



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

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΖΟΥΡΜΑΝΑ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΑΜ: 09921017

Επιβλέπων: Δ. Τσουκαλάς

ΑΘΗΝΑ 2023

Ευχαριστίες

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Τσουκαλά, για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Προηγμένων Υλικών και Μικρο-Νανοδιατάξεων της Σ.Ε.Μ.Φ.Ε. του Ε.Μ.Π. για την διαθεσιμότητα τους και την βοήθεια τους σε οποιαδήποτε δυσκολία μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους ερευνητές Ασλανίδη Ευάγγελο και Σκοτάδη Ευάγγελο για την συνεχή βοήθεια που μου παρείχαν σε κάθε στάδιο αυτής της εργασίας, την κατανόηση τους σε κάθε νέα μου απορία και την διαρκή τους ενθάρρυνση. Επίσης απέναντι σε κάθε ανταγωνισμό και ατομικισμό που θα μπορούσε να υπάρχει, θα ήθελα να αναφέρω την συνεργασία μου με την Χρυσή Παναγοπούλου και να την ευχαριστήσω για την συνεισφορά της στην εργασία, καθώς και την Αννίτα Ράπεση για την παρασκευή και χορήγηση βιολογικών υλικών που ήταν αναγκαίο κομμάτι της παρούσας εργασίας.

Όλη μου την οικογένεια και συγκεκριμένα τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την στήριξη τους, την κατανόηση τους σε οποιαδήποτε επιλογή μου και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει ως τώρα.

Τις φίλες και τους φίλους μου, που πρόθυμα είναι πάντα εκεί να με ακούσουν, να με συμβουλευσουν και να μου συμπαρασταθούν.

Περιεχόμενα

Contents

Ευχαριστίες	3
Περιεχόμενα	4
Περίληψη	6
Abstract	8
Κεφάλαιο 1	10
Αισθητήρες.....	10
1.1 Εισαγωγή.....	10
1.2 Βασικά χαρακτηριστικά αισθητήρων.....	10
1.2.1 Στατικά χαρακτηριστικά.....	10
1.2.2 Δυναμικά Χαρακτηριστικά.....	12
1.2.3 Χαρακτηριστικά Ιδανικού Αισθητήρα	13
1.3 Ταξινόμηση Αισθητήρων.....	13
1.4 Βιοαισθητήρες	15
1.5 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες.....	18
1.6 Νανοσωματίδια	20
1.6 Μηχανισμοί Αγωγιμότητας.....	22
1.7.1 Φαινόμενα Σήραγγας.....	23
1.7.2 Επίδραση Φαινομένων Φόρτισης	25
1.7.3 Αγωγιμότητα DNA	27
Κεφάλαιο 2	29
Μεθοδολογίες Κατασκευής	29
2.1 Ιοντοβολή (Sputtering).....	29
2.2 RF Sputtering.....	30
2.3 DC Sputtering	31
2.4 Παραγωγή Νανοσωματιδίων μέσω ιοντοβολής.....	32
2.5 Εξάχνωση μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίων (E-gun evaporation)	33
2.6 Δομική Ποιότητα ηλεκτροδίων	34
3 ^ο Κεφάλαιο	36
Χρήση Βιοαισθητήρων για την Ανίχνευση Βαρέων Μετάλλων.....	36
Βιολογική Τροποποίηση Αισθητήρων	36
3.1 Βαρέα Μέταλλα.....	36
3.2 Χρήση DNAzymes σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση Βαρέων Μετάλλων	39
3.3 Πρωτόκολλα ακινητοποίησης DNAzymes	41

3.3.1 Amino modified DNAzymes.....	41
3.3.2 Thiol Modified DNAzymes.....	44
4° Κεφάλαιο.....	47
Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης.....	47
4.1 Εισαγωγή.....	47
4.2 Βασικές αρχές ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης.....	47
4.3 Διαγράμματα Εμπέδησης.....	50
4.3.1 Διαγράμματα Nyquist	50
4.3.2 Διαγράμματα Bode Plot	52
4.4 Στοιχείο σταθερής φάσης CPE	53
4.5 Χωρητικότητα Διπλοστοιβάδας.....	55
4.6 Ισοδύναμο Κύκλωμα	59
4.7 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα της Ηλεκτροχημικής Φασματοσκοπίας Εμπέδησης	61
5ο Κεφάλαιο	63
Πειραματική Διαδικασία Μετρήσεων- Παρουσίαση Αποτελεσμάτων	63
5.1 Τεχνικά Χαρακτηριστικά Κατασκευής Βιοαισθητήρα	63
5.2 Πειραματική Διάταξη	65
5.3 Μετρήσεις σύνθετης αντίστασης.....	66
5.4 Παρουσίαση Πειραματικών Αποτελεσμάτων.....	68
5.5 Σύγκριση Amino – Thiol modified DNAzymes.....	85
6ο Κεφάλαιο	87
Συμπεράσματα κα Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	87
Βιβλιογραφία.....	89

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακή εργασίας είναι η ανάπτυξη βιολογικών αισθητήρων βασισμένων σε ένα υβρίδιο μεταλλικών νανοσωματιδίων πλατίνας και DNAzymes για την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων στο νερό μέσω της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης.

Ως βαρέα μέταλλα θεωρούμε τα μεταλλικά/ ημιμεταλλικά στοιχεία που αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία, την χλωρίδα και την πανίδα λόγω των χημικών ιδιοτήτων και της προσβασιμότητάς τους. Τα βαρέα μέταλλα υπάρχουν φυσικά στον φλοιό της γης με την μορφή θειούχων ή οξειδικών μεταλλευμάτων. 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 για αυτό η ανίχνευση τους σε όσο το δυνατόν χαμηλότερες συγκεντρώσεις κρίνεται απαραίτητη.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία δημιουργήθηκε ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας που περιγράψαμε και έγινε ανίχνευση ιόντων μολύβδου και τρισθενούς καδμίου. Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από υπόστρωμα οξειδίου του πυριτίου, στο οποία εναποτίθενται νανοσωματίδια πλατίνας με την τεχνική sputtering. Ακόμα ο αισθητήρας αξιοποιεί τα DNAzymes καθώς είναι επιλεκτικά με τα ιόντα βαρέων μετάλλων. Η λογική των DNAzymes είναι ότι παρουσία των ιόντων βαρέων μετάλλων, οι ενζυματικές αλυσίδες τους διασπώνται σε επιμέρους κομμάτια, και καθώς είχαν δημιουργήσει αγώγιμες γέφυρες μεταξύ των νανοσωματιδίων ή των συσσωμάτων τους, αυτές καταρρέουν επιλεκτικά. Ανταγωνιστικά στο αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μείωση της συνολικής αγωγιμότητας μέσα ηλεκτροστατικό μας διάλυμα, που προκαλεί αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου και ως εκ τούτου αύξηση της χωρητικότητας της διπλοστοιβάδας που δημιουργείται.

Ως αποτέλεσμα έχουμε την αύξηση της συνολικής εμπέδησης του συστήματος γεγονός που φανερώνει ότι τα φαινόμενα μεταφοράς φορτίου κυριαρχούν έναντι της χωρητικής συμπεριφοράς, χωρίς όμως να θεωρούμε αμελητέα τα τελευταία.

Τέλος η εργασία εξετάζει την διαφορά 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 ανίχνευσης στα 12,5nM και τιμές απόκρισης μέχρι και 55%.

Abstract

The purpose of this master thesis is to develop biological sensors based on a metal-platinum and DNAzymes nanoparticle hybrid for the detection of heavy metal ions in water via electrochemical impedance spectroscopy.

Heavy metals are defined as metallic/semi-metallic elements that pose a threat to human health, flora and fauna due to their chemical properties and accessibility. Heavy metals exist naturally in the earth's crust in the form of sulfide or oxide ores. The contamination of water with such hazardous substances is particularly critical, since the accumulation of contaminants in drinking or irrigation water can affect the whole food chain, so their detection at the lowest possible concentrations is essential.

In this thesis the described electrochemical sensor was created and the detection of lead and cadmium trivalent ions was performed. The biosensor consists of a silicon oxide substrate on which platinum nanoparticles are deposited by sputtering technique. The sensor still utilizes DNAzymes as it is selective with heavy metal ions. The idea behind DNAzymes is that in the presence of heavy metal ions, their enzyme chains break down into individual pieces, and as they had created conductive bridges between the nanoparticles or their aggregates, these selectively collapse.

Competitive to the result of this process is a decrease in the overall conductance in our electrostatic solution, causing an increase in the dielectric constant of the solution and hence an increase in the double layer capacitance.

As a result we have the increase of the total impedance of the system which reveals that the effects of load transfer dominate over the capacitive behavior, but we do not consider the latter to be unimportant. 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 12.5 nM and response values up to 55%.

Κεφάλαιο 1

Αισθητήρες

1.1 Εισαγωγή

Οι αισθητήρες αποτελούν μέσα επικοινωνίας του αναλογικού κόσμου στον οποίο ζούμε και του ψηφιακού κόσμου των ηλεκτρονικών υπολογιστών και των σύγχρονων συστημάτων μεταφοράς πληροφορίας. Οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από αυτούς είναι σε πραγματικό χρόνο για πράγματα που μπορούμε να αντιληφθούμε με τις αισθήσεις μας αλλά και για αυτά τα οποία δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε και θεωρούνται είτε επικίνδυνα είτε ωφέλιμα για εμάς.

Έτσι λοιπόν, αισθητήρας (sensor) θεωρείται μια διάταξη που λαμβάνει και απαντά σε ένα διεγείρον σήμα. Το διεγείρον σήμα συναντάται με τον όρο μετατροπέας ενέργειας ή μορφοτροπέας (transducer) και ορίζεται ως η διάταξη που μετατρέπει μιας μορφής ενέργειας σε κάποια άλλη. Οι μετατροπείς είναι το πιο σημαντικό μέρος ενός αισθητήρα και μετατρέπουν το σήμα που λαμβάνουν σε ένα ηλεκτρικά μετρήσιμο σήμα. Ακόμα ένα μέρος του αισθητήρα είναι το κύκλωμα οδήγησης (driving circuit) που μετατρέπει το σήμα του μετατροπέα σε ένα πιο σταθερής μορφής ηλεκτρικό σήμα και το ενισχύει.

1.2 Βασικά χαρακτηριστικά αισθητήρων

Στην απόκριση ενός αισθητήρα διακρίνουμε δυο καταστάσεις. Την δυναμική ή μεταβατική κατάσταση και την στατική ή μόνιμη κατάσταση. Έτσι ανάλογα με το μετρούμενο μέγεθος και το σήμα εξόδου του κάθε αισθητήρα καθορίζεται με βάση τα χαρακτηριστικά του τα οποία διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τα στατικά και τα δυναμικά χαρακτηριστικά. [1]

1.2.1 Στατικά χαρακτηριστικά

Η σχέση που συνδέει την είσοδο (διέγερση) και την έξοδο του αισθητήρα στην μόνιμη κατάσταση μπορεί να είναι γραμμική, εκθετική, λογαριθμική είτε οποιαδήποτε άλλη συνάρτηση. Η συνάρτηση αυτή ονομάζεται συνάρτηση μεταφοράς. Παρακάτω παρουσιάζονται τα στατικά χαρακτηριστικά των αισθητήρων τα οποία ισχύουν όταν

το σύστημα του μετρούμενου μεγέθους και του αισθητήρα βρίσκεται σε ισορροπία δηλαδή όταν ο αισθητήρας δεν αντιλαμβάνεται κάποια μεταβολή του φυσικού μεγέθους. [2]

- Η ακρίβεια (accuracy), είναι η απόκλιση της πραγματικής τιμής της μετρούμενης ποσότητας από την τιμή που δίνει ο αισθητήρας και μπορεί να εκφραστεί ως απόλυτη τιμή του σφάλματος μέτρησης, είτε ως ποσοστό της κλίμακας εισόδου είτε ως ποσοστό της κλίμακας εξόδου.
- Η ευαισθησία (sensitivity), δείχνει την ανταπόκριση του αισθητήρα σε μια δεδομένη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους. Ισούται με τον λόγο.
- Η επαναληψιμότητα του αισθητήρα μας καθορίζει την ικανότητα του να δίνει την ίδια τιμή για κάθε μέτρηση όταν το μετρούμενο μέγεθος δεν μεταβάλλεται.
- Η αξιοπιστία ενός αισθητήρα εκφράζει την σταθερότητα και την εγκυρότητα των σημάτων εξόδου του αισθητήρα. Αναφέρεται και ως χρόνος λειτουργίας της συσκευής.
- Η επαναληψιμότητα του αισθητήρα μας καθορίζει την ικανότητα του να δίνει την ίδια τιμή για κάθε μέτρηση όταν το μετρούμενο μέγεθος δεν μεταβάλλεται
- Το εύρος ενός αισθητήρα μας δείχνει την ελάχιστη και την μέγιστη τιμή που

μπορεί να μετρήσει

- Το στατικό σφάλμα (static error) το οποίο έχει σταθερή τιμή και υπεισέρχεται στη μέτρηση σε όλο το εύρος των τιμών εισόδου. Γνωρίζοντας την τιμή του μπορεί να αντισταθμιστεί και να μην επηρεάσει την ακρίβεια του συστήματος.
- Η υστέρηση (hysteresis) εκφράζει την απόκλιση της τιμής εξόδου για συγκεκριμένη τιμή του σήματος εισόδου, όταν η κατεύθυνση της μεταβολής στην είσοδο αντιστραφεί. Το σφάλμα που παράγεται με αυτόν τον τρόπο επηρεάζει την ακρίβεια της συσκευής. Παράγοντες που προκαλούν φαινόμενο υστέρησης είναι συνήθως η τριβή, η μηχανική τάση και οι αλλαγές στη δομή των χρησιμοποιούμενων υλικών.

- Η νεκρή ζώνη είναι το μέγιστο εύρος τιμών εισόδου για τις οποίες η τιμή εξόδου δεν μεταβάλλεται.
- Το κατώφλι που είναι η ελάχιστη τιμή του σήματος εισόδου για την οποία το σήμα εξόδου του αισθητήρα είναι μη μηδενικό.
- Ως διακριτική ικανότητα ορίζεται η απαιτούμενη ελάχιστη μεταβολή του σήματος εισόδου, ούτως ώστε να μεταβληθεί το σήμα εξόδου του αισθητήρα.
- Η αντιστρεψιμότητα (reversibility) στην εξάρτηση της απόκρισης του αισθητήρα από προηγούμενη έκθεσή του σε αναλύτες.
- Η επιλεκτικότητα (selectivity) ορίζεται ως η ικανότητα ενός αισθητήρα να ανταποκρίνεται κυρίως σε μια μόνο ένωση υπό την παρουσία και άλλων ενώσεων.
- Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) που σχετίζεται με τη χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί. Οι τιμές συγκέντρωσης πάνω από το όριο ανίχνευσης ενός αναλύτη δείχνουν την παρουσία του στο χώρο, ενώ για τιμές χαμηλότερες, η ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη.
- Ο χρόνος απόκρισης/ ανάκαμψης (response/recovery time) αναφέρεται συνήθως στο χρόνο που χρειάζεται ο αισθητήρας για να αποκτήσει το 70% της σταθερής τιμής του κατά την εμφάνιση/απομάκρυνση μιας ουσίας.

1.2.2 Δυναμικά Χαρακτηριστικά

Τα δυναμικά χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα εμφανίζονται όταν το σήμα εισόδου είναι μεταβαλλόμενο και η απόκριση χαρακτηρίζεται από μια δυναμική συμπεριφορά που δεν μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά από τα στατικά χαρακτηριστικά. Σε αυτή την περίπτωση οι αισθητήρες περιλαμβάνουν στοιχεία που συσσωρεύουν ενέργεια όπως είναι οι πυκνωτές και τα επαγωγικά ή θερμικά στοιχεία τα οποία δημιουργούν μια χρονική καθυστέρηση. Τα δυναμικά χαρακτηριστικά προσδιορίζονται από την εξέταση της απόκρισης του αισθητήρα ανάλογα την μορφή του σήματος εισόδου και οφείλονται στην χρονική καθυστέρηση που αναφερθήκαμε πριν. [2]

1.2.3 Χαρακτηριστικά Ιδανικού Αισθητήρα

Παρότι λόγω των φυσικών περιορισμών που υπάρχουν κατά την κατασκευή του, ένας ιδανικός αισθητήρας μπορεί θεωρητικά να υπάρξει καθώς όλα τα χαρακτηριστικά που περιγράψαμε παραπάνω θα έχουν ιδανικές τιμές. Οι τιμές αυτών των χαρακτηριστικών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.[3]

Χαρακτηριστικά	Ιδανική Τιμή
Απόκριση	Γραμμική, χωρίς θόρυβο
Χρόνος απόκρισης	Μηδέν
Ένδειξη Πλήρους Κλίμακας	Βαθμονομημένη μέγιστη έξοδος
Περιοχή Λειτουργίας	Άπειρη
Διακριτική Ικανότητα	Άπειρη
Ευαισθησία	Σταθερή και Υψηλή
Εύρος Συχνοτήτων	Άπειρο
Αρχική τιμή εξόδου	Μηδέν
Χρόνος ως το 90% της μέγιστης τιμής	Μηδέν

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού αισθητήρα.

1.3 Ταξινόμηση Αισθητήρων

Όλοι οι αισθητήρες μπορούν να ενταχθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους παθητικούς και τους ενεργητικούς. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι οι παθητικοί αισθητήρες δεν χρειάζονται επιπρόσθετη πηγή ενέργειας για να λειτουργήσουν, καθώς μετατρέπουν την ενέργεια εισόδου που προκαλεί ένα εξωτερικό ερέθισμα σε σήμα εξόδου. Από την άλλη πλευρά οι ενεργητικοί αισθητήρες χρειάζονται τροφοδοσία ρεύματος για να λειτουργήσουν, η οποία καλείται σήμα διέγερσης. Αυτό το σήμα μετατρέπεται από τον αισθητήρα σε σήμα εξόδου.

Πιο συγκεκριμένα, η ταξινόμηση των αισθητήρων μπορεί να γίνει με βάση τις ιδιότητες τους όπως για παράδειγμα τι εξωτερικό ερέθισμα δέχονται, τι φυσικό ή χημικό μέγεθος μετράνε, σε ποιο φυσικό φαινόμενο είναι ευαίσθητοι, ποιο είναι το υλικό κατασκευής τους ή ακόμα και ποιο είναι το πεδίο εφαρμογής τους. [2]

Ο ποιο σύνηθες τρόπος κατηγοριοποίησης των αισθητήρων βασίζεται στο είδος του ερεθίσματος που αυτός ανιχνεύει, δηλαδή στην μορφή ενέργειας που μεταφέρει το σήμα. Οι κυριότερες κατηγορίες αισθητήρων είναι οι εξής:

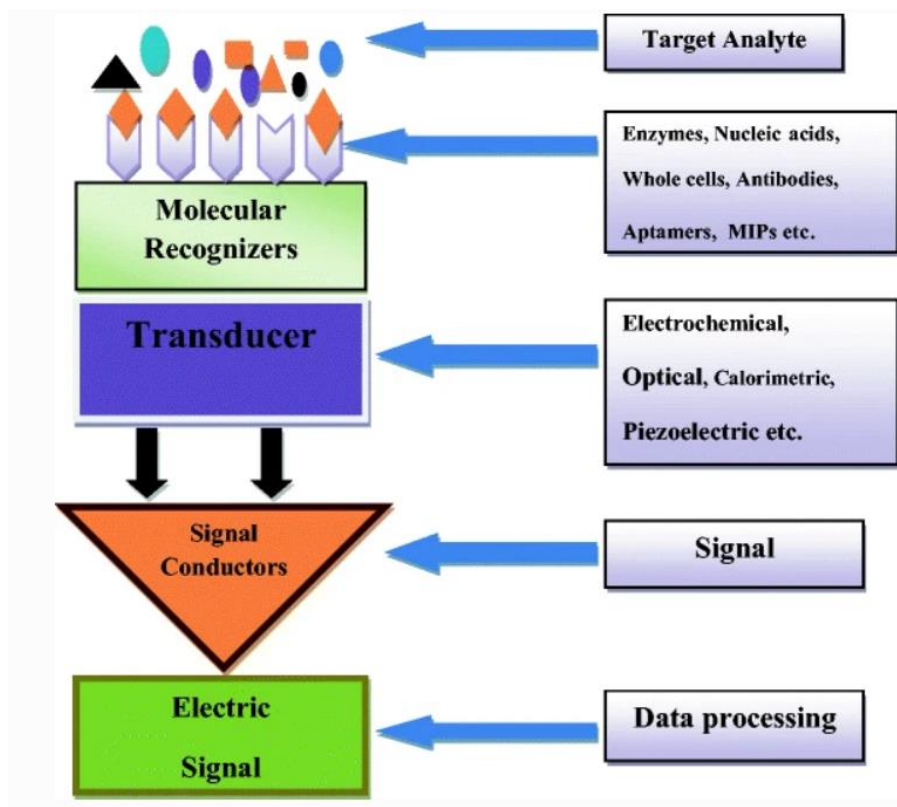
- Μηχανικοί αισθητήρες. Ονομάζονται έτσι καθώς μετρούν φυσικά μεγέθη όπως η ταχύτητα, η θέση, η επιτάχυνση, η ελαστικότητα, η δύναμη, η παραμόρφωση κ.α. Αποτελούνται από μια μηχανική δομή, η οποία παραμορφώνεται, εξαιτίας μηχανικής τάσης, στατικού ηλεκτρισμού, θερμοκρασίας, πίεσης κ.α. και μας επιτρέπει να μετρήσουμε ένα φυσικό μέγεθος. Οι συνηθέστερες δομές που χρησιμοποιούνται σε αυτούς τους αισθητήρες είναι τα διαφράγματα, οι μεμβράνες και οι αιωρούμενοι δίσκοι.[4]
- Θερμικοί αισθητήρες. Χαρακτηριστικό τους αποτελεί ότι μετατρέπουν την θερμική ενέργεια, σε μια μετρούμενη ηλεκτρική ποσότητα η οποία μπορεί αν επεξεργαστεί και να μετρηθεί. Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, τους ηλεκτρικούς και τους μη ηλεκτρικούς. Παραδείγματα για την πρώτη κατηγορία αποτελούν τα θερμοζεύγη και τα θερμίστορς, ενώ στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα θερμόμετρα και οι θερμικοί αισθητήρες οπτικών ινών.[5]
- Μαγνητικοί αισθητήρες. Αυτοί μετατρέπουν την μεταβολή του μαγνητικού πεδίου σε ηλεκτρικό μετρήσιμο σήμα. Εκτός από τα χαρακτηριστικά του μαγνητικού πεδίου (πλάτος, φάση πόλωση), μετρούν επίσης και την μαγνητική ροή και διαπερατότητα. Στηρίζονται κυρίως στο φαινόμενο Hall και την μαγνητοαντίσταση.
- Αισθητήρες ακτινοβολίας. Οι αισθητήρες αυτοί ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Τους αισθητήρες πυρηνικής ενέργειας, που ανιχνεύουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία(ακτίνες X και γ), και τους αισθητήρες πυρηνικών σωματιδίων, που έχουν την δυνατότητα να εντοπίζουν σωματίδια που εκπέμπονται από ένα ραδιενεργό υλικό (π.χ. σωματίδια α και β, νετρόνια και πρωτόνια).[6]
- Χημικοί αισθητήρες. Ορίζονται οι αισθητήρες που μετατρέπουν μια χημική πληροφορία σε ένα αναλυτικώς μετρήσιμο σήμα. Οι χημικές πληροφορίες,

μπορεί να προέρχονται από διάφορες χημικές ουσίες ή χημικές αντιδράσεις. Οι χημικοί αισθητήρες προορίζονται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ουσιών που βρίσκονται κυρίως στην αέρια και στην υγρή φάση και λιγότερο στην στερεά. Χημικούς αισθητήρες συναντάμε στην έρευνα, στην βιομηχανία, στην υγεία, στην γεωργία κλπ. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογών αποτελούν οι ποσοτικοί και ποιοτικοί έλεγχοι των περιβαλλοντικών ρύπων και η ανίχνευση φαρμάκων.[2]

- Βιολογικοί Αισθητήρες. Αποτελούν μια υποκατηγορία χημικών αισθητήρων, οι οποίοι χρησιμοποιούν ως ανιχνευτικό μέσο ποικίλα βιολογικά υλικά υψηλής επιλεκτικότητας και ευαισθησίας. Έτσι λοιπόν, ως βιοαισθητήρα θεωρούμε ένα αναλυτικό εργαλείο που αποτελείται από βιολογικά ενεργό υλικό σε συνδυασμό με ένα μετατροπέα βιοχημικού σήματος σε ηλεκτρικό σήμα. Καθώς οι βιοαισθητήρες αποτελούν το κεντρικό θέμα της παρούσας εργασίας, στο παρακάτω υποκεφάλαιο αναφέρουμε αναλυτικά την αρχή λειτουργίας τους, την ταξινόμησή τους και το ευρύ πεδίο εφαρμογής τους.

