detection of Cr<sup>3+</sup> ion analysis." *Analytica Chimica Acta* 1199 (2022): 339603.
67. Dettori Marco, Antonella Arghittu, Giovanna Deiana, Paolo Castiglia and Antonio Azara. "The revised European Directive 2020/2184 on the quality of water intended for human consumption. A step forward in risk assessment, consumer safety and informative communication." *Environmental Research* 209 (2022): 112773.
68. Quinn Aidan J. and Gareth Redmond. "Artificial atom solids based on metal nanocrystals: Formation and electrical properties." *Progress in solid state chemistry* 33, no. 2-4 (2005): 263-277.

69. Quinn Aidan J., Paul Beecher, Daniela Iacopino, Liam Floyd, Gianluca De Marzi, Elena V. Shevchenko, Horst Weller and Gareth Redmond. "Manipulating the charging energy of nanocrystal arrays." *Small* 1, no. 6 (2005): 613-618.
70. Ma Lingzi and Juewen Liu. "Catalytic nucleic acids: biochemistry, chemical biology, biosensors, and nanotechnology." *Iscience* 23, no. 1 (2020): 100815.
71. Aslanidis Evangelos, Evangelos Skotadis and Dimitris Tsoukalas. "Resistive crack-based nanoparticle strain sensors with extreme sensitivity and adjustable gauge factor, made on flexible substrates." *Nanoscale* 13, no. 5 (2021): 3263-3274.
72. Σκοτάδης Ευάγγελος Ν. "Αυτο-οργάνωση νανοσωματιδίων με εφαρμογές σε χημικούς αισθητήρες." (2014).
73. Μαδιανός Λεωνίδα. "Ανάπτυξη χημικών και βιολογικών αισθητήρων με εφαρμογή στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων." (2018).