1.4 Βιοαισθητήρες

Όπως αναφέραμε, στους βιολογικούς αισθητήρες ανήκει οποιαδήποτε διάταξη έχει την ικανότητα να μετατρέπει μια βιολογική απόκριση ενός φυσικού ή χημικού ερεθίσματος σε ένα ηλεκτρικά μετρήσιμο σήμα, μέσω των κατάλληλων βιολογικών αναγνωριστικών στοιχείων. Οι βιοαισθητήρες ανιχνεύουν παθογόνους μικροοργανισμούς ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τοξικές χημικές ουσίες και τα επίπεδα PH.

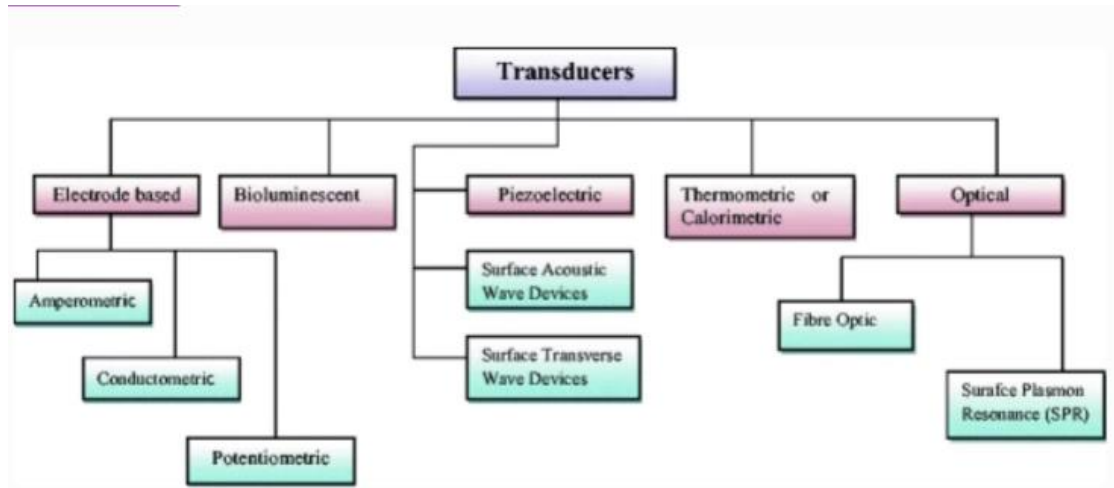


Εικόνα 0: Βασική διάταξη των στοιχείων του βιοαισθητήρα για την κατασκευή του

Τα κύρια μέρη από τα οποία αποτελείται ένας βιοαισθητήρας είναι οι βιουποδοχείς, ο μετατροπέας ή επιφάνεια ακινητοποίησης, τα ηλεκτρονικά στοιχεία και μια μονάδα απεικόνισης μετρήσεων όπως μια οθόνη. [7]

- Ο βιουποδοχέας είναι ένα βιομόριο ή βιολογικό στοιχείο που μπορεί να αναγνωρίσει τον αναλύτη (δηλαδή την ουσία τα συστατικά της οποίας ανιχνεύονται). Συνήθως ως βιουποδοχείς χρησιμοποιούνται ένζυμα, κύτταρα, απταμερή, μόρια DNA ή RNA και αντισώματα. Η διαδικασία παραγωγής σήματος (με τη μορφή φωτός, θερμότητας, pH, αλλαγής φορτίου ή μάζας, φυτικού ή ζωικού ιστού και μικροβιακών προϊόντων) κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ βιουποδοχέα και αναλύτη ονομάζεται βιοαναγνώριση.
- Ο μετατροπέας είναι μια συσκευή που μετατρέπει την ενέργεια από μια μορφή σε μια άλλη. Ο μετατροπέας αποτελεί βασικό στοιχείο ενός βιοαισθητήρα. Μετατρέπει το γεγονός της βιοαναγνώρισης σε μετρήσιμο σήμα (ηλεκτρικό) που συνδέεται με την ποσότητα ή την παρουσία ενός χημικού ή βιολογικού στόχου. Αυτή η διαδικασία μετατροπής της ενέργειας

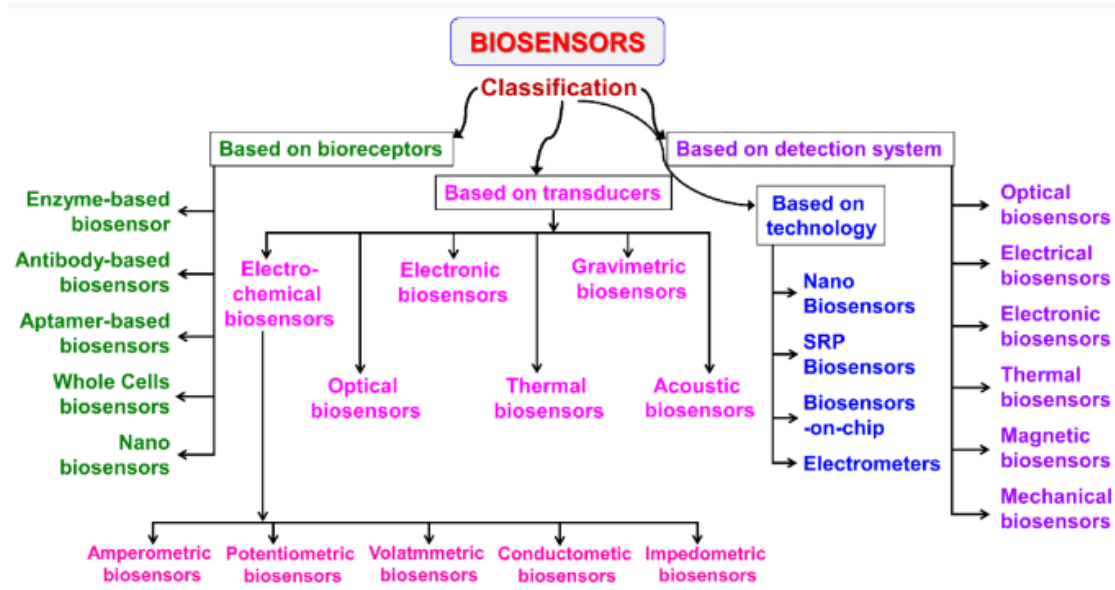
είναι γνωστή ως σηματοδότηση. Οι μετατροπείς παράγουν είτε οπτικά είτε ηλεκτρικά σήματα ανάλογα με τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων αναλυτή-βιοϋποδοχέα. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας, οι μετατροπείς κατηγοριοποιούνται ευρέως σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, θερμικούς, ηλεκτρονικούς και βαρυμετρικούς μετατροπείς



Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση μετατροπέων.

- Στα ηλεκτρονικά στοιχεία το μετατρεπόμενο σήμα επεξεργάζεται και προετοιμάζεται για την οθόνη. Τα ηλεκτρικά σήματα που λαμβάνονται από τον μετατροπέα ενισχύονται και μετατρέπονται σε ψηφιακή μορφή. Τα επεξεργασμένα σήματα ποσοτικοποιούνται από τη μονάδα απεικόνισης.
- Η μονάδα απεικόνισης αποτελείται από ένα σύστημα ερμηνείας του χρήστη, όπως ένας υπολογιστής ή ένας εκτυπωτής που παράγει την έξοδο, έτσι ώστε η αντίστοιχη απόκριση να μπορεί να διαβαστεί και να γίνει κατανοητή από τον χρήστη. Ανάλογα με την προϋπόθεση του τελικού χρήστη, η έξοδος μπορεί να έχει τη μορφή αριθμητικής, γραφικής τιμής ή σχήματος.

Όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα οι βιολογικοί αισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τους βιοϋποδοχείς τους, με βάση τον μετατροπέα, με τον συνδυασμό υποδοχέα – αναλύτη, με το σύστημα ανίχνευσης, είτε ακόμα με την χρήση ή μη νανοτεχνολογικών μεθόδων για την κατασκευή τους.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση βιοαισθητήρων

1.5 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες βασίζονται σε ηλεκτροχημικά κελιά δύο ή τριών ηλεκτροδίων, τα οποία έρχονται σε επαφή με ένα υγρό ή στερεό ηλεκτροκαταλύτη. Η αλληλεπίδραση της ηλεκτροχημικής κυψελίδας με κάθε ρευστό είναι διαφορετική και παράγει διαφορετικό και συγκεκριμένο σήμα.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για την υβριδοποίηση DNA, την πρόσδεση DNA-φαρμάκων, την συγκέντρωση γλυκόζης κ.α. Η βασική αρχή σε αυτή την κατηγορία των αισθητήρων είναι ότι πολλές αντιδράσεις παράγουν ή καταναλώνουν ηλεκτρόνια ή ιόντα με αποτέλεσμα να αλλάζουν κάποιες ηλεκτρικές ιδιότητες του διαλύματος που μπορούν να γίνουν αισθητές μέσω της μέτρησης μιας παραμέτρου όπως η αγωγιμότητα, το ηλεκτρικό ρεύμα, το ηλεκτρικό δυναμικό κ.α.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, συνήθως, καταγράφουν το ρεύμα κατά την εφαρμογή ενός σταθερού δυναμικού (αμπερομετρία), το δυναμικό σε μηδενικό ρεύμα (ποτενσιομετρία), την αγωγιμότητα, αλλαγές στην αντίσταση ή την εμπέδηση γι' αυτόν τον λόγο κατηγοριοποιούνται σε ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς, αγωγιμομετρικούς και αισθητήρες εμπέδησης.[7]

- Ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες: Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες μετρούν το φορτίο που συσσωρεύεται λόγω της αλληλεπίδρασης του

αναλύτη και του βιοϋποδοχέα στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς υπό μηδενικό ρεύμα. Για τη μετατροπή μιας βιοχημικής αντίδρασης σε σήμα δυναμικού χρησιμοποιούνται ιοντοεκλεκτικά ηλεκτρόδια και ιοντοευαίσθητα τρανζίστορ επίδρασης πεδίου.

- Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες: Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες λειτουργούν σε συστοιχίες δύο ή τριών ηλεκτροδίων. Αυτοί οι αισθητήρες μετρούν το ρεύμα που παράγεται λόγω της ηλεκτροχημικής οξειδωσης ή αναγωγής των ηλεκτροδραστικών ειδών στο ηλεκτρόδιο εργασίας όταν εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Το ρεύμα που παράγεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη που υπάρχει στο διάλυμα.
- Αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες: Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες ποσοτικοποιούν τη μεταβολή της αγωγιμότητας μεταξύ του ζεύγους ηλεκτροδίων λόγω μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης (μεταβολή των ιδιοτήτων αγωγιμότητας του αναλύτη). Οι αγωγιμομετρικοί και οι εμπεδημετρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται συνήθως για την παρακολούθηση μεταβολικών διεργασιών σε ζωντανά βιολογικά συστήματα.
- Βιοαισθητήρες εμπέδησης: Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης μετρούν την ηλεκτρική εμπέδηση παράγεται στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη όταν εφαρμόζεται ένα μικρό ημιτονοειδές σήμα διέγερσης. Περιλαμβάνει την εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης χαμηλού πλάτους στο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα και στη συνέχεια μετράται η εντός/εκτός φάσης απόκριση του ρεύματος ως συνάρτηση της συχνότητας με τη χρήση ενός αναλυτή σύνθετης αντίστασης.
- Βιοαισθητήρες βολτομετρίας: Αυτοί οι αισθητήρες ανιχνεύουν τον αναλύτη, καθώς μετράνε την τιμή του ρεύματος κατά την ελεγχόμενη μεταβολή του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Στα πλεονεκτήματα αυτών των αισθητήρων περιλαμβάνεται η εξαιρετική ευαισθησία και η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών.

[7], [8]

1.6 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια είναι η απλούστερη δομή που υπάρχει στην κλίμακα των νανομέτρων. Αποτελούν σωματίδια με τουλάχιστον μια διάσταση μικρότερη του ενός μικρομέτρου ή ένωση ατόμων της οποίας η διάμετρος δεν ξεπερνά τα 100 nm. Μπορεί να είναι φουλερένια, νανοσωλήνες άνθρακα, συσσωματώματα ατόμων μετάλλου (μεταλλικά νανοσωματίδια) κ.α., και να έχουν κρυσταλλική ή άμορφη δομή. Μια από τις κύριες ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι ότι διαθέτουν μεγάλη απορροφητικότητα τόσο σε υγρά όσο και σε αέρια, γεγονός που οφείλεται στο ότι εμφανίζουν μεγάλο κλάσμα επιφάνειας όγκου (δηλαδή διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους).

Τα νανοϋλικά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς κβαντικά φαινόμενα κάνουν την εμφάνισή τους και επηρεάζουν την συμπεριφορά τους. Επίσης εμφανίζονται και φαινόμενα επιφάνειας τα οποία είναι υπεύθυνα για την μεταβολή της χημικής τους δραστηριότητας, όπως επίσης και των μηχανικών, οπτικών και ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σε αυτό αποτελεί το γεγονός ότι σε ένα νανοσωματίδιο χρυσού 3nm το σημείο τήξης του είναι 300° C από τους 1064°C που είναι κανονικά για ένα φύλλο χρυσού πάχους μερικών μικρομέτρων. [9], [10]

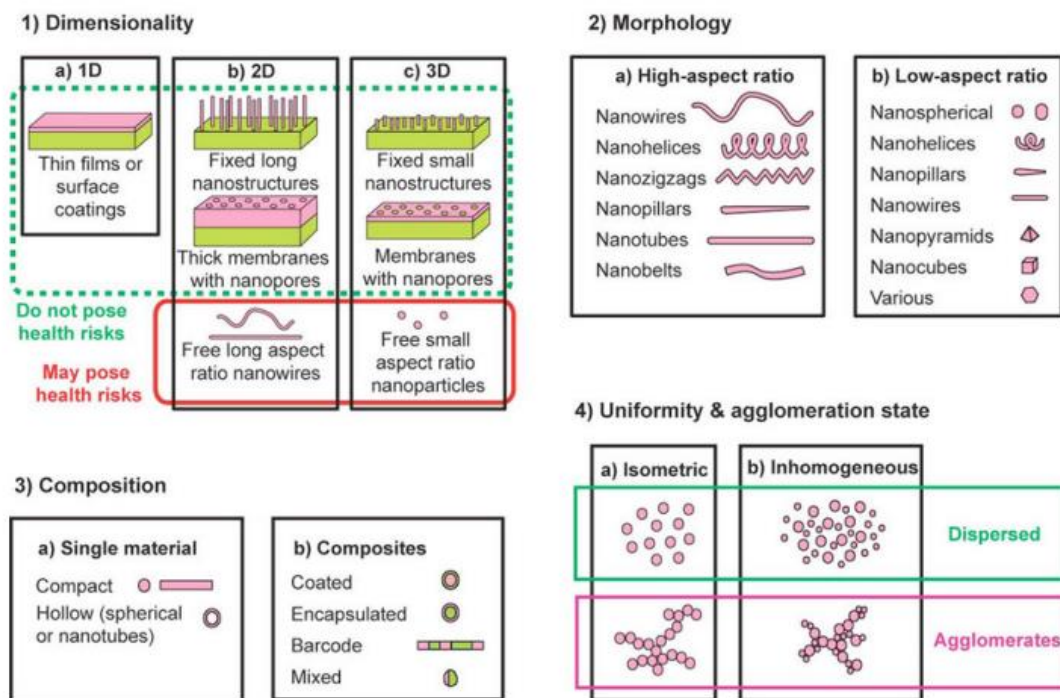
Οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι οι εξής:

Ειδική Επιφάνεια	Κύριος παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται η σταθερότητα, η αγωγιμότητα και η τοπολογία των νανοσωματιδίων.
Οπτικές Ιδιότητες	Οπτικοί παράγοντες όπως το χρώμα, η εκπομπή ή απορρόφηση μηκών κύματος μεταβάλλονται όταν μεταβαίνουμε από bulk υλικά στην νανοκλίμακα.
Ηλεκτρικές Ιδιότητες	Ελέγχονται μέσω των μεμονωμένων ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων.
Θερμικές Ιδιότητες	Η θερμοκρασία συμπύκνωσης και τήξης μειώνονται με την μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων.
Μηχανικές Ιδιότητες	Πολλά συνθετικά υλικά που έχουν ενισχυθεί με νανοσωματίδια, έχουν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες.

Μαγνητικές Ιδιότητες	Όσο μειώνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων βελτιώνονται οι μαγνητικές ιδιότητες του υλικού, το οποίο είναι χρήσιμο για την αποθήκευση δεδομένων.
----------------------	---

Πίνακας 2: Ιδιότητες Νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια όπως παρατηρούμε και στην παρακάτω εικόνα ταξινομούνται βάσει των διαστάσεων στην νανοκλίμακα, της μορφολογίας τους, της σύστασης τους, της ομοιομορφίας και των συσσωματώσεων.



Εικόνα 3: Ταξινόμηση Νανοσωματιδίων.

- Με βάσει την διαστατικότητα τους, μπορούν να έχουν μία, δύο ή τρεις διαστάσεις. Η διαφορά έγκειται στο τι υλικά περιλαμβάνουν και που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα μιας διάστασης υλικά είναι συνήθως λεπτές μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στην μικροηλεκτρονική και στην χημεία, δύο διαστάσεων υλικά λειτουργούν ως φίλτρα μικρότερων σωματιδίων, ενώ τριών διαστάσεων περιλαμβάνουν τα ελεύθερα νανοσωματίδια και λεπτές μεμβράνες με πορώδη ή κολλώδη συμπεριφορά.
- Η μορφολογία τους σχετίζεται με τον λόγο των διαστάσεων τους και την σχηματική τους αναπαράσταση.

- Η σύσταση τους εξαρτάται από το αν αποτελούνται αποκλειστικά από ένα στοιχείο ή είναι συνδυασμός υλικών (νανοσύνθετο υλικό).
- Η ομοιομορφία τους εξαρτάται από τις χημικές και ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες του υλικού. [10]

Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων κρίνεται απαραίτητος, καθώς με αυτόν τον τρόπο έχουμε την καλύτερη εικόνα κατανομής των νανοσωματιδίων στο χώρο που εναποτέθηκαν. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων με τις κυριότερες από αυτές να είναι: [11]

- SEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης)
- TEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης)
- XRD (περίθλαση ακτινών X)
- AFM (Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης)
- STM (Μικροσκοπία σάρωσης σήραγγας)
- DLS- SLS (Δυναμική – Στατική σκέδαση του φωτός)

1.6 Μηχανισμοί Αγωγιμότητας

Κατά την μελέτη των μηχανισμών αγωγιμότητας των νανοσωματιδίων, οι δυσκολίες που αντιμετωπίζει κανείς, αφορούν τον διεπιστημονικό χαρακτήρα ιδιαίτερα στο πειραματικό κομμάτι των μετρήσεων και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά τις ηλεκτρονικές ιδιότητες των φιλμ των νανοσωματιδίων, γίνεται διάκριση μεταξύ τριών περιπτώσεων:

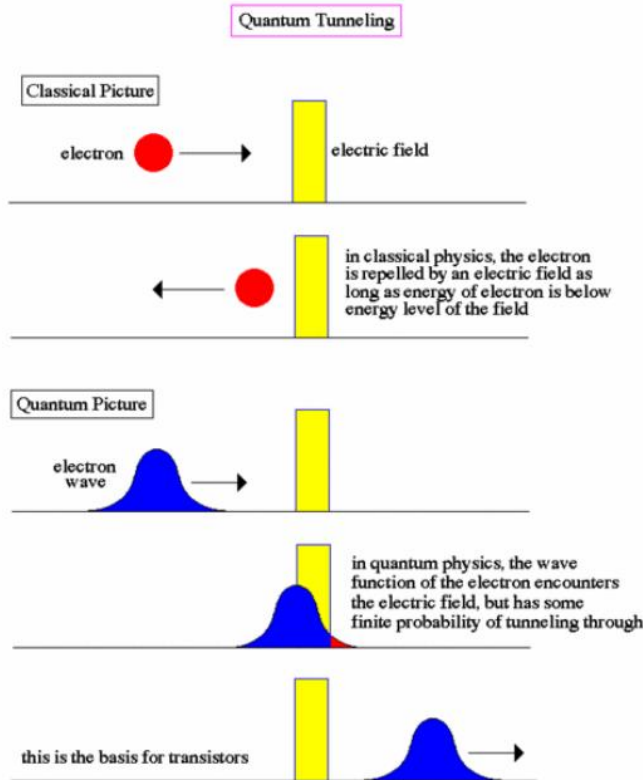
- Την μονωτική κατάσταση, όπου το φιλμ των νανοσωματιδίων αποτελείται από μεμονωμένα και ηλεκτρικά απομονωμένα από τα γειτονικά τους κέντρα νανοσωματίδια
- Την quasi μακροσκοπική κατάσταση, που η επιφανειακή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων είναι αρκετά μεγάλη ώστε τα διακριτά κέντρα συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων να συγχωνεύονται και να σχηματίζουν αρκετούς αγωγίμους δρόμους διαμέσου του φιλμ

- iii. Την ενδιάμεση κατάσταση μετάβασης, στην οποία κινείται κανείς γύρω από το όριο της μετάβασης από την μονωτική στην μακροσκοπική κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει ένα όριο πάνω από το οποίο σημειώνεται η μετάβαση στην μακροσκοπική κατάσταση αγωγιμότητας, το οποίο συμβαίνει την στιγμή που τουλάχιστον ένα συνεχές αγώγιμο μονοπάτι έχει διαμορφωθεί διαμέσου του φιλμ (percolation threshold).

Αν και οι μηχανισμοί μεταφοράς φορτίου δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως από την επιστημονική κοινότητα, έχει εξακριβωθεί πως συγκεκριμένα φυσικά φαινόμενα παίζουν σημαντικό ρόλο ανάλογα και με τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδιακών δομών. Στα επόμενα υποκεφάλαια της εργασίας αναλύουμε το φαινόμενο σήραγγας και το φαινόμενο φόρτισης ηλεκτρονίου καθώς εμφανίζονται στις διατάξεις της παρούσας εργασίας. Άλλα φαινόμενα αναφορικά είναι τα φαινόμενα φόρτισης ηλεκτρονίου (single electron charging), αλμάτων φορτίου (electron hopping), φαινόμενα percolation, φαινόμενα χωρικής διαταραχής και διαταραχής φορτίου κ.α. [12], [13]

1.7.1 Φαινόμενα Σήραγγας

Το φαινόμενο σήραγγας ή κβαντοσηράγωση, είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα κβαντικό σωματίδιο διασχίζει ένα φράγμα δυναμικού, το οποίο φαίνεται πως είναι απίθανο να ξεπεραστεί.



Εικόνα 4: Κβαντικό φαινόμενο σήραγγας.

Όσον αφορά τα νανοσωματίδια, τα φαινόμενα σήραγγας επιτρέπουν την ροή φορτίου μεταξύ ασθενώς συζευγμένων νησίδων νανοσωματιδίων, γεγονός που τα καθιστά έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό για την αγωγιμότητα τους.

Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται και ως μεταφορά φορτίου σε ένα σύστημα μετάλλου- μονωτή – μετάλλου, που για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί, το πάχος του μονωτή δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10nm. Κατά την μεταφορά του φορτίου ένα ηλεκτρόνιο αφήνει μια κενή ενεργειακή θέση του ενός μετάλλου και μεταπηδά σε μια κενή ενεργειακή θέση του δεύτερου υπακούοντας την αρχή του Pauli.

Το ρεύμα αυτής της μετάβασης υπολογίζεται από την σχέση:

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

όπου: e το φορτίο του ηλεκτρονίου, $p(E)$ η πυκνότητα καταστάσεων, Vb η τάση που εφαρμόζουμε, $T(E)$ ο συντελεστής διέλευσης και $f(E)$ είναι η πιθανότητα εύρεσης μίας κατειλημμένης στάθμης σύμφωνα με την κατανομή Fermi – Dirac.

Όταν έχω μικρές τιμές της Vb ($Vb \ll Ef$) και θερμοκρασία δωματίου, τα επίπεδα που κυριαρχούν στα φαινόμενα σήραγγας είναι αυτά που είναι κοντά στην ενέργεια Fermi. Η σχέση (1.1) γίνεται:

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

Με
$$\sigma_0 = \frac{4\pi e^2}{\hbar} \times p(Ef)^2 \times |T(Ef)|^2 \quad (1.3)$$

Λύνοντας αναλυτικά το ολοκλήρωμα στη σχέση προκύπτει η λύση eVb και κατά συνέπεια το ρεύμα σήραγγας γίνεται:

$$I = \sigma_0 \times Vb \quad (1.4)$$

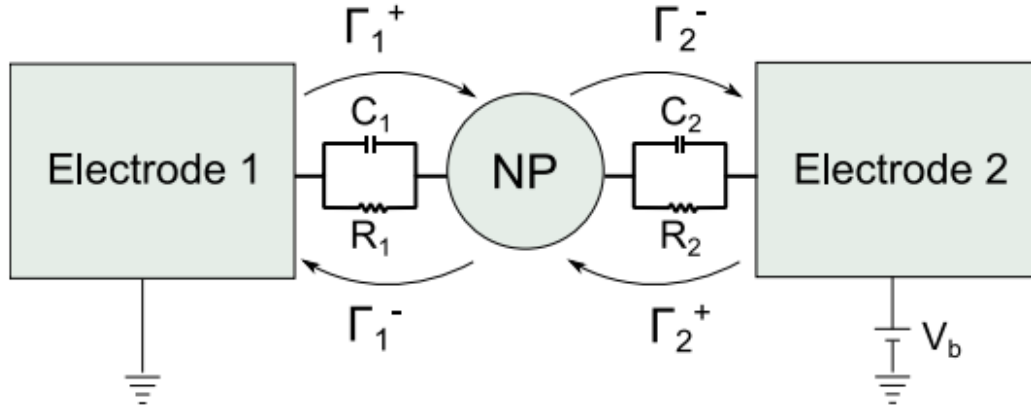
Η εξίσωση αποδεικνύει πως σ_0 είναι η αγωγιμότητα σήραγγας για χαμηλές τιμές πόλωσης, καθώς

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

Ακόμα σύμφωνα με την σχέση $|T(Ef)|^2 = e^{-2kL}$ μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι το ρεύμα λόγω των φαινομένων σήραγγας, φθίνει εκθετικά με την αύξηση του πάχους του μονωτή (L) [13]

1.7.2 Επίδραση Φαινομένων Φόρτισης

Το μέγεθος του νανοσωματιδίου και η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για την μεταφορά φορτίου μεταξύ σωματιδίων (ενέργεια ενεργοποίησης) παρουσιάζουν μια συσχέτιση. Έχει παρατηρηθεί ότι για μειούμενη διάμετρο νανοσωματιδίου χρειάζονται μεγαλύτερες ενέργειες ενεργοποίησης γεγονός που προκύπτει από την φόρτιση των νανοσωματιδίων με φορείς αγωγιμότητας.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση ισοδύναμου κυκλώματος ζεύξης σήραγγας

Μία προσέγγιση για να προκύψει η έκφραση για την ενέργεια φόρτισης ενός νανοσωματιδίου είναι να θεωρηθεί το νανοσωματίδιο με ακτίνα R διαχωρισμένο, με μία μέση απόσταση s , από ένα αγώγιμο περιβάλλον νανοσωματιδίων. Ανάμεσα στο νανοσωματίδιο και στο αγώγιμο περιβάλλον μπορεί γενικά να υποθεθεί διηλεκτρικό με διηλεκτρική σταθερά ϵ_r . Σε αυτή την προσέγγιση η χωρητικότητα του νανοσωματιδίου είναι

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

Και η ενέργεια φόρτισης εκφράζεται ως:

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

Η αγωγιμότητα για τιμές τάσης πολύ κοντά στο μηδέν οφείλεται κυρίως σε ηλεκτρόνια με ενέργειες $E_c + Ef$ και το πλήθος τους υπολογίζεται από την κατανομή Fermi – Dirac:

$$\int_{E_c + Ef}^{\infty} f(E) dE = \int_{E_c + Ef}^{\infty} \frac{dE}{1 + e^{\frac{E - Ef}{kBT}}} \quad \infty$$

$$\int_{E_c + Ef}^{\infty} e^{\left[\frac{E - Ef}{kBT}\right]} dE = kBT e^{-Ec/kBT} \sim e^{-Ec/kBT} \quad (1.8)$$

Στη σχέση (1.8) η κατανομή Fermi-Dirac προσεγγίζεται από την κατανομή Boltzmann, ενώ η συνεισφορά του συντελεστή kBT είναι αμελητέα σε σχέση με αυτήν του εκθετικού όρου. Συνδυάζοντας κανείς τις σχέσεις 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:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-2kL} e^{-Ec/K\beta T} \quad (1.9)$$

[13], [14]

1.7.3 Αγωγιμότητα DNA

Η DNA-τεχνολογία βρίσκεται ερευνητικά μπροστά σε αρκετές προκλήσεις. Ο λόγος είναι ότι σε αντίθεση με άλλα νουκλεϊκά οξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα του DNA, τα μόρια του DNA μεταφέρουν ηλεκτρικά φορτία. Η μελέτη της ηλεκτρικής αγωγιμότητας μορίων DNA απασχολεί διάφορους κλάδους όπως αυτών της χημείας της φυσικής, της συμπυκνωμένης ύλης και της νανοηλεκτρονικής. Η μεταφορά φορτίου κατά μήκος της διπλής έλικας του DNA παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες καθώς συνδέεται με την καταστροφή των βάσεων του DNA λόγω οξειδωσής ή ακτινοβόλησης και την επιδιόρθωσή του, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με το DNA σε βιοχημικούς αισθητήρες, για την κατασκευή εξειδικευμένων μοριακών ηλεκτρονικών δικτύων κ.α. [15]

Η μεταφορά φορτίου στο DNA διέπεται από διάφορους μηχανισμούς όπως είναι η ηλεκτρονική αγωγιμότητα παράλληλα με τις ακολουθίες ζευγών βάσεων, η ιοντική αγωγιμότητα σε συνδυασμό με τα αντίθετα ιόντα, ο επαναπροσανατολισμός των διπόλων του νερού γύρω από το δίκλωνο μόριο DNA και η ανίχνευση φωνονίων λόγω των δομικών διακυμάνσεων του πλέγματος. Η μεταφορά φορτίου στο DNA έχει μεγάλη βιολογική σημασία. [16]

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. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι σε διάφορα πειράματα η αγωγιμότητα

μελετήθηκε ως συνάρτηση του ποικίλου μοριακού μήκους και της σύνθεσης (δηλαδή του αριθμού των ζευγών βάσεων, του τύπου και της θέσης τους, καθώς και της περιεκτικότητας σε γουανίνη) ή της παρουσίας αναντιστοιχιών. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από αυτά, ήταν ότι τα μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν βάσεις γουανίνης είχαν την υψηλότερη αγωγιμότητα μορίου σε σύγκριση με τα ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούνταν από ίσο αριθμό βάσεων κυτοσίνης, θυμίνης ή αδενίνης. Το δίκλινο DNA που περιείχε ζεύγη βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης εμφάνισε υψηλότερη αγωγιμότητα μορίου σε σύγκριση με εκείνο που περιείχε μόνο ζεύγη βάσεων θυμίνης-αδενίνης. Αποδείχθηκε επίσης ότι η αναντιστοιχία ζευγών βάσεων μειώνει την αγωγιμότητα του DNA λόγω της διαταραχής της στοίβαξης ζευγών βάσεων. [17]

Το κυρίαρχο μοντέλο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του DNA βασίζεται στην επικάλυψη μεταξύ τροχιακών π σε γειτονικά ζεύγη βάσεων.

Κεφάλαιο 2

Μεθοδολογίες Κατασκευής

2.1 Ιοντοβολή (Sputtering)

Η τεχνική της ιοντοβολής εκμεταλλεύεται το φαινόμενο της σκέδασης των ατόμων μιας επιφάνειας στερεού όταν αυτή βομβαρδίζεται από ιόντα. Η διαδικασία πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού (χαμηλή πίεση). Ο στόχος που είναι τοποθετημένος σε ένα ηλεκτρόνιο ονομάζεται κάθοδος και το υπόστρωμα που και αυτό είναι τοποθετημένο σε ένα άλλο ηλεκτρόδιο ονομάζεται άνοδος. Από τον στόχο αποκολλούνται μόρια τα οποία εναποτίθενται τελικά στο υπόστρωμα. Η αποκόλληση των μορίων οφείλετε στην δημιουργία πλάσματος αδρανούς αερίου μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων λόγω της ηλεκτρικής τάσης χιλιάδων Volts που εφαρμόζεται σε αυτά. 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 ακτινών 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).

Το sputtering είναι ευρέως διαδεδομένη διαδικασία εναπόθεσης λεπτών υμενίων διότι η διαδικασία εφαρμογής της είναι εξαιρετικά απλή και δεν απαιτείται η ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών γεγονός που την καθιστά 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. Η ιοντοβολή (sputtering) χρησιμοποιείται σε τρεις διαφορετικές μεθόδους, το DC sputtering που προϋποθέτει ότι ο στόχος αποτελείται από αγώγιμο υλικό, το RF sputtering όπου οποιοδήποτε υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος αλλά είναι πιο περίπλοκη η διαδικασία

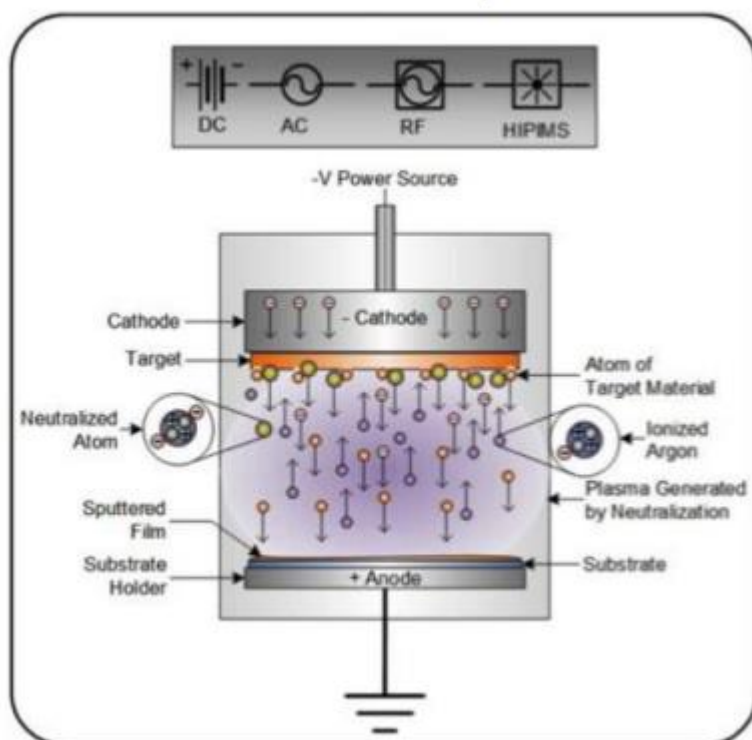
και το ion beam sputtering που παρέχει καλύτερο έλεγχο όσο αφορά την μορφολογία του εναποτιθέμενου υμενίου. [18],[19],[20].

2.2 RF Sputtering

Το πρόβλημα που δημιουργείται με την ιοντοβολή, είναι ότι λόγω των πολλαπλών ελαστικών σκεδάσεων, παράγονται δευτερογενή ηλεκτρόνια, παράλληλα με την εκπομπή ακτινών X και φωτονίων, λόγω διέγερσης και αποδιέγερσης. Για να αποφευχθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα για μη αγώγιμους στόχους, ο στόχος πολώνεται με την χρήση της εναλλασσόμενης τάσης και ραδιοσυχνότητας. Επειδή τα ιόντα αντιδρούν στο εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο πιο αργά από ότι τα ηλεκτρόνια κατά την 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-στόχος και η άνοδος -λόγω της ταλάντωσης του φορτίου των ηλεκτρονίων- αναπτύσσουν ένα συνεχές δυναμικό πιο αρνητικό από το δυναμικό του πλάσματος, έτσι ώστε τα βραδύτερα ιόντα αερίου κατά τη διάρκεια της ταλάντωσης του πεδίου να "αισθάνονται" ένα μέσο συνεχές πεδίο και βομβαρδίζουν το στόχο. Ταυτόχρονα, το ηλεκτρόδιο της ανόδου βομβαρδίζεται, 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 πτώση τάσης στον στόχο θα είναι πολύ μεγαλύτερη, οπότε 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 αυτή την

τεχνική, οι λεπτές μεμβράνες μετάλλων, οι ημιαγωγοί και μονωτικά υλικά, όπως οξειδία και νιτρίδια μετάλλων, εναποτίθενται πιο εύκολα. [21]



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση μιας συσκευής Sputtering [20]

2.3 DC Sputtering

Σε αυτήν την τεχνική, η οποία πραγματοποιείται με συνεχές ρεύμα, ο στόχος πολώνεται υπό σταθερή αρνητική τάση μερικών εκατοντάδων έως μερικών χιλιάδων Volts σε θάλαμο πολύ χαμηλής πίεσης. 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.

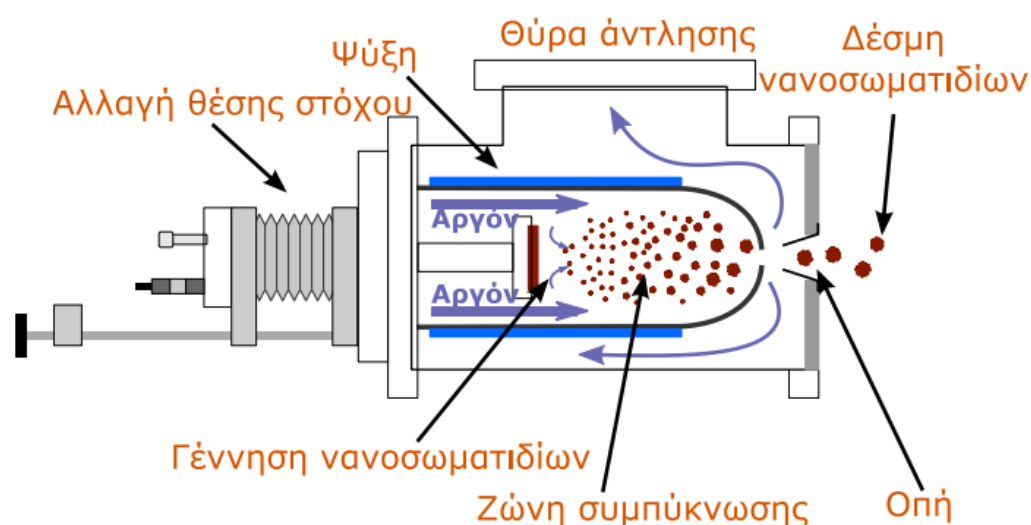
Κατά τη διάρκεια του DC sputtering ο στόχος πρέπει να είναι αγωγίμος, συνεπώς μόνο μέταλλα μπορούν να εναποτεθούν. Αν υπήρξε εφαρμογή τάσης συνεχούς ρεύματος στην περίπτωση μονωτικών υλικών, όπως τα οξειδία μετάλλων, θα είχε ως αποτέλεσμα στη συσσώρευση φορτίου στην επιφάνεια του μονωτικού λόγω της σύγκρουσης 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 [21]

2.4 Παραγωγή Νανοσωματιδίων μέσω ιοντοβολής

Η τεχνική παραγωγής νανοσωματιδίων με τη μέθοδο της ιοντοβολής, αποτελεί την μια από τις δύο διαδικασίες της φυσικής εναπόθεσης ατμών (Physical Vapor Deposition – PVD) (η άλλη είναι η εξάχνωση). Η μέθοδος σύνθεσης νανοσωματιδίων που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μπορεί να περιγραφεί ως μια τεχνική «διακοπτόμενης συμπύκνωσης αερίου». Τα νανοσωματίδια παράγονται με τη μέθοδο DC magnetron sputtering, ακολουθούμενη από συμπύκνωση αέριας φάσης. Τελικά τα νανοσωματίδια που παράγονται τείνουν να κατέχουν ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο. Το πλεονάζον ηλεκτρόνιο επιτρέπει τον ηλεκτροστατικό χειρισμό τους. Τα νανοσωματίδια μπορούν να επιταχυνθούν προς το υπόστρωμα παράγοντας μια μεγάλη ποικιλία μορφολογιών, όπως μεμονωμένες νησίδες του υλικού εναπόθεσης μέχρι πολύ λεπτά στρώματα επικάλυψης (υμένια). Το σχήμα των νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες παραμέτρους. Η κεφαλή του magnetron sputtering μετακινείται μέσα στην ζώνη συμπύκνωσης. Όταν μειώνεται η απόσταση από την κεφαλή μέχρι το πρώτο άνοιγμα εκτόνωσης, μειώνεται και η απόσταση και ο χρόνος που συμβαίνει η συμπύκνωση, και ως αποτέλεσμα αυτό έχει να μειώνεται το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων. Η πηγή επιτρέπει την εισαγωγή αερίου (αργό) που θα λειτουργήσει ως φορέας των παραγόμενων νανοσωματιδίων. Καθώς αυξάνεται ο ρυθμός ροής του αερίου παρατηρείται μείωση του μέσου μεγέθους των παραγόμενων νανοσωματιδίων, εξαιτίας της μείωσης του χρόνου παραμονής τους στην ζώνη συσσωμάτωσης. Η πίεση στην ζώνη άντλησης (ή συσσωμάτωσης) των νανοσωματιδίων είναι περίπου 1×10^{-3} mbar ενώ η πίεση στο θάλαμο εναπόθεσης είναι περίπου 5×10^{-5} mbar. Λόγω αυτή 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. [22]

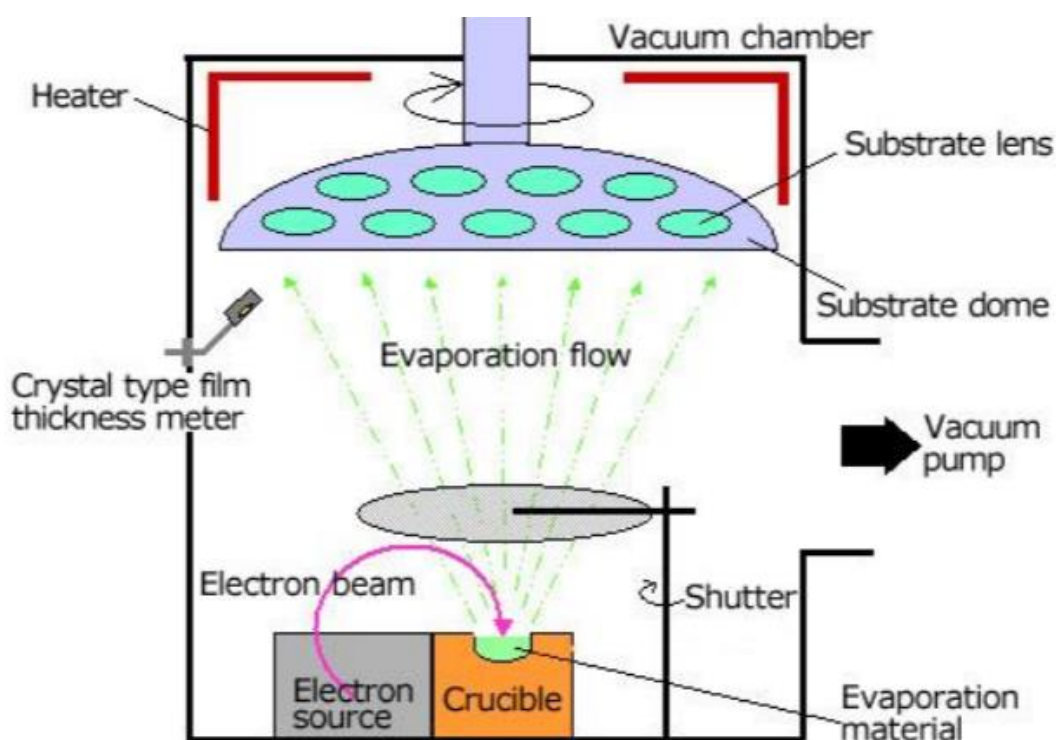


Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παραγωγής νανοσωματιδίων υπό κενό (nanogen) που είναι διαθέσιμη στον τομέα Φυσικής του Ε.Μ.Π. [13]]

2.5 Εξάχνωση μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίων (E-gun evaporation)

Η εξάχνωση με δέση ηλεκτρονίου επιτυγχάνεται οδηγώντας μια δέση ηλεκτρονίων που παράγεται από την θερμιοκτική εκπομπή ηλεκτρονίων μέσω νήματος βολφραμίου, στο στόχο. Ο στόχος βρίσκεται τοποθετημένος στην επιφάνεια μιας υδρόψυκτης θήκης από επινικελωμένο χαλκό. Στην περίπτωση που ο στόχος έχει πολύ υψηλή θερμική αγωγιμότητα, τοποθετείται μέσα σε πυρίμαχος σκεύος ώστε να μονώνεται θερμικά από την υδρόψυκτη θήκη. Η δέση 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 τεχνικής αυτής 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. Μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής εναπόθεσης μετάλλου παράχθηκαν τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδιακών δομών και την κατασκευή των πάσης φύσεως αισθητήρων.[23]



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση e-gun evaporation [20]

2.6 Δομική Ποιότητα ηλεκτροδίων

Για να κατασκευαστούν τα ηλεκτρόδια των αισθητήρων, αρχικά έγινε κατάλληλη τροποποίηση μέσω οπτικής λιθογραφίας ενός υποστρώματος πυριτίου με οξείδιο πάχους 300 nm. Η μάσκα λιθογραφίας είχε διάταξη η οποία περιλάμβανε ηλεκτρόδια με αποστάσεις 10 μm. Έπειτα έγινε επιμετάλλωση των υποστρωμάτων μέσω της τεχνικής εξάχνωσης μετάλλου μέσω δέσμης ηλεκτρονίου όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.5. Στην συνέχεια γίνεται αφαίρεση του περιττού μετάλλου(χρυσού)

μέσω της τεχνικής Lift-off η οποία περιλαμβάνει την τοποθέτηση του δείγματος εντός ακετόνης και λουτρού υπερήχων όπου αφήνεται μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως το περιττό μέταλλο. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την παραμονή στην ακετόνη, για να έχουμε ηλεκτρόδια με όσο το δυνατόν πιο ομαλό και συνεχές προφίλ, χωρίς φυσική επαφή με τα νανοσωματίδια, γίνεται παραμονή των δειγμάτων εντός ακετόνης για τουλάχιστον τρεις ώρες. Με αυτόν τον τρόπο η ακετόνη διαλύει σταδιακά την φωτοευαίσθητη ρητίνη που έχει παραμείνει μετά την οπτική λιθογραφία. [24]

3^ο Κεφάλαιο

Χρήση Βιοαισθητήρων για την Ανίχνευση Βαρέων Μετάλλων-

Βιολογική Τροποποίηση Αισθητήρων

3.1 Βαρέα Μέταλλα

Χρησιμοποιώντας τον όρο «Βαρέα Μέταλλα» κάνουμε μια γενική περιγραφή για κάθε ομάδα μετάλλων ή μεταλλοειδών με ατομικό βάρος μεταξύ 63,5 και 200,6 g/mol και πυκνότητα μεγαλύτερη από 4g/cm³ ή πέντε φορές μεγαλύτερη από το νερό. Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, περισσότερα από 50 στοιχεία του περιοδικού πίνακα μπορούν να ταξινομηθούν ως βαρέα μέταλλα. Ωστόσο, έχει καθιερωθεί ο όρος αυτός να χρησιμοποιείται για τα μεταλλικά/ ημιμεταλλικά στοιχεία που αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία, την χλωρίδα και την πανίδα λόγω των χημικών ιδιοτήτων και της προσβασιμότητάς τους. Αυτός ο ορισμός, όσον αφορά την τοξικότητα περιορίζει τα βαρέα μέταλλα σε 17 στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά περιλαμβάνουν τον υδράργυρο (Hg), το κάδμιο (Cd), το αρσενικό (As), το χρώμιο (Cr), τον μόλυβδο (Pb), τον ψευδάργυρο (Zn), τον χαλκό (Cu), τον σίδηρο (Fe), τον άργυρο (Ag) και το νικέλιο (Ni).

Καθώς η εκπομπή βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον μπορεί να οφείλεται τόσο σε ανθρωπογενείς όσο και φυσικές δραστηριότητες, οργανισμοί όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών όρισαν τα όρια συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο πόσιμο νερό όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 3)

Τα βαρέα μέταλλα υπάρχουν φυσικά στο φλοιό της γης με τη μορφή θειούχων ή οξειδικών μεταλλευμάτων. Κατά τη διάρκεια της εξόρυξης, ορισμένα βαρέα μέταλλα αφήνονται ως απόβλητα στους λάκκους εξόρυξης και εκτίθενται στον άνεμο και στις πλημμύρες αποτελώντας σοβαρή απειλή για το περιβάλλον. Άλλες σημαντικές πηγές εκπομπών περιλαμβάνουν τη διαδικασία τήξης και εξευγενισμού σε χυτήρια, τα λύματα που απελευθερώνονται από ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση, και τα υποπροϊόντα της καύσης. Εκτός από τις βιομηχανικές διαδικασίες, τα βαρέα μέταλλα μπορούν επίσης να εκπέμπονται στο περιβάλλον μέσω των καυσαερίων των

αυτοκινήτων και τα οικιακά απορρίμματα. Δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται ευρέως στις χρωστικές ουσίες, στα λιπάσματα, στα καλλυντικά προϊόντα, στις μπαταρίες και στα ηλεκτρονικά, μπορεί επίσης να μολύνουν το έδαφος και τα ποτάμια λόγω της διαρροής τους σε χώρους υγειονομικής ταφής.

Σε σύγκριση με την ενσωμάτωση στα αιωρούμενα ιζήματα, η επιβλαβής επίδραση των βαρέων μετάλλων είναι μεγαλύτερη όταν διαλύονται στο νερό λόγω της κινητικότητας και της αντιδραστικότητας των μορίων τους γι' αυτό και η ανίχνευση τους εκεί κρίνεται απαραίτητη.[25]

	Atomic weight (g/mol)	Density at r.t (g/cm ³)	Guideline value (μg/l)	Detection limit by conventional techniques
Cadmium (Cd)	112.41	8.65	3	0.01 μg/l by ICP-MS 2 μg/l by flame AAS
Mercury (Hg)	200.59	13.534	6	0.05 μg/l by cold vapor AAS 0.6 μg/l by ICP 5 μg/l by flame AAS
Lead (Pb)	207.2	11.34	10	1 μg/l by AAS practical quantification limit in the region of 1-10 μg/l
Arsenic (As)	74.92	5.727	10	0.1 μg/l by ICP-MS 2 μg/l by hydride generation AAS or flame AAS
Chromium (Cr)	51.9961	7.19	50	0.05-0.2 μg/l for total chromium by AAS
Nickel (Ni)	58.6934	8.908	70	0.1 μg/l by ICP-MS 0.5 μg/l by flame AAS 10 μg/l by ICP-OES
Copper (Cu)	63.546	8.96	2000	0.02-0.1 μg/l by ICP-MS 0.3 μg/l by ICP-OES 0.5 μg/l by flame AAS
Zinc (Zn)	65.38	7.14	3000*	-
Iron (Fe)	55.845	7.874	-**	-

Πίνακας 3: Βασικά στοιχεία Βαρέων Μετάλλων [25]

Ο μόλυβδος (Pb) αποτελεί ένα από τους κυριότερους ρύπους του περιβάλλοντος. Η εκπομπή του γίνεται δια μέσου πολλών ανθρώπινων δραστηριοτήτων με τις κύριες πηγές του να αποτελούν τα μεταλλωρυχεία, η εκπομπή καυσαερίων από τις μηχανές εσωτερικής καύσης, τα λιπάσματα και τα προϊόντα βιολογικού καθαρισμού που χρησιμοποιούνται στα γεωργικά εδάφη, καθώς βρίσκεται και σε καθημερινά πράγματα όπως είναι η χρησιμοποιημένες μπαταρίες. Ο μόλυβδος συσσωρεύεται

κυρίως στα επιφανειακά στρώματα των εδαφών και έχει πολύ μεγάλη υπολειμματικότητα σε σχέση με τους άλλους ρύπους. Μπορεί να θέσει έναν σημαντικό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου εάν συσσωρευτεί στο σώμα του. Αρχικά απορροφάτε μέσω των πνευμόνων και του στομαχιού. Τα μόρια του μολύβδου περνούν μέσω της αναπνευστικής οδού πάνω στους πνεύμονες, όπου μαζί με το οξυγόνο υποβάλλονται σε μια επεξεργασία με αποτέλεσμα την εισαγωγή του μολύβδου στην κυκλοφορία του αίματος. Η χρόνια έκθεση ή η υπερβολική πρόσληψη μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό, από οξεία δηλητηρίαση μέχρι νευρολογικά, καρδιακά, αναπαραγωγικά και αναπτυξιακά προβλήματα. [26], [27], [28]

Το χρώμιο(Cr) ανήκει ταυτόχρονα στα βαρέα μέταλλα και στα ιχνοστοιχεία και συγκαταλέγεται και στις δύο αυτές κατηγορίες, καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο των ζώντων οργανισμών, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικό. [29] Το χρώμιο μπορεί να εμφανιστεί σε πολλές καταστάσεις οξειδωσης, με αριθμούς οξειδωσης από -2 έως +6. Ωστόσο, το τρισθενές χρώμιο, Cr (III), και το εξασθενές χρώμιο, Cr (VI), είναι πιο σταθερές καταστάσεις οξειδωσής του και έτσι απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον. [30]

Οι κύριες φυσικές εκπομπές χρωμίου στην ατμόσφαιρα προέρχονται από μεταφορά σωματιδίων του εδάφους μέσω του ανέμου και από ηφαίστεια. Επίσης, φυσικές εκπομπές χρωμίου στην ατμόσφαιρα οφείλονται στα θαλάσσια αερολύματα, στις δασικές πυρκαγιές και σε βιογενείς εκπομπές.[31] Το χρώμιο της ατμόσφαιρας, εξασθενές ή τρισθενές, κατακάθεται στο έδαφος ή σε υδατικά συστήματα.

Το χρώμιο είναι βασικό θρεπτικό συστατικό και ταυτόχρονα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Γενικά η έκθεση του ανθρώπου σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου είναι πάντα τοξική. Ωστόσο, η τοξικότητα εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Το εξασθενές χρώμιο θεωρείται πολύ τοξικό, καθώς προκαλεί διάφορες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως έλκη, ερεθισμούς στα μάτια και στο δέρμα, δυσλειτουργία των νεφρών και καρκίνο των πνευμόνων. Αντιθέτως, το τρισθενές χρώμιο θεωρείται απαραίτητο για την υγεία, σε συγκεκριμένες δόσεις. Εκτός από το εξασθενές και το τρισθενές χρώμιο,

επιπτώσεις στην υγεία ή θρεπτικά οφέλη έχουν και άλλες οξειδωτικές καταστάσεις, αυτές του δισθενούς χρωμίου και του μεταλλικού χρωμίου. [32]

3.2 Χρήση DNAzymes σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση Βαρέων Μετάλλων

Η ανακάλυψη των DNAzymes κατέστη δυνατή χάρη της εφεύρεσης της “in vitro επιλογής” και της SELEX τεχνικής (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). [33]

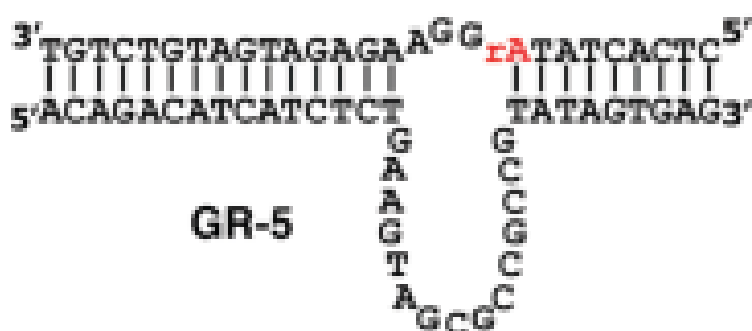
Τα DNAzymes είναι νουκλεϊκά οξέα μονόκλωνου DNA που είναι ικανά να καταλύουν χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως οξειδωτικές αποκαταστάσεις, υδρόλυσης, φωσφοδιεστερικής διάσπασης και άλλες. Τα DNAzymes είναι μια εργαστηριακή ανακάλυψη και η κύρια διαφορά τους με τα συμβατικά ένζυμα που βρίσκονται στον φυσικό κόσμο, είναι ότι είναι κατασκευασμένα από DNA αντί για πρωτεΐνες.

Τα DNAzymes αναφέρονται αλλιώς ως ένζυμα DNA, η καταλυτικό DNA ή δεοξυριβόζυμα και θεωρούνται ένας σημαντικός τύπος λειτουργικού DNA, που έχει τεθεί στο επίκεντρο της έρευνας καθώς παρουσιάζουν τις παρακάτω ιδιότητες:

- *Αναγνώριση συγκεκριμένων ακολουθιών. Τα DNAzymes μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένες ακολουθίες DNA ή RNA και να συνδεθούν με αυτές. Αυτή η ιδιότητα τους τους καθιστά χρήσιμα για την ανίχνευση και αναγνώριση συγκεκριμένων γονιδίων.*
- *Ικανότητα διάσπασης της δίκλωνης έλικας.*
- *Ευαισθησία στις συνθήκες περιβάλλοντος. Μπορούν να ανταποκριθούν σε αλλαγές στις φυσικές και χημικές συνθήκες περιβάλλοντος. Αυτό τους καθιστά χρήσιμους για την ανίχνευση και παρακολούθηση αλλαγών στο περιβάλλον. [34], [35]*

Ένα από τα DNAzymes που χρησιμοποιούμε στην παρούσα εργασία ονομάζεται GR-5 και η δομή παρουσιάζεται στην Εικόνα (10). Πρόκειται για το πρώτο DNAzyme που ανακαλύφθηκε το 1994 από τους Breaker και Joyce. Το GR5 έχει 15 νουκλεοτίδια στον καταλυτικό βρόχο και το υπόστρωμα του περιέχει έναν μόνο δεσμό RNA που χρησιμεύει ως θέση διάσπασης. [36]

Το Gr5 θεωρείται εξαιρετικό για την ανίχνευση των μολύβδου καθώς σε σύγκριση με άλλα DNAzymes τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια ή ίδια αλληλουχία (πχ 17E) προσφέρει υψηλότερη επιλεκτικότητα και βελτιωμένο όριο ανίχνευσης. [33] Το GR-5 καταλύει την αντίδραση διάσπασης του RNA υπό την παρουσία του βαρέος μετάλλου του μολύβδου (Pb^{2+}), με ρυθμό κατάλυσης περίπου 1 min^{-1} σε θερμοκρασία 23°C και pH ίσο με 7. Αυτός ο ρυθμός είναι περίπου 105 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.



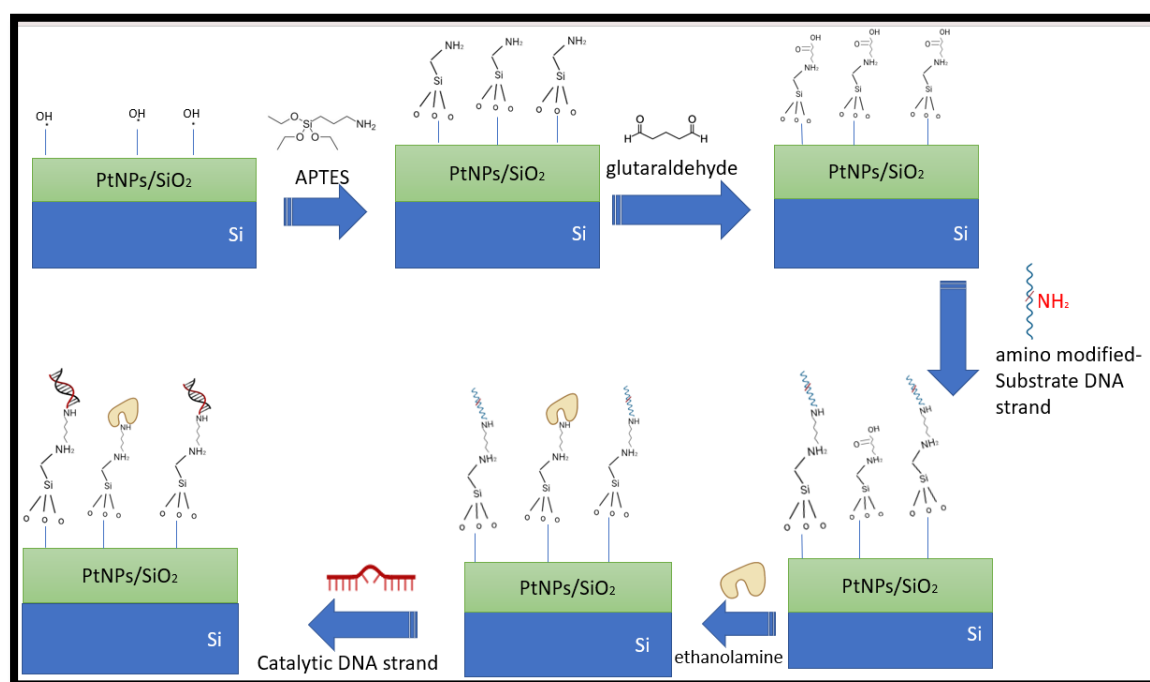
Εικόνα 10: Δομή του DNAzyme GR-5. Το σημείο που 'ανοίγει' η αλυσίδα είναι η θέση διάσπασης.

Τα DNAzymes διαθέτουν διάφορες φυσικές και χημικές ιδιότητες που τα καθιστούν ελκυστικά ως βασικά συστατικά βιοαισθητήρων. Τα DNAzymes που ανταποκρίνονται στον στόχο, μπορούν να χρησιμεύσουν ως εξαιρετικά στοιχεία μοριακής αναγνώρισης, καθώς τα εν λόγω ένζυμα λαμβάνονται in vitro σε δοκιμαστικό σωλήνα, και έτσι παρέχουν υψηλή συγγένεια απέναντι στον στόχο, υψηλή επιλεκτικότητα απέναντι σε άλλους στόχους καθώς και ταχεία δέσμευση. 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 τα οποία χρησιμοποιούνται και στην παρούσα εργασία.[37], [38], [39].

3.3 Πρωτόκολλα ακινητοποίησης DNAzymes

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι για την τροποποίηση των επιφανειών των αισθητήρων. Στην πρώτη μέθοδο χρησιμοποιούμε DNAzymes τα οποία είναι τροποποιημένα με ομάδες αμίνης, ενώ στην δεύτερη DNAzymes τροποποιημένα με ομάδες θειόλης. [40]

3.3.1 Amino modified DNAzymes.



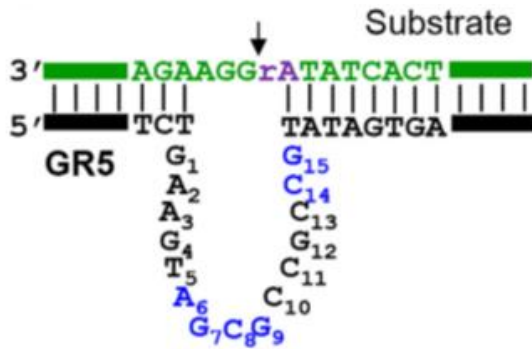
Εικόνα 11: Απεικόνιση διαδικασίας ακινητοποίησης DNAzymes με αμινομάδες

Για την τεχνική ακινητοποίησης άμινο-τροποποιημένου DNA εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα βήματα:

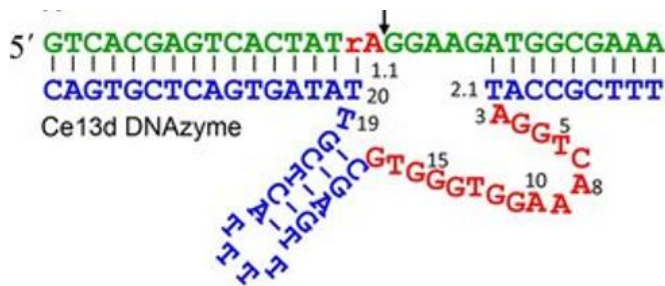
- Ενεργοποίηση της επιφάνειας SiO₂ με πλάσμα οξυγόνου, έτσι ώστε η επιφάνεια να γίνει υδρόφιλη.
- Σιλανοποίηση.[41] Στην διαδικασία αυτή δημιουργούνται ρίζες αλκοξυσιλανίου, το οποίο είναι απαραίτητο για το επόμενο βήμα της διαδικασίας που δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της γλουταραλδεΐδης με τα μόρια του αλκοξυσιλανίου. Το αμινοσιλάνιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την διαδικασία ονομάζεται APTES (3-Aminopropyl triethoxysilane).

Το πρωτόκολλο το οποίο ακολουθείται για αυτήν την διαδικασία περιλαμβάνει τα εν συνεχεία βήματα. Αρχικά παρασκευάζεται ένα διάλυμα με περιεκτικότητα 95% αιθανόλη και 5% νερό. Έπειτα παρασκευάζεται ένα νέο διάλυμα το οποίο περιέχει 5% APTES και 95% από το προηγούμενο διάλυμα που κατασκευάσαμε. Κάθε αισθητήρας εισάγεται ξεχωριστά σε δικό του falcon και η βηματική διαδικασία που ακολουθείται είναι εισαγωγή υπολογισμένης ποσότητας 95% του πρώτου διαλύματος, έπειτα εισαγωγή του αισθητήρα και τέλος υπολογισμένη ποσότητα 5% του APTES. Κάθε falcon ανακινείται ελαφρώς και τα δείγματα παραμένουν σε συνθήκες σκότους για 2 ώρες. Έπειτα από αυτό γίνονται διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με το πρώτο διάλυμα που παρασκευάστηκε, στέγνωμα με άζωτο, και οι αισθητήρες τοποθετούνται στους 110°C για 1 ώρα.

- Στο τελευταίο βήμα για την τροποποίηση της επιφάνειας, η γλουταραλδεϋδη διαλύεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα PBS1x (Phosphate Buffered Saline M, pH=7,5 , tween 0,001%) σε ποσοστό 5%. Οι αισθητήρες παραμένουν σε αυτό το διάλυμα για 1 ώρα και έπειτα ξεπλένονται με το ίδιο ρυθμιστικό PBS1x, απιονισμένο νερό και να στεγνώνονται με άζωτο.
- Στην συνέχεια, γίνεται η ακινητοποίηση του DNAzyme πάνω στην ενεργό περιοχή των αισθητήρων, δηλαδή στην επιφάνεια των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων. Για κάθε μέταλλο ανίχνευσης υπάρχει και ένα διαφορετικό DNAzyme όπως φαίνεται και τις παρακάτω εικόνες. Συγκεκριμένα για τα ιόντα μολύβδου χρησιμοποιήθηκε το GR5 όπως αναφέραμε και πριν και για τα ιόντα τρισθενούς χρωμίου 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.



Εικόνα 12: Η αλληλουχία του GR5 για την ανίχνευση ιόντων μολύβδου.



Εικόνα 13: Το DNAzyme Ce13d για την ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου.

Για να γίνει η ακινητοποίηση του DNAzyme στους αισθητήρες, αρχικά τοποθετείται το DNA – υπόστρωμα (substrate DNA) , το οποίο προσδένεται 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. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται γι' αυτό είναι dropcasting 1μL στα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια του αισθητήρα του substrate DNA, διαλυμένου εντός ρυθμιστικού διαλύματος PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8.5, 0.001% tween), σε συγκέντρωση 5μM, και αναμονή μίας ώρας εντός περιβάλλοντος υγρασίας. Έπειτα γίνονται διαδοχικές πλύσεις με PB, απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.

Μετά την ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ της γλουταραλδεϋδης και του υποστρώματος DNA οι υπόλοιπες ενεργοποιημένες καρβοξυλικές ομάδες πρέπει να μπλοκαριστούν προκειμένου να αποφευχθεί η ομοιοπολική σύνδεση των αλυσίδων DNA μεταξύ τους. Γι' αυτό τον σκοπό χρησιμοποιείται η αιθανολαμίνη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8,5, 0,001% tween), σε συγκέντρωση 10μM. Για να παρασκευαστεί αυτό το διάλυμα γίνεται ανάμιξη 3μL EA (ethanolamine)

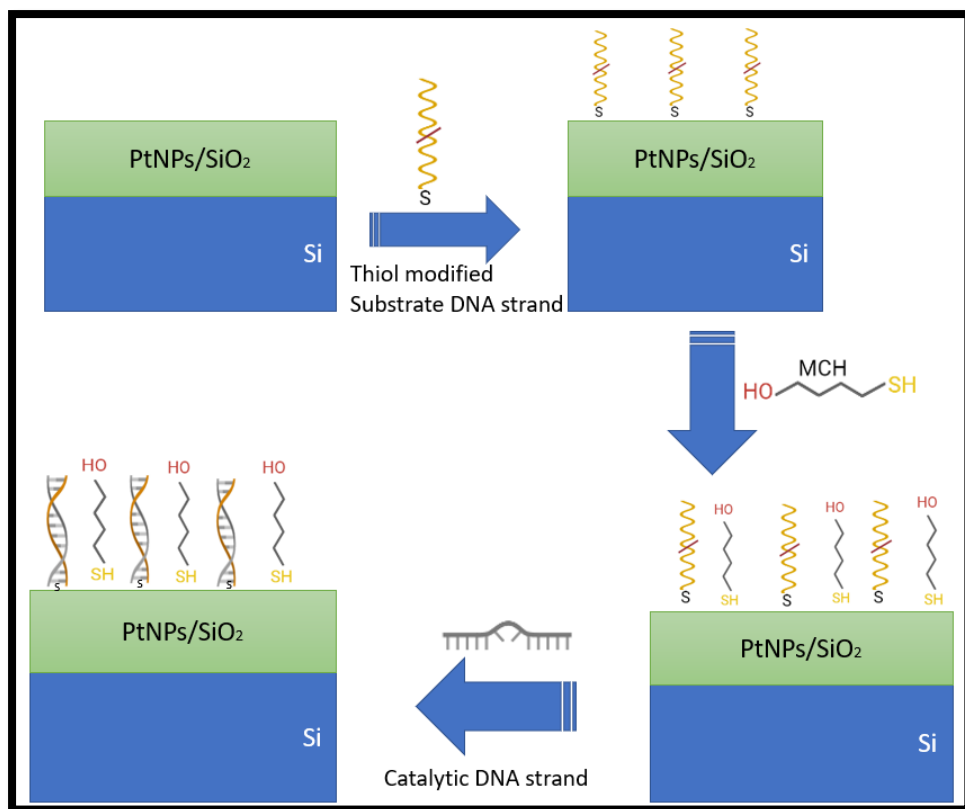
εντός 5mL buffer. Το διάλυμα αυτό εισάγεται και πάλι μέσω dropcasting στα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια των αισθητήρων σε ποσότητα 1μL στον καθένα και αφήνεται για 1 ώρα σε τρυβλία σε περιβάλλον υγρασίας. Μετά το πέρας της 1 ώρας οι αισθητήρες ξεπλένονται διαδοχικά με PB, έπειτα με απιονισμένο νερό και στο τέλος στεγνώνονται με άζωτο.

Το τελευταίο βήμα για να ολοκληρωθεί η ακινητοποίηση του DNAzyme πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος είναι ο υβριδισμός των αλληλουχιών του DNAzyme με τις ακινητοποιημένες αλυσίδες του substrate-DNA. Έτσι λοιπόν, ακολουθούμε την ίδια διαδικασία με πριν και μέσω dropcasting στα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια των αισθητήρων σε ποσότητα 1μL τοποθετούμε το ενζυματικό DNA, έπειτα ξεπλένουμε τα δείγματα με το ρυθμιστικό διάλυμα, έπειτα με απιονισμένο νερό και τέλος στεγνώνουμε με άζωτο. Αξίζει να αναφέρουμε σε αυτό το σημείο ότι το ενζυματικό DNA είναι διαλυμένο είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (50mM MOPS/25 mM NaCl, pH=7.5) για την περίπτωση ανίχνευσης Pb^{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 και αντίστοιχα στο ξέπλυμα κάθε αισθητήρα χρησιμοποιούμε και τον αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα.

Οι σχηματικές αναπαραστάσεις όλων των DNAzymes που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στις Εικόνες 12,13.

3.3.2 Thiol Modified DNAzymes

Η διαδικασία ακινητοποίησης του τροποποιημένου με ομάδες θειόλης DNAzyme είναι πιο απλή από την προηγούμενη με τις ομάδες αμίνης που περιγράψαμε καθώς δεν υπάρχει η τροποποίηση της επιφάνειας στην αρχή.



Εικόνα 14: Απεικόνιση διαδικασίας ακινητοποίησης DNAzymes με ομάδες θειόλης

- Αρχικά γίνεται η ακινητοποίηση του υποστρώματος DNA (DNA substrate) το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PB (Phosphate Buffer 1M, pH=8, 0.001% tween20), σε συγκέντρωση 5μM. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για να συμβεί αυτό είναι θέρμανση του substrate DNA στους 95 °C για 5 λεπτά και έπειτα τοποθέτηση αυτού στα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια του αισθητήρα μέσω dropcasting σε ποσότητα 1μL στο καθένα. Τα δείγματα παραμένουν σε τρυβλία σε περιβάλλον υγρασίας overnight, και έπειτα ξεπλένονται με PB, απιονισμένο νερό και στεγνώνονται με άζωτο.
- Το επόμενο βήμα είναι το blocking, όπου όπως και πριν με την αιθανολαμίνη, γίνεται dropcasting 6-mercapto-1-hexanol (MCH) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PB (παρασκευή διαλύματος με ανάμιξη 7 μL MCH εντός 5 mL PB). Ο λόγος που υπάρχει αυτό το βήμα είναι ο ίδιος με το αντίστοιχο στην amino modified τεχνική, δηλαδή να μπλοκαριστεί η δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των ακινητοποιημένων αλυσίδων του υποστρώματος DNA και να απομακρυνθούν μη δεσμευμένες αλυσίδες DNA. Αυτό το βήμα ολοκληρώνεται με το διαδοχικό ξέπλυμα των αισθητήρων με PB, απιονισμένο

νερό και στέγνωμα με άζωτο (μετά από μια ώρα αναμονή σε τρυβλίο με περιβάλλον υγρασίας).

- Το τελευταίο βήμα είναι όπως και πριν η υβριδοποίηση των δυο αλυσίδων(του ενζυματικού DNA και του DNA υποστρώματος). Το ενζυματικό DNA αναλόγως τα ιόντα του βαρέος μετάλλου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, είναι διαλυμένο είτε σε MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (50mM MOPS/25 mM NaCl, pH=7.5) για την περίπτωση ανίχνευσης Pb^{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 διαδικασία της υβριδοποίησης γίνεται με dropcasting στα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια κάθε αισθητήρα σε ποσότητα 1μL, αναμονή μιας ώρα σε τρυβλίο σε περιβάλλον υγρασίας και έπειτα ξέπλυμα του κάθε αισθητήρα που αντιστοιχεί στο εκάστοτε μέταλλο προς ανίχνευση, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.

4^ο Κεφάλαιο

Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης

4.1 Εισαγωγή

Η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία Εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy – EIS) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται τόσο στον τομέα των βιοαισθητήρων όσο και σε πολλούς τομείς της ηλεκτροχημείας όπως, στην κινητική των ηλεκτροδιακών δράσεων, στη μελέτη της ηλεκτρικά φορτισμένης διπλοστοιβάδας, στις μπαταρίες, στη μελέτη της διάβρωσης των υλικών κ.α. Χαρακτηριστικά παραδείγματα στον τομέα των βιοαισθητήρων αποτελούν οι φορητές συσκευές ηλεκτροχημικής ανίχνευσης οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε περιβαλλοντικούς ελέγχους, στην βιομηχανία τροφίμων αλλά και σε κλινικές διαγνώσεις. Όσον αφορά τις τελευταίες οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι οι οικιακές εξετάσεις γλυκόζης για την παρακολούθηση του διαβήτη. Από όλες τις ηλεκτροχημικές μεθόδους η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης είναι από τις πιο πολύπλοκες που προσφέρει όμως αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της συνήθως χρησιμοποιούμενης αμπερομετρίας/ποτενσιομετρίας. Ειδικότερα όταν πρόκειται για την κατασκευή βιοαισθητήρων οι μέθοδοι της εμπέδησης θεωρούνται πολύ ισχυρά εργαλεία καθώς πρόκειται για μεθόδους που έχουν μικρό λόγο σήματος προς θόρυβο, παρουσιάζουν ευκολία στην ανίχνευση ουσιών σε μικρούς χρόνους απόκρισης και έχουν χαμηλό κόστος. Πολύ συχνά η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης συνδυάζεται με διάφορες νανοδομημένες επιφάνειες (π.χ. νανοσωματίδια χρυσού/πλατίνας , νανοσωλήνες άνθρακα κ.α.) και έτσι επιτυγχάνονται χαμηλά όρια ανίχνευσης λόγω της αύξησης του λόγου της επιφάνειας ως προς τον όγκο, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ηλεκτρική αγωγιμότητα των αισθητήριων διατάξεων, την πρόσβαση του αναλύτη στους βιουποδοχείς και την ηλεκτροκατάλυση. [42]

4.2 Βασικές αρχές ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης

Ο λόγος που χρησιμοποιείται ο όρος φασματοσκοπία δεν έχει καμία σχέση με την ακτινοβολία, αλλά καθώς η μέτρηση μιας απόκρισης σε ένα ηλεκτρικό σήμα δεν γίνεται σε σχέση με τον χρόνο αλλά με την συχνότητα, ο όρος αυτός έγκειται στο εύρος συχνοτήτων το οποίο μελετάται. [43]

Κατά την διαδικασία της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης, εφαρμόζεται μια ημιτονοειδής τάση σε ένα σταθερό δυναμικό και δημιουργείται ένα εναλλασσόμενο ρεύμα. Οι τύποι που εκφράζουν την τάση και το ρεύμα είναι οι εξής:

$$V=V\sin(\omega t) \quad (4.1) \quad \text{και}$$

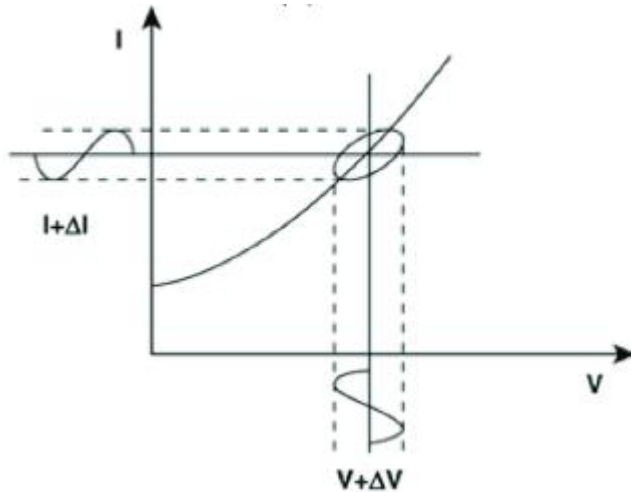
$$I=I\sin(\omega t+\phi) \quad (4.2)$$

όπου $\omega=2\pi f$, η γωνιακή συχνότητα σε rad/s , f η συχνότητα σε Hz και ϕ η διαφορά φάσης μεταξύ ρεύματος και τάσης.

Αν παρατήσουμε τα παραπάνω μεταβαλλόμενα ημιτονοειδώς μεγέθη με μιγαδικούς αριθμούς, ο λόγος τους θα μας δώσει την σύνθετη η μιγαδική αντίσταση

$$Z=V/I \quad (4.3)$$

Εάν το εφαρμοζόμενο ημιτονοειδές σήμα απεικονιστεί στον άξονα x και το ημιτονοειδές σήμα απόκρισης στον άξονα y , το αποτέλεσμα που θα προκύψει είναι ένα διάγραμμα Lissajous. Πριν από την ύπαρξη των σύγχρονων οργάνων EIS η ανάλυση μέσω των διαγραμμάτων Lissajous ήταν ο μόνος τρόπος για την μέτρηση της σύνθετης αντίστασης. [44] , [45], [47]



Εικόνα 15: Διάγραμμα Lissajous [46]

Η εμπέδηση ορίζεται ως το μιγαδικό μέγεθος της αντίστασης του ηλεκτρικού ρεύματος και παριστά τόσο την δυσκολία του φορτίου να μετακινηθεί στο μέσο, όσο και το παραμένον πεδίο που δημιουργείται στο μέσο λόγω της εφαρμογής διαφοράς δυναμικού. Σε μια εναλλασσόμενη πηγή η εμπέδηση θα εξαρτιόταν μόνο από την ένταση του δυναμικού που θα εφαρμόζαμε αν το μέσο στο οποίο διαδιδόταν το πεδίο είχε φορείς που έχουν ιδανικές ιδιότητες όπως τέλεια ελαστική κρούση μεταξύ τους και άμεσο προσανατολισμό με το εξωτερικό επιβαλλόμενο πεδίο.[43]

Γενικότερα η εμπέδηση είναι η απόκλιση που θα είχε το σήμα εξόδου σε σχέση με το σήμα εισόδου λόγω παρεμβολής ενός αντιστάτη, ενός πηνίου ή ενός πυκνωτή. Ως μαθηματική έκφραση αναπαρίσταται ως ένας μιγαδικός αριθμός που το πραγματικό του μέρος ονομάζεται αντίσταση Z_{RE} και εκφράζει την ωμική συνιστώσα της αντίστασης, και το φανταστικό μέρος X_{im} ονομάζεται αντίδραση και εκφράζει την επαγωγική ή χωρητική συνιστώσα της αντίστασης[48]. Σύμφωνα με τα παραπάνω η μιγαδική εμπέδηση δίνεται από την σχέση:

$$Z=R+jX \quad (4.4)$$

στην καρτεσιανή μορφή και

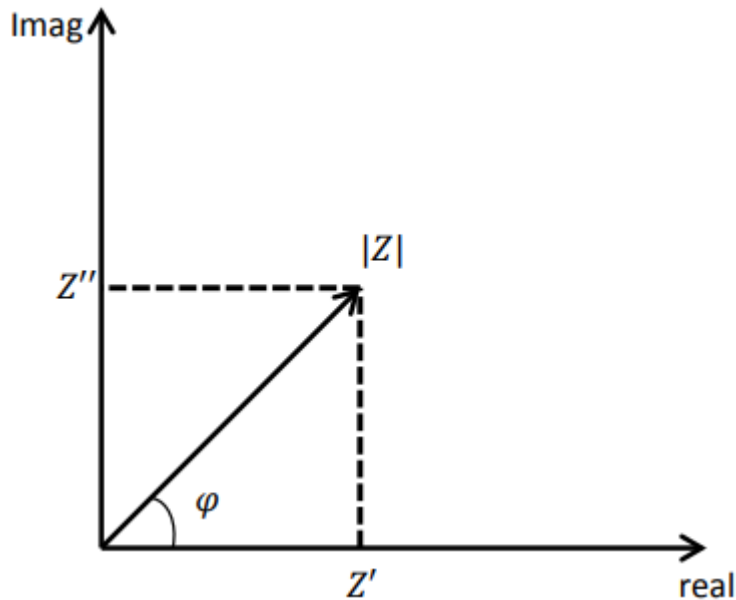
$$Z=r e^{j\phi} \quad (4.5)$$

στην εκθετική μορφή

και επομένως το μέτρο της σύνθετης εμπέδησης υπολογίζεται από την σχέση :

$$|Z| = (Z_{RE}^2 + X_{im}^2)^{1/2} \quad (4.6)$$

Το όρισμα της Z υπολογίζεται από την σχέση $\phi = \arctan(X/R)$ και εκφράζει την διαφορά μεταξύ ρεύματος και τάσης.



Εικόνα 16: Απεικόνιση του μέτρου της εμπέδησης και της διαφοράς φάσης ϕ .

4.3 Διαγράμματα Εμπέδησης

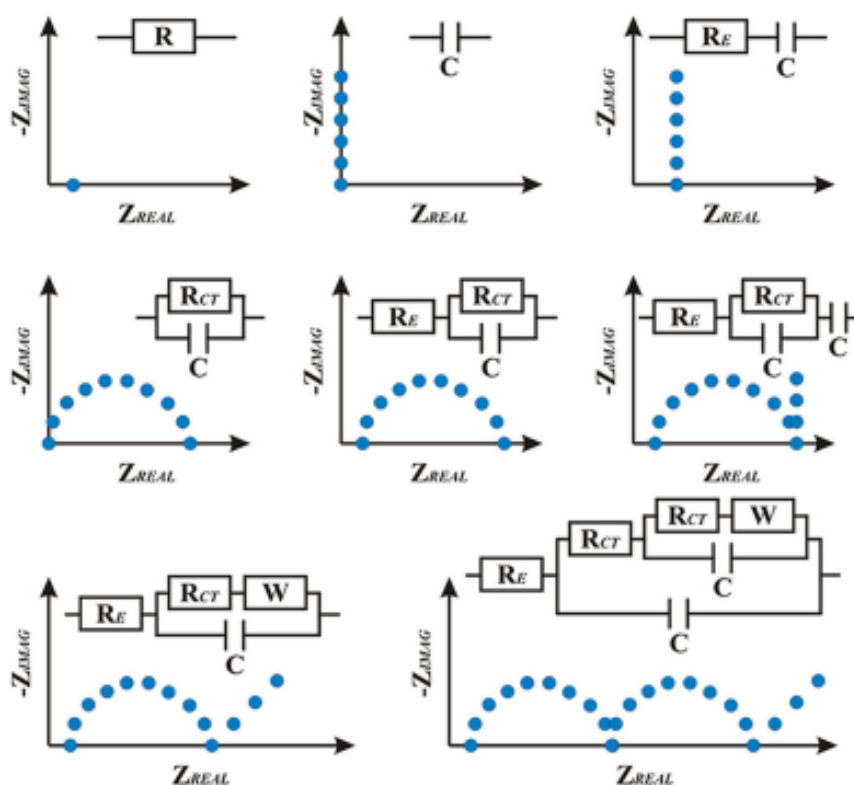
Από την ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης μπορούμε να υπολογίσουμε το πραγματικό και το φανταστικό μέρος της σύνθετης εμπέδησης. Για να εξάγουμε πληροφορίες για τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά ενός υπό μελέτη συστήματος, υπάρχουν δυο ειδών διαγράμματα που μπορούν να κατασκευαστούν και τα οποία αναλύονται παρακάτω. [50], [51]

4.3.1 Διαγράμματα Nyquist

Με τα διαγράμματα Nyquist παριστάνουμε γραφικά το φανταστικό μέρος της εμπέδησης σε συνάρτηση με το πραγματικό για ένα εύρος συχνοτήτων. Τα διαγράμματα αυτά είναι από τα σημαντικότερα που μπορούν να προκύψουν από τις μετρήσεις τις εμπέδησης, καθώς εξάγουμε τα ηλεκτρικά κυκλώματα που αντιστοιχούν στο σύστημα το οποίο μελετάμε. Η καμπύλη που προκύπτει σε ένα διάγραμμα Nyquist αντιστοιχεί σε ένα κύκλωμα, δηλαδή απεικονίζει μέσα από την

μορφή της τον συνδυασμό των στοιχείων ενός κυκλώματος. Ωστόσο, η ακριβής ερμηνεία των δεδομένων είναι ιδιαίτερα δύσκολη όταν λαμβάνονται μη ιδανικά διαγράμματα Nyquist κατά την διάρκεια ενός πειράματος. Τυπικές μορφές ενός διαγράμματος Nyquist για διάφορα κυκλώματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (17). [52], [53]

Στα παρακάτω σχήματα η R είναι μια ωμική αντίσταση (μόνο το πραγματικό μέρος της σύνθετης αντίστασης), το C ένας πυκνωτής, το R_E η αντίσταση ηλεκτρολύτη, η R_{CT} η αντίσταση μεταφοράς φορτίου της διεπιφάνειας και το W το στοιχείο Warburg, τα οποία θα εξηγήσουμε αναλυτικά και παρακάτω.

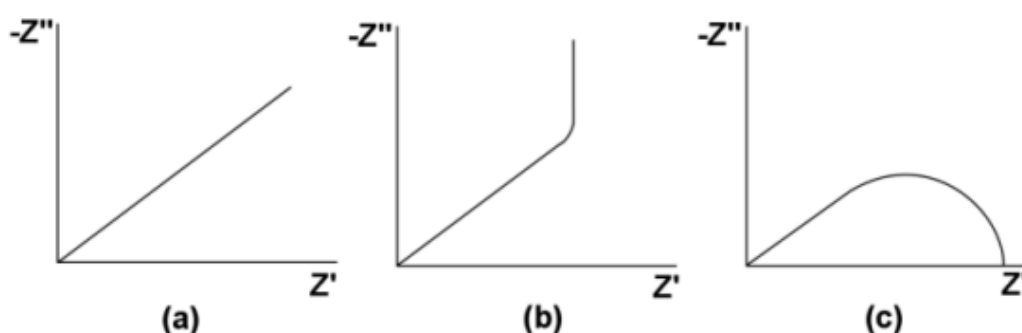


Εικόνα 17: Τυπικά Διαγράμματα Nyquist για διάφορα ηλεκτρικά κυκλώματα

Εκτός από την αναγνώριση του αντίστοιχου ηλεκτρικού κυκλώματος το διάγραμμα Nyquist, μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε σημαντικές μεταβλητές και σταθερές του συστήματος που μελετάται. Για μεγάλες τιμές της συχνότητας η χωρητική συμπεριφορά μηδενίζεται και αυτό που μένει είναι μια αντίσταση στη μεταφορά του φορτίου που είναι ανεξάρτητη της συχνότητας που επιδρά στο ηλεκτροχημικό μας σύστημα. Αυτή η αντίσταση στη μεταφορά του φορτίου οφείλεται στον ηλεκτρολύτη λόγω μεταφοράς ιόντων μέσα στο διάλυμα. Από την άλλη πλευρά, όταν φτάνουμε σε

πολύ χαμηλές συχνότητες, η αντίσταση στη μεταφορά του ρεύματος οφείλεται μόνο σε αντίσταση και η εμπέδηση τέμνει τον άξονα των πραγματικών και δεν έχει χωρητικές ιδιότητες.[49], [54]

Τις περισσότερες φορές τα ημικύκλια που συναντάμε δεν έχουν την τέλεια μορφή αλλά εμφανίζονται παραμορφωμένα. Στην παρακάτω εικόνα παρατηρούμε τρεις χαρακτηριστικές καμπύλες που αναφέρονται σε τρία βασικά είδη εμπέδησης που συναντάμε κατά τις μετρήσεις συστημάτων που η διάχυση των φορέων είναι αρκετά έντονη.



Εικόνα 18: Τύποι εμπέδησης σε συστήματα διάχυσης

(a) Ημι-άπειρη διάχυση: Σε ένα τέτοιο σύστημα παρατηρούμε ότι η εμπέδηση είναι μία ευθεία γραμμή με κλίση $\pi/4$ στο μιγαδικό επίπεδο. Αυτή η εμπέδηση ονομάζεται εμπέδηση στοιχείου Warburg.

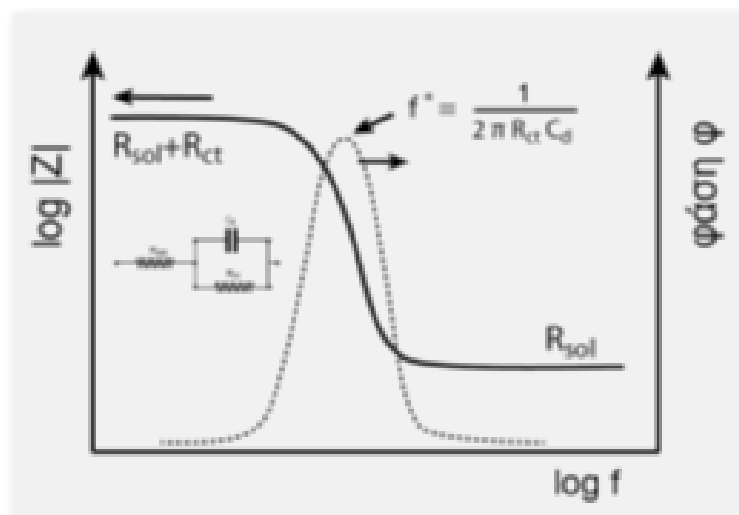
(b) Αυτού του είδους η εμπέδηση καταλήγει σε ένα ανοικτό κύκλωμα και συνήθως συναντάται όταν εξετάζονται επιφάνειες πολυμερών ή πορωδών επιφανειών.

(c) Η τελευταία εμπέδηση της εικόνας καταλήγει σε μία πολύ μεγάλη αντίσταση και αναφέρεται σε ένα ηλεκτρόδιο το οποίο παθητικοποιείται.[51]

4.3.2 Διαγράμματα Bode Plot

Τα διαγράμματα αυτά προκύπτουν αν παραστήσουμε γραφικά το μέτρο της εμπέδησης σε συνάρτηση με την συχνότητα ή την φάση μεταξύ του πραγματικού και του φανταστικού μέρους της εμπέδησης σε συνάρτηση με την συχνότητα. Αν και δεν μας δίνουν πληροφορίες για την φύση των στοιχείων ενός κυκλώματος όπως τα Nyquist, τα Bode plot διαγράμματα μας δίνουν πληροφορίες για τον αριθμό των στοιχείων από τα οποία αποτελείται ένα κύκλωμα, όπως επίσης μας δίνουν και την

δυνατότητα να χαρακτηριστούν σημαντικά μεγέθη όπως η σταθερά χαλάρωσης τ του κυκλώματος, να υπολογιστούν μεγέθη όπως η χωρητικότητα C και η σταθερά αυτεπαγωγής L . [54]



Εικόνα 19: Χαρακτηριστικό διάγραμμα Bode plot

4.4 Στοιχείο σταθερής φάσης CPE

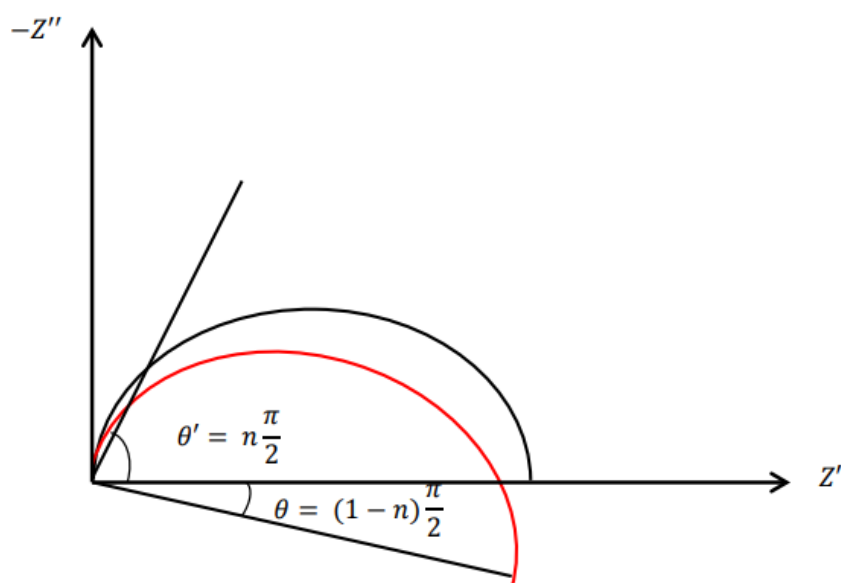
Τα αποτελέσματα της σύνθετης αντίστασης για μια διεπιφάνεια στερεού ηλεκτροδίου- ηλεκτρολύτη, συχνά αποκαλύπτουν μια διασπορά συχνοτήτων που δεν μπορεί να περιγραφεί από απλά στοιχεία όπως αντιστάσεις, πυκνωτές και πηνία. Η διασπορά συχνοτήτων αποδίδεται σε μια «διασπορά χωρητικότητας» η οποία εκφράζεται με βάση ένα στοιχείο σταθερής φάσης CPE. [55]

Σε ένα ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο η εμπέδηση του αποτελείται από την χωρητικότητα διπλοστοιβάδας και την αντίσταση που παρουσιάζει το διάλυμα, κάτι που δεν συμβαίνει σε ένα πραγματικό ηλεκτρόδιο καθώς το πεδίο στην επιφάνεια του δεν μπορεί να είναι ομοιόμορφο. Τα μεγέθη ηλεκτρικών ιδιοτήτων μιας πραγματικής επιφάνειας μπορούν να μελετηθούν μόνο μέσα από στατιστική προσέγγιση των αποτελεσμάτων και όχι από την απευθείας εξαγωγή των φυσικών μεγεθών. Για να αποφύγουμε την στατιστική θεώρηση κάθε μέτρησης, εισήχθησαν στοιχεία κυκλώματος που αναπαριστούν τις ιδιότητες μιας πραγματικής επιφάνειας. Χαρακτηριστικό στοιχείο είναι το στοιχείο σταθερής φάσης CPE το οποίο δεν

αποτελεί ένα πραγματικό στοιχείο αλλά το στατιστικό άθροισμα των παραδοσιακών στοιχείων σε μια πραγματική επιφάνεια.

Έτσι, αντιλαμβανόμαστε ότι για τα στερεά ηλεκτρόδια αναμένεται να εμφανίζουν συμπεριφορά σταθερής φάσης και ότι η απλούστευση ότι παρουσιάζουν καθαρά χωρητική συμπεριφορά οδηγεί σε λανθασμένα συμπεράσματα. Οι λόγοι που εμφανίζεται η συμπεριφορά ενός στοιχείου σταθερής φάσης, είναι κυρίως η τραχύτητα των ηλεκτροδίων, οι μικροσκοπικές χημικές ανομοιογένειες και η απορρόφηση των ιόντων. [49]

Παρατηρώντας την παρακάτω εικόνα βλέπουμε ένα διάγραμμα Nyquist CPE με κόκκινη γραμμή και ένα σύστημα πυκνωτή αντιστάτη με μαύρη γραμμή. Καταλαβαίνουμε ότι το πόσο αποκλίνει από την ιδανικότητα το στοιχείο μας, είναι ανάλογο με τις τιμές που παίρνει το n . [56]



Εικόνα 20: Διάγραμμα Nyquist CPE με κόκκινη γραμμή, και σύστημα πυκνωτή αντιστάτη με μαύρη γραμμή

Η εμπέδηση για ένα στοιχείο CPE δίνεται από την σχέση:

$$Z_{cpe} = 1/(j\omega A)^n \quad (4.7)$$

με A μια ποσότητα ανάλογη της χωρητικότητας, ω η συχνότητα με μονάδες μέτρησης rad/sec και ο εκθέτης n μια σταθερά υπολογίσιμη, ανεξάρτητη της συχνότητας, με τιμή χαρακτηριστική για κάθε ηλεκτρόδιο που μελετάται. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι τιμές $n=1$ που η διπλοστιβάδα παρουσιάζει ιδανική χωρητική συμπεριφορά, για $n=0,5$ αντιστοιχεί σε ένα στοιχείο Warburg, ενώ τιμή 0,85 αυτό σημαίνει ότι το CPE εμφανίζει ιδιότητες αντίστασης και πυκνωτή με τις ιδιότητες του πυκνωτή να είναι κυρίαρχες

Ανάλογα λοιπόν τις τιμές που παίρνει το n αλλάζει και ο τύπος της εμπέδησης του CPE. Μπορεί να φτιαχτεί ο τελικός τύπος του κυκλώματος που αντιστοιχεί στον σύστημα που μελετάται θεωρώντας εμπέδηση στοιχείου CPE και προσθέτοντας την σύμφωνα με τους κανόνες του Kirchhoff με τα υπόλοιπα στοιχεία που έχουν θεωρηθεί. [50]

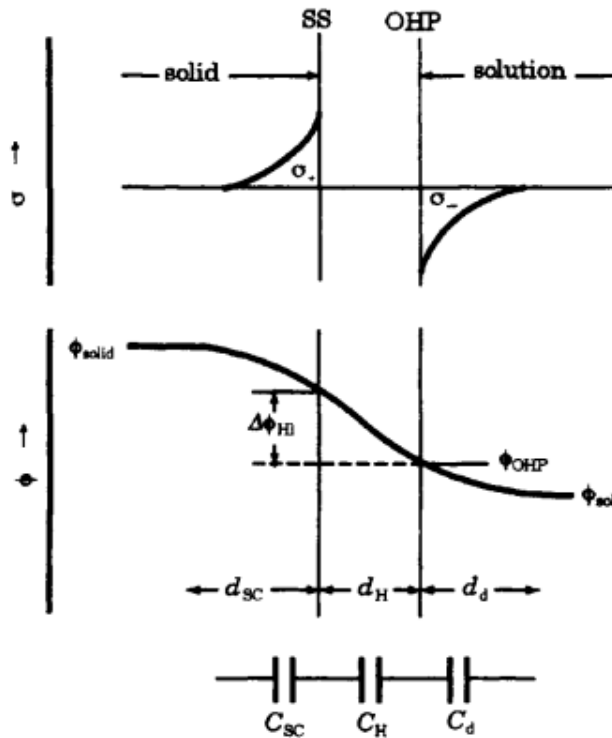
4.5 Χωρητικότητα Διπλοστιβάδας

Η διεπιφάνεια δεν είναι απλά μια ενδιάμεση επιφάνεια επαφής των φάσεων του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη, αλλά μια ετερογενής περιοχή, που αποτελείται από δύο επιμέρους περιοχές σε επαφή. Η μία περιοχή της διεπιφάνειας επεκτείνεται από το ηλεκτρόδιο (ημιστοιχείο) προς τον ηλεκτρολύτη, χωρίς να έχει τις ίδιες ιδιότητες και σύνθεση με εκείνες της κύριας μάζας του ηλεκτρολύτη, και η άλλη εκτείνεται από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου προς το εσωτερικό του, χωρίς να έχει τις ίδιες ιδιότητες και σύνθεση με εκείνες της κύριας μάζας του ηλεκτροδίου.

Η διαφορά ενός ηλεκτροστατικού δυναμικού μεταξύ ενός στερεού και ενός υδατικού διαλύματος μπορεί να παρασταθεί ως ένας πυκνωτής με παράλληλους οπλισμούς που στην μια φάση θα έχουμε περίσσεια θετικού φορτίου και στην άλλη αρνητικού. Το διεπιφανειακό φορτίο στον στερεό αγωγό φέρεται συνήθως από περίσσεια ευκίνητων ηλεκτρονίων ή οπών, ενώ από την άλλη πλευρά του διαλύματος το φορτίο αποτελείται από περίσσεια εφυδατωμένων ιόντων.

Τα εφυδατωμένα ιόντα διαχωρίζονται από το στερεό επιφανειακά με μια προσροφημένη στιβάδα μορίων νερού. Η διεπιφανειακή ηλεκτρική διπλοστιβάδα μπορεί να αντιπροσωπευτεί από ένα μοντέλο πυκνωτή αποτελούμενο από τρεις

διακριτές στιβάδες : μια στιβάδα διάχυτου φορτίου στο ιονικό διάλυμα, μια συμπαγή στιβάδα προσροφημένων μορίων νερού και μια στιβάδα διάχυτων φορτίων στο στερεό. [57]



Εικόνα 21: Μοντέλο πυκνωτή ηλεκτρικής διεπιφανειακή διπλοστοιβάδας

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τρία επίπεδα καθένα από τα οποία κρίνεται από την κατανομή της περίσσειας του διεπιφανειακού φορτίου.

Έτσι λοιπόν, η περίσσεια του διεπιφανειακού φορτίου στην πλευρά του διαλύματος κατανέμεται από το επίπεδο πλησιέστερης προσέγγισης των εφυδατωμένων ιόντων προς το εσωτερικό του διαλύματος, σχηματίζοντας έτσι μια διάχυτη στιβάδα περίσσειας ιονικού φορτίου. Το επίπεδο της πλησιέστερης προσέγγισης ιόντων στο στερεό ονομάζεται εξωτερικό επίπεδο Helmholtz (Outer Helmholtz plane - OHP).

Από την πλευρά του στερεού, η διεπιφανειακή περίσσεια φορτίου κατανέμεται από την επιφάνεια του στερεού προς το εσωτερικό του σχηματίζοντας μια διάχυτη στιβάδα περίσσειας ηλεκτρονίων ή οπών. Η διάχυτη στιβάδα της περίσσειας των ηλεκτρονίων ή των οπών στα στερεά ονομάζεται στιβάδα (ή περιοχή) φορτίων χώρου. Η διάχυτη στιβάδα της περίσσειας των εφυδατωμένων ιόντων στο ιονικό

διάλυμα ονομάζεται απλά διάχυτη στιβάδα ή καμιά φορά στιβάδα Gouy. Η ενδιάμεση στιβάδα των προσροφημένων μορίων του νερού ονομάζεται συμπαγής ή εσωτερική στιβάδα. Η στιβάδα αυτή επίσης λέγεται στιβάδα Helmholtz. Το επίπεδο πλησιέστερης προσέγγισης των εφυδατωμένων ιόντων ονομάζεται εξωτερικό επίπεδο Helmholtz.

Στο πρότυπο των τριών στιβάδων της διεπιφάνειας ημιαγωγών – ηλεκτρολυτικού διαλύματος η ηλεκτρική χωρητικότητα C της διεπιφανειακής διπλοστοιβάδας αντιπροσωπεύεται από μια εν σειρά σύνδεση τριών πυκνωτών : C_{sc} της στιβάδας φορτίων χώρου, C_H της συμπαγής στιβάδας και C_d της διάχυτης στιβάδας :

$$1/C = 1/ C_{sc} + 1/C_H + 1/C_d \quad (4.8)$$

Έτσι λοιπόν, λόγω της συσσώρευσης ηλεκτρικών φορτίων αντίθετου σημείου, η διεπιφάνεια αποκτά ιδιότητες πυκνωτή και γι' αυτό ονομάζεται ηλεκτρική διπλοστοιβάδα. Για να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε τα πειραματικά αποτελέσματα της θερμοδυναμικής μελέτης σε μια διφασική περιοχή αναπτύχθηκαν διάφορα πρότυπα τα οποία είναι τα εξής: Helmholtz (1879), Gouy-Charman(1913), Stern(1924), Grahame(1947) και Bockris-Devanathan Muller(1963). [58]

Το μοντέλο Helmholtz, το οποίο αν και απλούστερο αποτέλεσε τη βάση, στην οποία στηρίχτηκε η ανάπτυξη των υπόλοιπων. Σύμφωνα με το πρότυπο Helmholtz το επιφανειακό φορτίο του ηλεκτροδίου έλκει ηλεκτροστατικά πάνω στην επιφάνεια του, που έρχεται σε επαφή με το ηλεκτρολυτικό διάλυμα, ένα μονομοριακό στρώμα ιόντων ίσου και αντίθετου φορτίου. Η πτώση δυναμικού ανάμεσα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και στο διάλυμα διαμέσου του μονομοριακού στρώματος είναι γραμμική. Στο πρότυπο Helmholtz διπλοστοιβάδα μπορεί να θεωρηθεί σαν πυκνωτής με παράλληλους οπλισμούς. Το φορτίο της δίνεται από την εξίσωση:

$$q=CV \quad (4.9) \quad \mu\epsilon$$

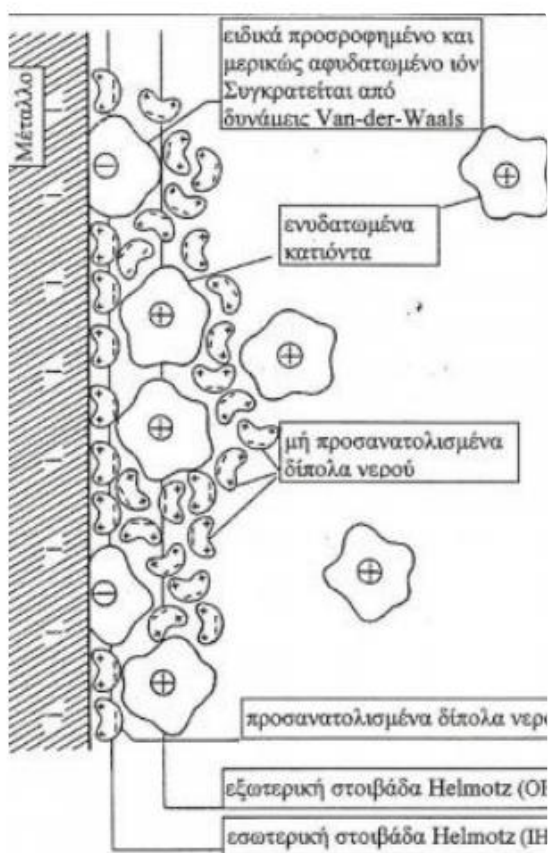
$$C=\epsilon_0\epsilon/d \quad (4.10)$$

όπου ϵ_0 η ηλεκτρική διαπερατότητα του κενού, ϵ η διηλεκτρική σταθερά του διαλυτικού μέσου, d η απόσταση των οπλισμών (δηλαδή το πάχος της διπλοστοιβάδας) και V η πτώση δυναμικού ανάμεσα στους οπλισμούς. [59]

Η χωρητικότητα του πυκνωτή ονομάζεται χωρητικότητα διπλοστοιβάδας και συμβολίζεται ως C_{dl} και η απόσταση των οπλισμών ισούται με το μήκος Debye το οποίο είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της συγκέντρωσης των ιόντων. [60]

Όπως παρατηρούμε και στην παρακάτω εικόνα (20) το τμήμα της διπλοστοιβάδας που βρίσκεται προς την πλευρά του διαλύματος αποτελείται από δύο περιοχές. Στην πρώτη περιοχή υπάρχει μια εσωτερική στιβάδα η οποία είναι σε άμεση επαφή με το ηλεκτρόδιο και έχει πάχος περίπου ίσο με την διάμετρο των μορίων του διαλύτη. Αυτή ονομάζεται εσωτερική στιβάδα Helmotz και συνήθως αποτελείται από ένα μονομοριακό στρώμα προσανατολισμένων δίπολων μορίων του διαλύτη και από ειδικά προσροφημένα ιόντα.

Στην δεύτερη περιοχή υπάρχει μια εξωτερική στιβάδα που δεν είναι σε επαφή με το ηλεκτρόδιο και αποτελείται από ενυδατωμένα κατιόντα. [61]



Εικόνα 22: Δομή διπλοστοιβάδας [58]

4.6 Ισοδύναμο Κύκλωμα

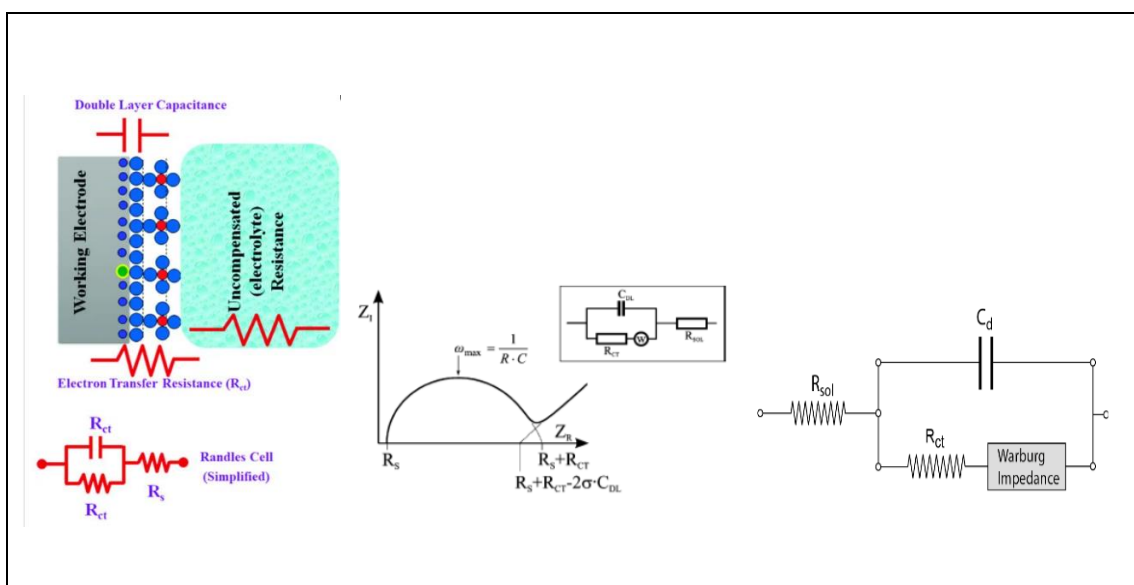
Η ιστορία της φασματοσκοπίας σύνθετης αντίστασης ξεκίνησε το 1886, όταν ο μαθηματικός και φυσικός Oliver Heaviside εισήγαγε την σύνθετη αντίσταση στην ηλεκτρολογία. Η δουλειά του σύντομα επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει διανυσματικά διαγράμματα, αναπαραστάσεις στο μιγαδικό επίπεδο και την χρήση ισοδύναμων κυκλωμάτων για την αναπαράσταση της εμπεδημετρικής απόκρισης.

Η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης μπορεί αν οριστεί ως μια τεχνική χαρακτηρισμού που παρέχει ηλεκτρικές πληροφορίες στο πεδίο της συχνότητας. Με την τεχνική αυτή μια διεργασία που λαμβάνει χώρα σε ένα ηλεκτροχημικό κελί μπορεί να μοντελοποιηθεί με την χρήση ενός συνδυασμού ηλεκτρικών κυκλωμάτων που δίνουν την ίδια απόκριση ρεύματος που παρέχει το ηλεκτροχημικό σύστημα. Με την χρήση ισοδύναμων κυκλωμάτων τα πειραματικά φάσματα μπορούν να συνδυαστούν με την θεωρητική καμπύλη που αντιστοιχεί στο επιλεγμένο μοντέλο κυκλώματος λαμβάνοντας έτσι τις τιμές των ηλεκτρικών παραμέτρων (πχ αντίσταση, χωρητικότητα, κλπ.) οι οποίες σχετίζονται άμεσα με συγκεκριμένα ηλεκτροχημικά φαινόμενα που συμβαίνουν στο υπό μελέτη σύστημα. Λόγω της υψηλής ικανότητας της για τον χαρακτηρισμό των διεπιφανειών ηλεκτροδίου- ηλεκτρολύτη και την υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση διεπιφανειακών ιδιοτήτων, η EIS εφαρμόζεται ευρέως για σκοπούς βιοανίχνευσης τα τελευταία χρόνια. [62]

Καθώς όπως αναφέραμε, η εμπέδηση υπολογίζεται σε ένα εύρος τιμών συχνότητας και ανάλογα την περιοχή συχνοτήτων στην οποία πραγματοποιείται η μέτρηση κάθε φορά διαφορετικά φαινόμενα κυριαρχούν και ασκούν μεγαλύτερη επίδραση στην τελική τιμή της εμπέδησης.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα κυκλώματα που αποτελεί την αρχή μιας ανάλυσης δεδομένων είναι το κύκλωμα Randle's, που περιγράφει την επαφή ενός ηλεκτροδίου με έναν ηλεκτρολύτη. Όπως βλέπουμε και στις παρακάτω εικόνες, αυτό περιλαμβάνει την αντίσταση του διαλύματος R_s , η οποία είναι συνδεδεμένη σε σειρά με την παράλληλη σύνδεση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R_{ct} και της σύνθετης αντίστασης Warburg W , με την χωρητικότητα διπλοστοιβάδας Cdl . [63]

Η αντίσταση Warburg είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας διάχυσης που λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Πειραματικά όπως αναφέραμε, ο τέλειος πυκνωτής δεν υφίσταται κανονικά, επομένως ένα πρόσθετο στοιχείο που ονομάζεται στοιχείο σταθερής φάσης (CPE) εφαρμόζεται για να μιμηθεί/μοντελοποιηθεί αυτή η μη ιδανική συμπεριφορά χωρητικότητας. Οι λόγοι που συζητήθηκαν πίσω από αυτό περιλαμβάνουν την επιφανειακή τραχύτητα, τη μη ομοιογένεια ή το επιφανειακό πορώδες των εξεταζόμενων υλικών. [64]



Εικόνα 23: Κύκλωμα Randle's, που περιγράφει την επαφή ενός ηλεκτροδίου με έναν ηλεκτρολύτη. [65]

Όπως παρατηρούμε στην παραπάνω εικόνα η χωρητικότητα διπλοστοιβάδας μπορεί να υπολογιστεί στο μέγιστο του ημικυκλίου ($\omega = 2\pi f = 1/R_{ct}C_{dl}$). Καταλαβαίνουμε επίσης ότι σε χαμηλές συχνότητες η τιμή της εμπέδησης καθορίζεται εξ' ολοκλήρου από την χωρητικότητα διπλοστοιβάδας, ενώ σε μεγάλες συχνότητες από την αντίσταση του διαλύματος μέσα στο οποίο είναι εμβαπτισμένα τα ηλεκτρόδια. [65]

Τα βασικά στοιχεία που πρέπει να διερευνηθούν σε ένα ηλεκτροχημικό σύστημα ώστε να κατανοηθεί η συμπεριφορά της σύνθετης αντίστασης είναι η ωμική αντίσταση, η χωρητικότητα, το στοιχείο σταθερής φάσης και η αντίσταση Warburg, τα δεδομένα των οποίων δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Συνδυάζοντας τους τύπους του πίνακα μπορούμε να υπολογίσουμε τον παράγοντα σ , και ως συνέπεια την εμπέδηση Warburg. [66]

Impedance element	Definition	Phase angle	Frequency dependence
R	$Z=R$	0°	No
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Yes
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}$	0–90°	Yes
W (infinite) ^a	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$	45°	Yes
	σ $= \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0 c_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R c_R}} \right)$		

Εικόνα 24: Τα συνηθέστερα στοιχεία που περιγράφουν ένα ηλεκτροχημικό σύστημα [66]

4.7 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα της Ηλεκτροχημικής Φασματοσκοπίας Εμπέδησης

Το βασικότερο πλεονέκτημα της EIS είναι ότι υπάρχει η δυνατότητα λήψης δύο ανεξάρτητων δεδομένων, τις μεταβολές συχνοτήτων πραγματικών στοιχείων και τις μεταβολές συχνοτήτων φανταστικών στοιχείων.

Ακόμα ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι βρίσκει εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς επιτρέπει τον ταχύ έλεγχο ποιότητας σε πολλαπλά δείγματα με βάση τα φάσματα που αποδίδουν. Προκειμένου να επιτευχθεί η φυσική ερμηνεία και η μαθηματική επεξεργασία των δεδομένων, είναι απαραίτητη η χρήση ισοδύναμων κυκλωμάτων, τα οποία δεν έχουν κάποια χωρική συσχέτιση με τις ηλεκτροχημικές μεταβλητές. Σχετικά με τα δεδομένα που αποδίδει, είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική που όμως ο θόρυβος της μέτρησης μπορεί να ελαχιστοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί εύκολα.

Επίσης χαρακτηρίζεται ως μια μη καταστρεπτική τεχνική, καθώς η μέτρηση έχει πολύ μικρή επίδραση στο δείγμα και οι μεταβολές που υφίσταται είναι σχεδόν πλήρως αντιστρέψιμες. Τέλος, χάρη στις απλές απαιτήσεις σε εξοπλισμό, των ηλεκτροχημικών αυτών μετρήσεων, προκύπτει η προοπτική της 'in situ' μέτρησης, παρέχοντας άμεσα πληροφορίες για την εξεταζόμενη επιφάνεια ή υλικό.

Οι περιορισμοί της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης προέρχονται από τις διάφορες απαιτήσεις που υπάρχουν για την απόκτηση ενός έγκυρου φάσματος της σύνθετης αντίστασης, επειδή η ακρίβεια της μέτρησης εξαρτάται τόσο από την τεχνική ακρίβεια των οργάνων όσο και από τις λειτουργικές διαδικασίες. Θεωρητικά

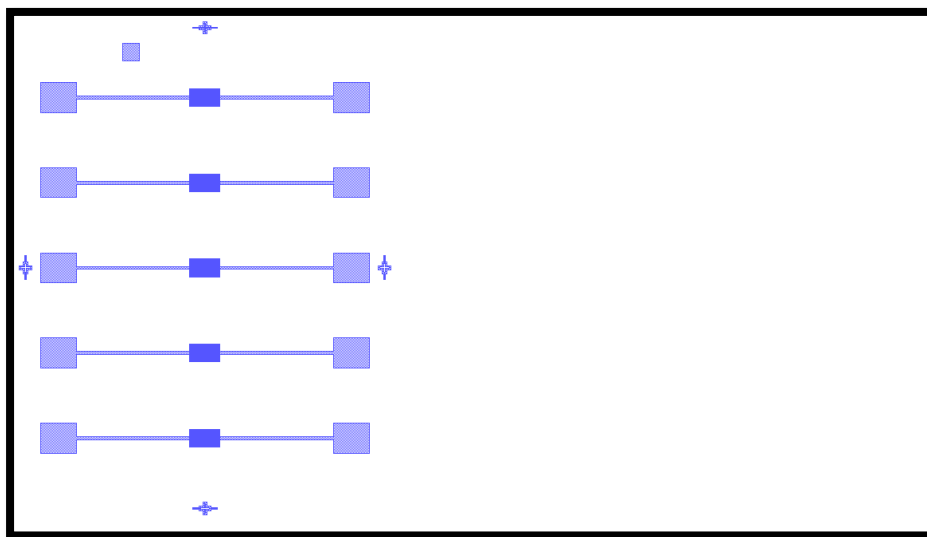
υπάρχουν τρεις βασικές απαιτήσεις για τις μετρήσεις: γραμμικότητα, σταθερότητα και η αιτιότητα. [67],[68]

5ο Κεφάλαιο

Πειραματική Διαδικασία Μετρήσεων- Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

5.1 Τεχνικά Χαρακτηριστικά Κατασκευής Βιοαισθητήρα

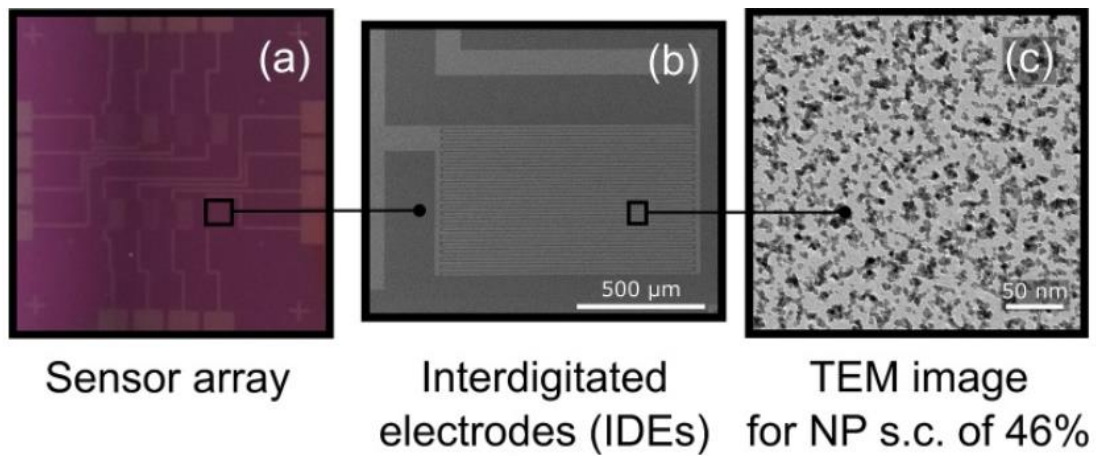
Οι βιολογικοί αισθητήρες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της εν λόγω εργασίας αποτελούνταν από μία ηλεκτρική διάταξη ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων (interdigitated electrodes – IDE's). Η κατασκευή αυτών των ηλεκτροδίων πραγματοποιήθηκε με τις συμβατικές μεθόδους λιθογραφίας και την τεχνική της επιμετάλλωσης με θερμιονική εκπομπή ηλεκτρονίων (e-gun evaporation). Η μάσκα που χρησιμοποιήθηκε για την λιθογραφία παρουσιάζεται στην Εικόνα (24). Αποτελείται από σχέδια που αντιστοιχούν σε ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια με διάκενο 10 μm. Τιτάνιο (πάχους 10 nm) χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο στρώμα πρόσφυσης μεταξύ οξειδίου του πυριτίου και χρυσού με αποτέλεσμα το συνολικό πάχος του ενδοδιαπλεκόμενου ηλεκτροδίου να είναι 40 nm. Όπως είναι εμφανές, κάθε δείγμα αποτελείται από μία συστοιχία πέντε αισθητήρων.



Εικόνα 25: Μάσκα ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων

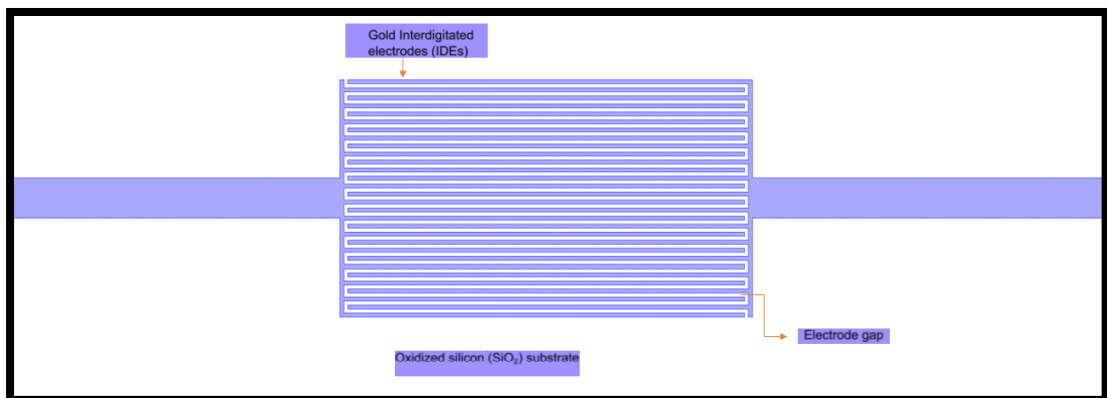
Για την βελτίωση της απόκρισης του αισθητήρα εναποτέθηκαν νανοσωματίδια πλατίνας με την τεχνική DC magnetron sputtering. Οι αισθητήρες παρασκευάστηκαν με επικάλυψη της επιφάνειάς τους από νανοσωματίδια ακριβώς κάτω από το κατώφλι διήθησης (percolation threshold) του συστήματος για βέλτιστη ευαισθησία

της διάταξης (βέλτιστη επιφανειακή κάλυψη νανοσωματιδίων περίπου ίση με 46%).[69], [70]



Εικόνα 26: Επιφανειακή κάλυψη 46% νανοσωματιδίων πλατίνας σε υπόστρωμα πυριτίου. [70]

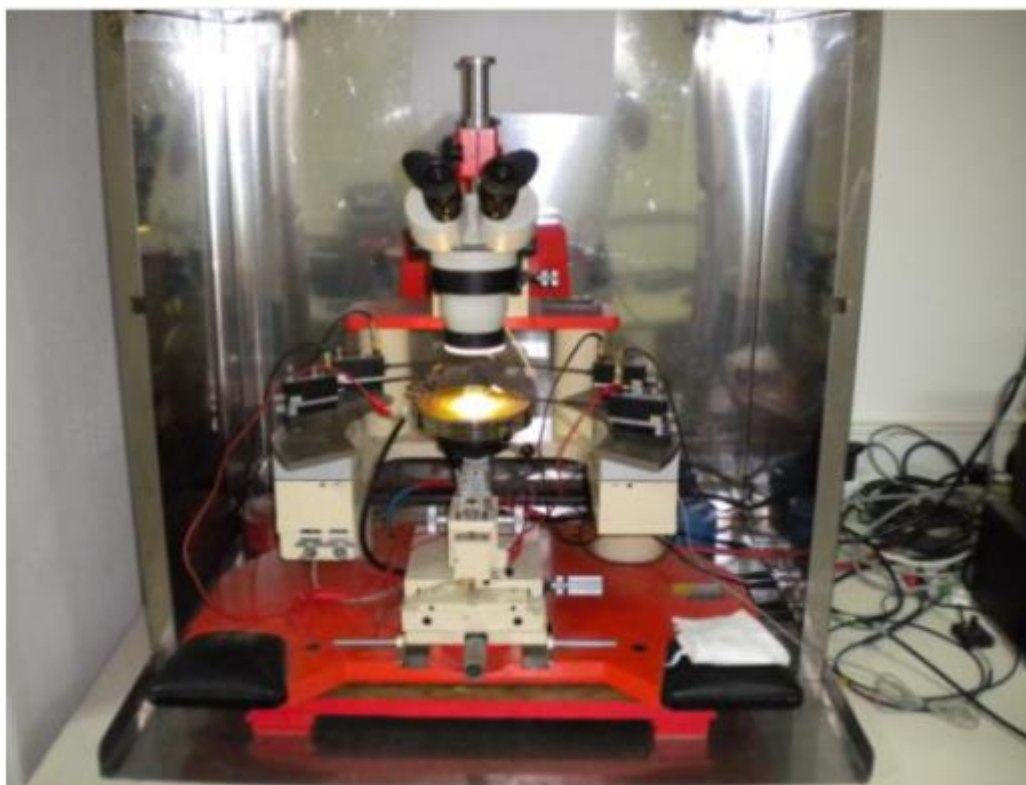
Καθώς ο χρόνος εναπόθεσης αυξάνεται, όλο και περισσότερα νανοσωματίδια συσσωματώνονται, πολλαπλασιάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα διαθέσιμα αγωγιμα μονοπάτια του υμενίου και μειώνοντας την αντίσταση της διάταξης. Η αγωγιμότητα σε αυτό το δίκτυο μεταλλικών νανοσωματιδίων μπορεί να περιγραφεί επαρκώς από το θερμικά ενεργοποιούμενο φαινόμενο σήραγγας, το οποίο αναλύθηκε στην ενότητα(1.6.1)



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση των ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων χρυσού.

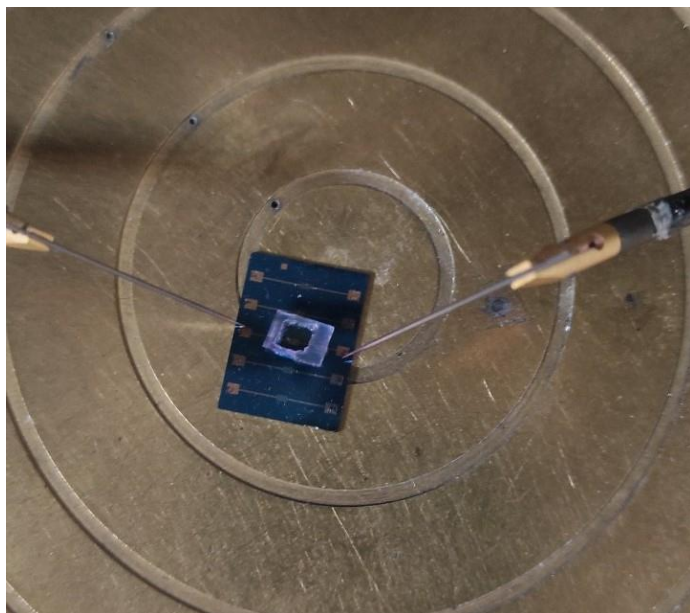
5.2 Πειραματική Διάταξη

Για τον ηλεκτρικό χαρακτηρισμό των αισθητήριων διατάξεων χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη ηλεκτρικών μετρήσεων (εικόνα 28) η οποία αποτελείται από ένα σύστημα δύο ακίδων που συνδέονται με μετρητικά όργανα, ένα τροφοδοτικό και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο υπολογιστής περιέχει το πρόγραμμα LabView μέσω του οποίου ο χρήστης καθορίζει διάφορες παραμέτρους. Όλη η διάταξη είναι τοποθετημένη μέσα σε έναν κλωβό Faraday, ο οποίος βοηθά στην θωράκιση από παρασιτικά ρεύματα ηλεκτροστατικής φύσεως. Το πρώτο βήμα για να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, είναι να τοποθετήσουμε τον αισθητήρα σε μια μεταλλική βάση η οποία έχει μια οπή και δημιουργείται κενό μέσω μιας αντλίας και έτσι συγκρατείται ο αισθητήρας σταθερός. Γύρω από την βάση υπάρχουν δυο ακίδες βολφραμίου, οι οποίες κινούνται και στους τρεις άξονες και για να ξεκινήσει η μέτρηση, φέρνουμε σε επαφή τις ακίδες με τις επαφές των ηλεκτροδίων των διατάξεων με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου που είναι ενσωματωμένο πάνω από την μεταλλική βάση.



Εικόνα 28: Πειραματική Διάταξη που είναι διαθέσιμη στον τομέα Φυσικής του Ε.Μ.Π.

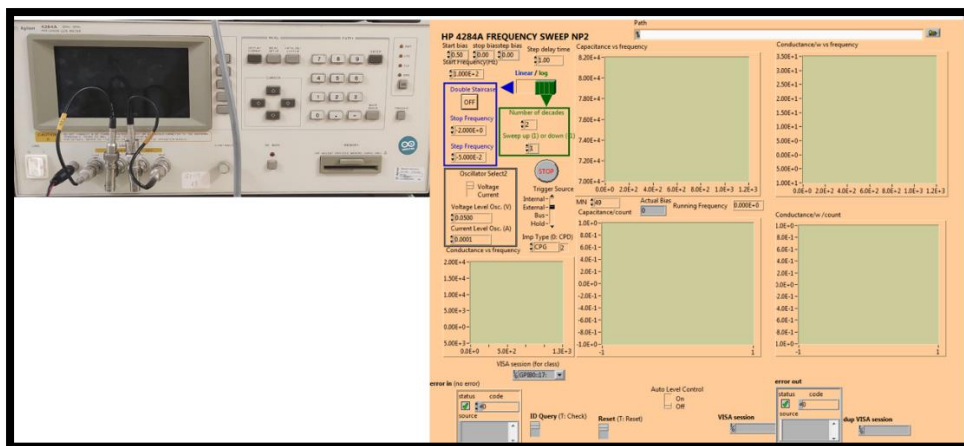
Γύρω από τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια του αισθητήρα μας, τοποθετούμε ένα ειδικά διαμορφωμένο πολυμερικό περίβλημα (φλάντζα) ώστε να συγκρατηθεί ο ηλεκτρολύτης που θα ρίξουμε και να μπορέσουμε να μετρήσουμε όλους τους αισθητήρες που διαθέτει κάθε δείγμα.



Εικόνα 29: Πολυμερικό περίβλημα που τοποθετείται γύρω από τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια.

5.3 Μετρήσεις σύνθετης αντίστασης

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το μετρητικό όργανο Agilent 4284A το οποίο συνδεόταν με τους αισθητήρες μέσω ακίδων όπως περιεγράφηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, ενώ η σύνδεσή του με τον υπολογιστή πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός GPIB καλωδίου. Μέσω του λογισμικού LabVIEW επιλέξαμε την μέτρηση του πραγματικού και του φανταστικού μέρους της εμπέδησης για εύρος συχνοτήτων από 100 Hz – 1MHz. Μία εναλλασσόμενη τάση 50 mV εφαρμόστηκε ως υπέρθεση ενός σταθερού δυναμικού 0,5 V. Η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον δύο φορές προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα της.



Εικόνα 30: Αριστερή εικόνα: μετρητικό όργανο Agilent 4284A, δεξιά εικόνα: λογισμικού LabVIEW

Οι στόχοι των βαρέων μετάλλων βρίσκονται διαλυμένα σε ρυθμιστικά διαλύματα ενώ οι ρίψεις των διαλυμάτων γίνονται με την τεχνική drop-casting. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Αρχικά, εναποτίθενται 2μL ρυθμιστικού διαλύματος πάνω από τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια, μέχρι το σύστημα να φτάσει σε σταθερή κατάσταση. Έπειτα γίνεται ρίψη ακόμα 1μL ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν έχει υπάρξει μεταβολή στην μέτρηση, καθώς πρέπει να εξασφαλίσουμε ότι η μεταβολή στην τιμή της εμπέδησης θα προκύψει από την ανίχνευση των βαρέων μετάλλων. Άρα η πρώτη μέτρηση μας, η οποία στα διαγράμματα είναι ορισμένη ως buffer αφορά την ρίψη 3μl ρυθμιστικού διαλύματος.
- Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη μέσω drop casting των διάφορων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων που έχουμε φτιάξει, ξεκινώντας από την μικρότερη και καταλήγοντας στην μεγαλύτερη, ώστε να είναι εμφανής η ανίχνευση της μικρότερης συγκέντρωσης. Η ποσότητα του στόχου που γίνεται η ρίψη είναι 1μl και η κάθε ρίψη γίνεται αθροιστικά πάνω στην προηγούμενη. Έτσι, κρίνεται απαραίτητος ο εκ νέου υπολογισμός της συγκέντρωσης για κάθε διάλυμα, ο οποίος εμφανίζεται στα παρακάτω διαγράμματα.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα στα οποία είναι διαλυμένα τα ιόντα βαρέων μετάλλων ταυτίζονται με εκείνα του ενζυματικού DNA. Συνεπώς, για την περίπτωση ανίχνευσης Pb^{2+} και Cd^{2+} χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα

MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) (50 mM MOPS/25 mM NaClM, pH 7,5), ενώ για ανίχνευση Cr(III) ο buffer MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

5.4 Παρουσίαση Πειραματικών Αποτελεσμάτων

Σε αυτό το υποκεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εμπέδησης συναρτήσεως της συχνότητας. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της φασματοσκοπίας της ηλεκτροχημικής εμπέδησης, τα εξαγόμενα αποτελέσματα ήταν το πραγματικό (Z_{RE}) και το φανταστικό (Z_{im}) μέρος της σύνθετης αντίστασης (Z). Σύμφωνα με την σχέση (4.6) που παρουσιάστηκε στο υποκεφάλαιο (4.2) , υπολογίστηκε το μέτρο της συνολικής εμπέδησης ($|Z|$). Έπειτα έγινε ο υπολογισμός της ποσοστιαίας σχετικής μεταβολής της σύνθετης εμπέδησης μέσω της σχέσης ($Z_n - Z_o$)/ Z_o x100% ,όπου Z_o το μέτρο της εμπέδησης στον buffer και Z_n η αντίστοιχη μέτρηση για μια n συγκέντρωση σε μια συγκεκριμένη συχνότητα. Η τιμή της συχνότητας επιλέχτηκε έτσι ώστε να λαμβάνουν χώρα και τα φαινόμενα μεταφοράς φορτίου, αλλά και τα χωρητικά φαινόμενα (500HZ).

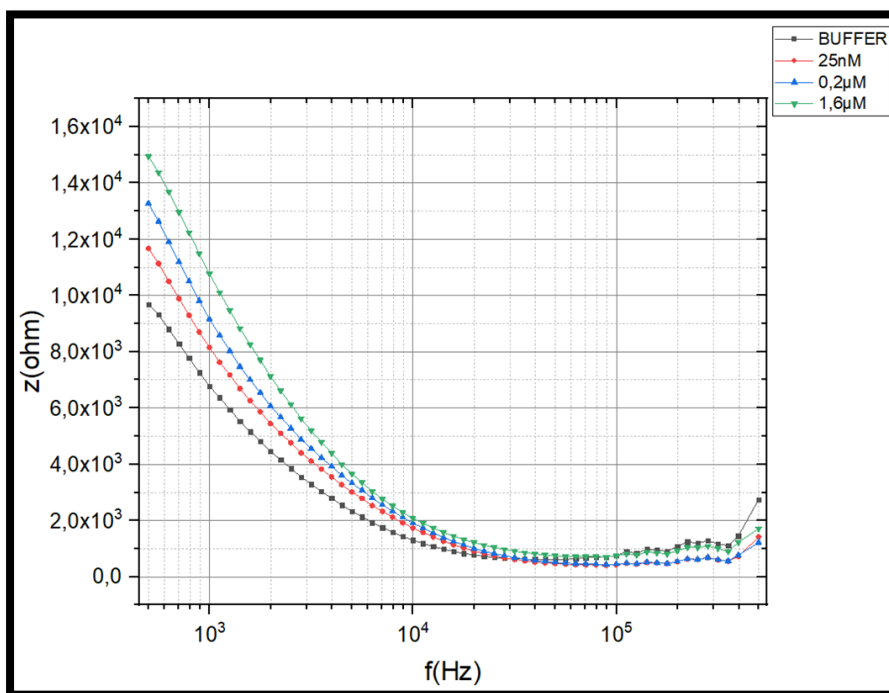
Όπως θα παρατηρήσουμε και στα παρακάτω διαγράμματα (πχ εικόνα 30) σε μεγάλες συχνότητες εμφανίζεται ένα πλατό, η καμπύλη δηλαδή της εμπέδησης σε συνάρτηση με την συχνότητα διατρέχει παράλληλα τον οριζόντιο άξονα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η συνεισφορά της χωρητικότητας θεωρείται αμελητέα και η σύνθετη αντίσταση οφείλεται μόνο στην αντίσταση του διαλύματος. Αντίθετα σε πιο μικρές συχνότητες η συμπεριφορά της εμπέδησης είναι κυρίως χωρητική. [71]

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αισθητήρων πραγματοποιήθηκε μια πληθώρα ηλεκτρικών μετρήσεων. Τα πειράματα που διεξήχθησαν ήταν τα εξής:

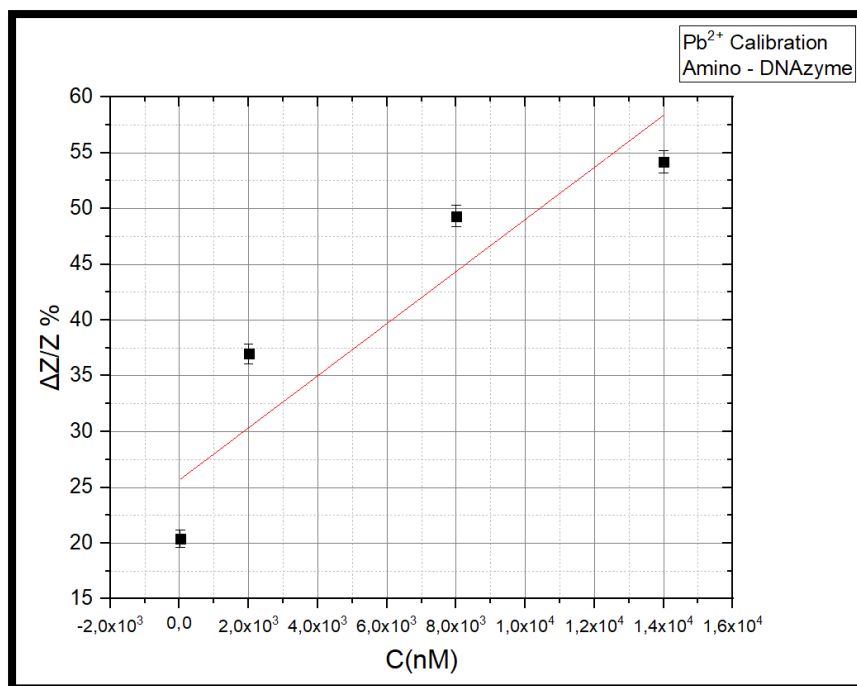
- Μετρήσεις σε βιοαισθητήρες με νανοσωματίδια πλατίνας σε υποστρώματα πυριτίου με DNAzymes με amino τεχνική
- Μετρήσεις σε βιοαισθητήρες με νανοσωματίδια πλατίνας σε υποστρώματα πυριτίου με DNAzymes με thiol τεχνική
- Μετρήσεις επιλεκτικότητας στους αντίστοιχους αισθητήρες

- Μετρήσεις σε βιοαισθητήρες χωρίς νανοσωματίδια, σε υποστρώματα πυριτίου με DNAzymes με thiol τεχνική.

- Μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα μολύβδου. Στους συγκεκριμένους αισθητήρες έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Παρατηρούμε ότι το όριο ανίχνευσης είναι τα 25nM. (Εικόνα 31) και η ευαισθησία είναι $0,00234 \pm 7,1379E-4 \text{ nM}^{-1}$ (Εικόνα 32)



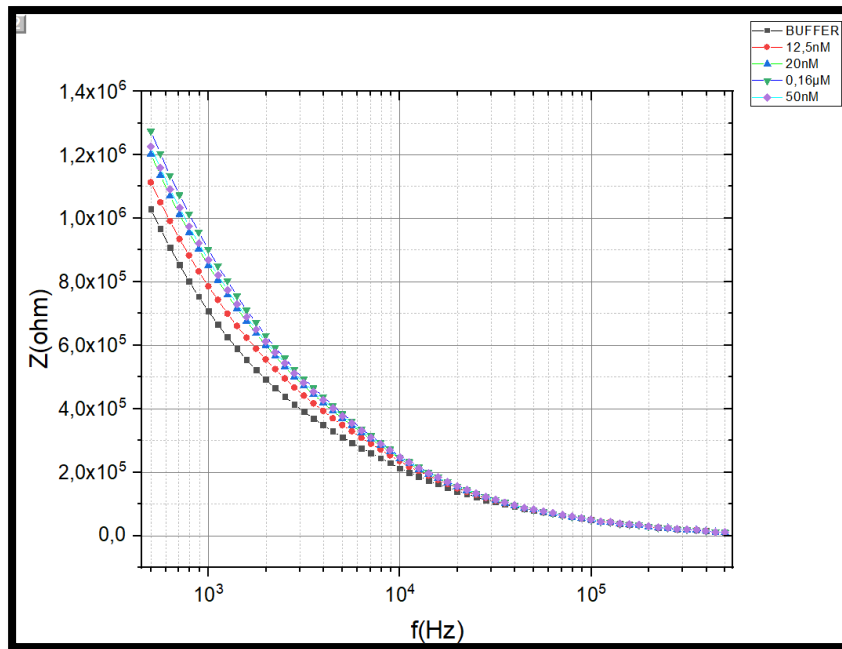
Εικόνα 31: Ανίχνευση ιόντων μολύβδου σε αισθητήρα με επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες.



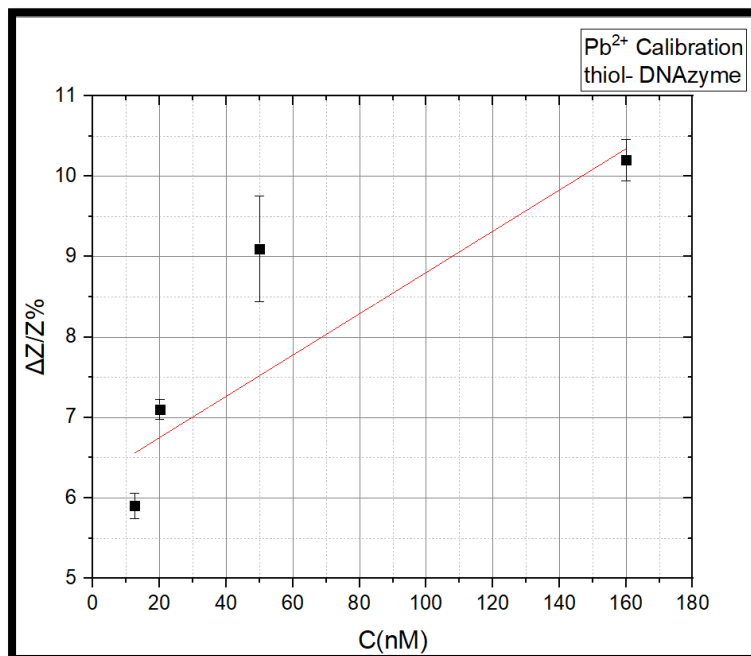
Εικόνα 32: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Pb²⁺. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες. Όριο ανίχνευσης: 25 nM. Ευαισθησία: $0,00234 \pm 7,1379E-4 \text{ nM}^{-1}$

II.

Μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα μολύβδου. Στους συγκεκριμένους αισθητήρες έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Παρατηρούμε ότι το όριο ανίχνευσης είναι τα 12,5nM (Εικόνα 33) και η ευαισθησία $0,02565 \pm 0,00758 \text{ nM}^{-1}$. (Εικόνα 34)



Εικόνα 33: Ανίχνευση ιόντων μολύβδου σε αισθητήρα με επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης.



Εικόνα 34: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Pb^{2+} . Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 12.5 nM. Ευαισθησία: $0,02565 \pm 0,00758 \text{ nM}^{-1}$

Συγκρίνοντας τις δύο τεχνικές για την απόκριση στα ιόντα μολύβδου ως προς την ευαισθησία του αισθητήρα παρατηρούμε ότι όταν έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης ο αισθητήρας παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Συγκεκριμένα στους αισθητήρες που έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες η ευαισθησία είναι $0,00234 \text{ Nm}^{-1}$, ενώ σε αυτούς που έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης η ευαισθησία είναι $0,022565 \text{ Nm}^{-1}$

Παρόλα αυτά, παρατηρώ ότι οι αισθητήρες οι οποίοι είναι τροποποιημένοι με αμινομάδες έχουν μεγαλύτερο $\Delta Z/Z$ αλλά με μειωμένη ευαισθησία (εικόνα 32). Για όλες τις συγκεντρώσεις οι τιμές είναι αυξημένες αλλά η κλίση της ευθείας είναι μικρότερη σε σχέση με αυτούς που έχει προηγηθεί τροποποίηση με ομάδες θειόλης.

Το γεγονός ότι οι αισθητήρες που είναι τροποποιημένοι με ομάδες θειόλης παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία, μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των δύο χημικών τροποποιήσεων και τον τρόπο προσκόλλησης τους στο υπόστρωμα πυριτίου με τα νανοσωματίδια πλατίνας. Τα τροποποιημένα με θειόλη DNAzymes ακινητοποιούνται μόνο στα PtNPs, ενώ τα τροποποιημένα με αμινοξέα DNAzymes ακινητοποιούνται τόσο στα PtNPs όσο και στην ελεύθερη επιφάνεια του SiO_2 .
Εικόνα(34)



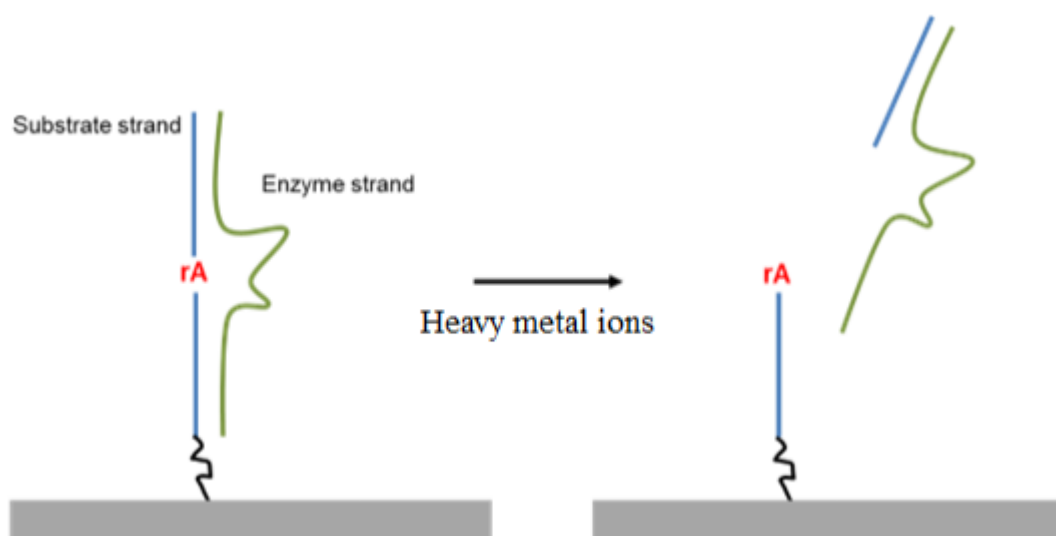
Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικοποιημένων επιφανειών με (α) αμινο-τροποποιημένο DNA-ένζυμο και (β) θειολο-τροποποιημένο DNA-ένζυμο

Το δίκλωνο DNA έχει την ικανότητα να δρα ως μοριακή αγώγιμη γέφυρα μεταξύ διακριτών νανοσωματιδίων ή συσσωματωμάτων νανοσωματιδίων, ενισχύοντας έτσι την συνολική αγωγιμότητα της διάταξης.

Παρουσία των ιόντων βαρέων μετάλλων, οι αλυσίδες των DNAzymes σπάνε σε επιμέρους τμήματα. Η βιολογική τροποποίηση των επιφανειών σχεδιάστηκε έτσι, ώστε όταν αυτοκαταλύεται το δίκλωνο μόριο να απομακρύνεται όλη η ενζυματική αλυσίδα μαζί με ένα μέρος της αλυσίδας του υποστρώματος (εικόνα 35). Η αγώγιμη γέφυρα που είχε δημιουργεί το DNAzyme λοιπόν, καταστρέφεται από κάθε ιόν

μετάλλου και ως αποτέλεσμα έχει την αύξηση την μετρούμενης αντίστασης της διάταξης.[69], [70].

Σύμφωνα με αυτά λοιπόν, θα μπορούσαμε να δώσουμε μια εξήγηση στο γεγονός ότι παρατηρούμε μεγαλύτερη κλίση (άρα και ευαισθησία) στους αισθητήρες που είναι τροποποιημένοι με ομάδες θειόλης. Συγκεκριμένα αντιθέτως με τους αισθητήρες με θειολο-τροποποιημένο DNA-ένζυμο όπου υπάρχει πιθανότητα τα DNAzymes να δημιουργούν αγώγιμες γέφυρες από νανοσωματίδιο σε νανοσωματίδιο καθώς ακινητοποιούνται μόνο εκεί, οι αισθητήρες με αμινο-τροποποιημένο DNA-ένζυμο λειτουργούν διαφορετικά. Στους τελευταίους υπάρχει πιθανότητα να δημιουργούνται αγώγιμες γέφυρες όπως και πριν αλλά καθώς τα DNA προσδένονται και στο υπόστρωμα του οξειδίου του πυριτίου, πιθανόν να εμποδίζονται τα ενδεχόμενα γεφύρωσης και αυτό να εξηγεί την μικρότερη κλίση στην ευθεία (εικόνα 31, 34)



Εικόνα 36: 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.

Η εξήγηση που δόθηκε παραπάνω είναι επαρκής για να εξηγήσει τα φαινόμενα μεταφοράς φορτίου που συμβαίνουν στο συγκεκριμένο πείραμα. Η μεταβολή της σύνθετης αντίστασης όμως, εμφανίζεται όταν συμβαίνουν τόσο φαινόμενα μεταφοράς φορτίου όσο και χωρητικά φαινόμενα.

Στο κεφάλαιο 4 εξηγήσαμε ότι οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες στηρίζονται στο ηλεκτροστατικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η διεπιφάνεια μεταξύ μιας φορτισμένης επιφάνειας και ενός ηλεκτροστατικού διαλύματος μπορεί να μοντελοποιηθεί από πυκνωτές σε σειρά. Όταν εμβαπτίσουμε ένα πολωμένο ηλεκτρόδιο μέσα σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει ιόντα, τότε αυτό έλκει τα αντίθετου φορτίου ιόντα κοντά στην επιφάνειά του. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας πυκνωτής με οπλισμούς από την μία πλευρά το ηλεκτρόδιο και από την άλλη το στρώμα ιόντων που δημιουργείται.

Το φανταστικό μέρος της σύνθετης αντίστασης περιγράφεται ως απόλυτη τιμή από τον τύπο :

$$Z_{im} = \frac{1}{2\pi\omega Cdl} \quad (5.1)$$

Όπου Cdl η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας για την οποία ισχύει

$$Cdl = \epsilon_r \epsilon_0 / d \quad (5.2)$$

Από την σχέση (5.2) παρατηρούμε ότι η μεταβολή της χωρητικότητας εξαρτάται από δυο μεταβλητές. Την διηλεκτρική σταθερά του ηλεκτροστατικού διαλύματος (ϵ_r) και την απόσταση των οπλισμών (d).

Η μεταβολή της χωρητικότητας στο συγκεκριμένο πείραμα εκτιμούμε εξαρτάται από την μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς ϵ_r του DNA καθώς αυτό βρίσκεται μέσα στο διαλυτικό μας μέσο. Από την εξίσωση (5.2) αντιλαμβανόμαστε ότι ακόμη μια μεταβλητή θα μπορούσε να είναι το d , παρόλα αυτά όμως, δεν έχουμε βρει καμία ένδειξη ότι αλλάζει η απόσταση των οπλισμών. Το δίκλωνο DNA έχει μεγαλύτερη αγωγιμότητα από το μονόκλωνο και ως αποτέλεσμα έχει μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από αυτό [72]. Αυτό σημαίνει ότι με την παρουσία ιόντων βαρέος μετάλλου και την αυτοκατάλυση των αλυσίδων του DNA, η διηλεκτρική σταθερά του ηλεκτροστατικού διαλύματος θα αυξάνεται.

Το αποτέλεσμα θα είναι η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας να αυξάνεται και καθώς είναι αντιστρόφως ανάλογη με το φανταστικό μέρος της σύνθετης αντίστασης, αυτή να μειώνεται.

Αυτά τα δυο φαινόμενα(η αύξηση της αντίστασης με το επιλεκτικό σπάσιμο των DNA, και η μεταβολή της χωρητικότητας λόγω μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς) είναι ανταγωνιστικά μεταξύ τους, όσον αφορά το μέτρο της εμπέδησης. Δηλαδή παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η χωρητικότητα τόσο μειώνεται η εμπέδηση, ενώ όσο αυξάνεται η αντίσταση τόσο αυξάνεται η εμπέδηση. Παρόλα αυτά με την αυτοκατάλυση του DNA συμβαίνουν ταυτόχρονα και τα δύο.

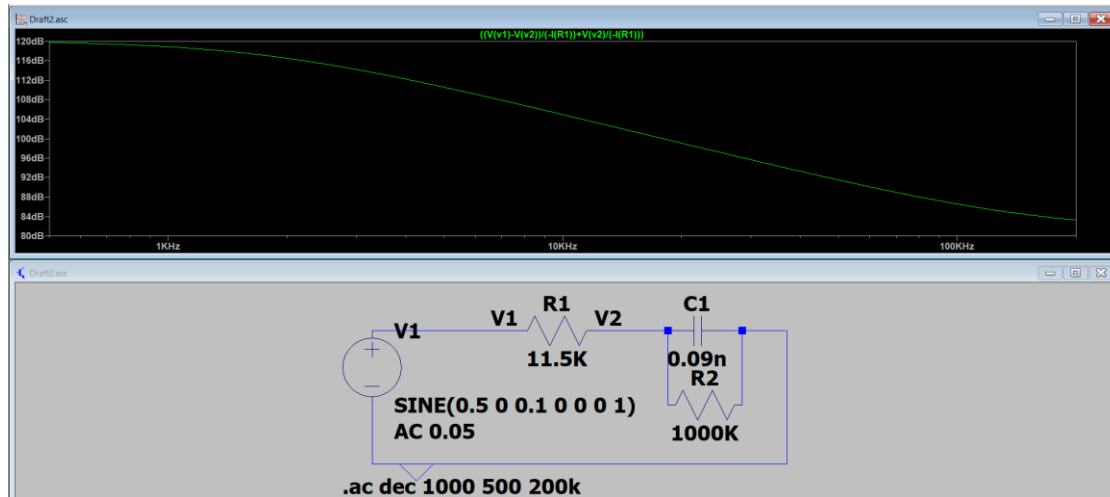
Υποθέτουμε ότι η αγωγιμότητα σε αυτό το υβριδικό υλικό που αποτελείται από νανοσωματίδια και DNA μπορεί να προσομοιαστεί από ένα κύκλωμα. Στην εικόνα 36 παρουσιάζεται η προσπάθεια προσομοίωσης αυτού του κυκλώματος. Για να μπορέσουμε να δημιουργήσουμε αυτό το κύκλωμα χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα προσομοίωσης SPICE μέσα από το οποίο βρήκαμε και βάλουμε αρχικές τιμές-συνθήκες στους μεταβλητούς μας παράγοντες (R2, C1).

Η αντίσταση R1 εκφράζει την αντίσταση του διαλύματος, η αντίσταση R2 την αντίσταση μεταφοράς φορτίου και το C1 ο πυκνωτής που δημιουργείται.

Στο συγκεκριμένο κύκλωμα η αντίσταση R2 που είναι παράλληλη με τον πυκνωτή C1 αντιπροσωπεύει το διάκενο ανάμεσα σε δύο νανοσωματίδια. Σε αυτό το διάκενο όπως περιγράψαμε και νωρίτερα, θα μπορούσαν τα νανοσωματίδια να γεφυρώνονται μέσω του DNA ή να μην προκαλείται γεφύρωση και το DNA να βρίσκεται στο υπόστρωμα του οξειδίου του πυριτίου.

Έτσι λοιπόν στην πρώτη περίπτωση, η αντίσταση R2, είναι η αντίσταση που συναντούν τα ηλεκτρόνια για να διανύσουν το DNA, και ο πυκνωτής C1 ορίζεται μεταξύ δύο νανοσωματιδίων με απόσταση των οπλισμών την μεταξύ τους απόσταση.

Στην δεύτερη περίπτωση αντιθέτως, η αντίσταση R2 είναι το ρεύμα διαρροής που μπορεί να συμβαίνει ανάμεσα σε δύο νανοσωματίδια με τόσο μικρές αποστάσεις, και ο πυκνωτής C1 ορίζεται από τα δύο νανοσωματίδια και από τα DNA που υπάρχουν ανάμεσά τους.



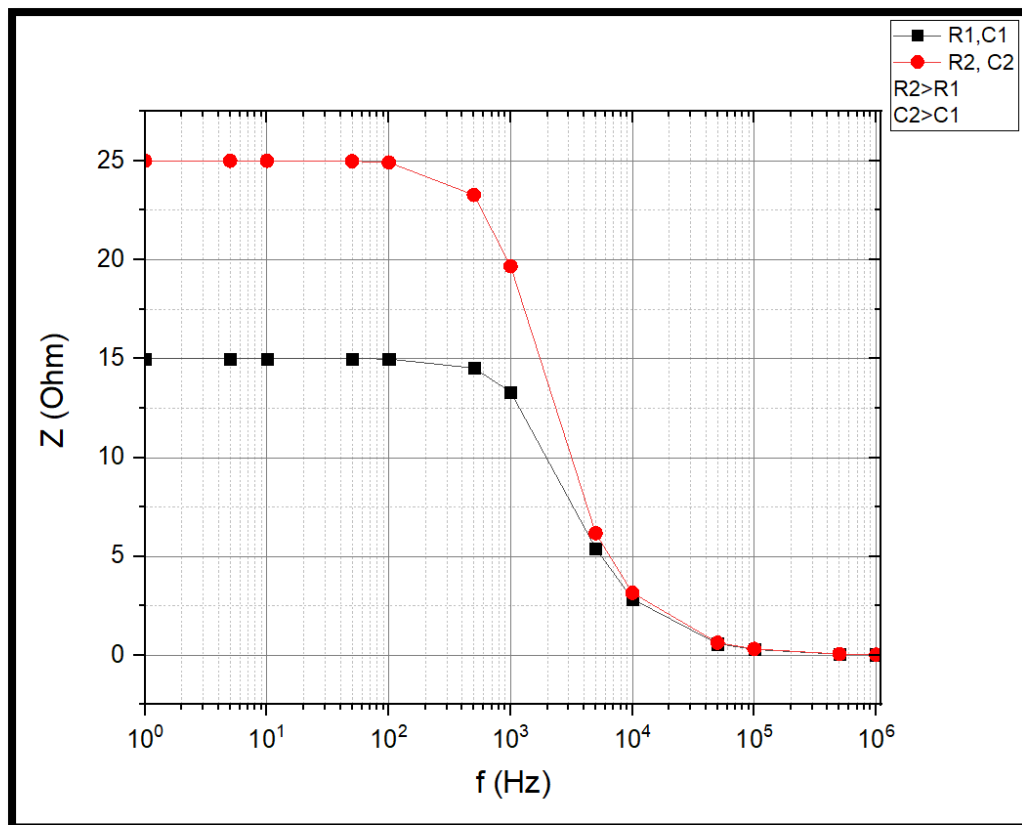
Εικόνα 37: Προσομοίωση Κυκλώματος

Θεωρώντας αμελητέα την συνεισφορά της R1 στο παραπάνω κύκλωμα καθότι εκφράζει την αντίσταση του ηλεκτρολύτη, εκφράζουμε το μέτρο της εμπέδησης εμπέδηση (βάση νόμων Kirchhoff):

$$z = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{1}{R}\right)^2 + (\omega C)^2}} \quad (5.3)$$

Βάζοντας τιμές στο πρόγραμμα προσομοίωσης SPICE η οποίες συνάδουν με τα πειραματικά μας αποτελέσματα παρατηρώ τα εξής αποτελέσματα:

Με την ταυτόχρονη, αλλά πολύ μεγαλύτερη αύξηση της αντίστασης R2 σε σχέση με την αύξηση της τιμής της χωρητικότητας υπάρχει αύξηση του μέτρου της εμπέδησης, σε ένα εύρος συχνοτήτων (100Hz – 1MHz) που συνάδει με τα δικά μας πειραματικά αποτελέσματα. Όπως παρατηρούμε και στην παρακάτω εικόνα (38) ο ρόλος της αντίστασης είναι μεγαλύτερος από αυτόν της χωρητικότητας για ένα εύρος συχνοτήτων που αφορούν και το δικό μας πείραμα.

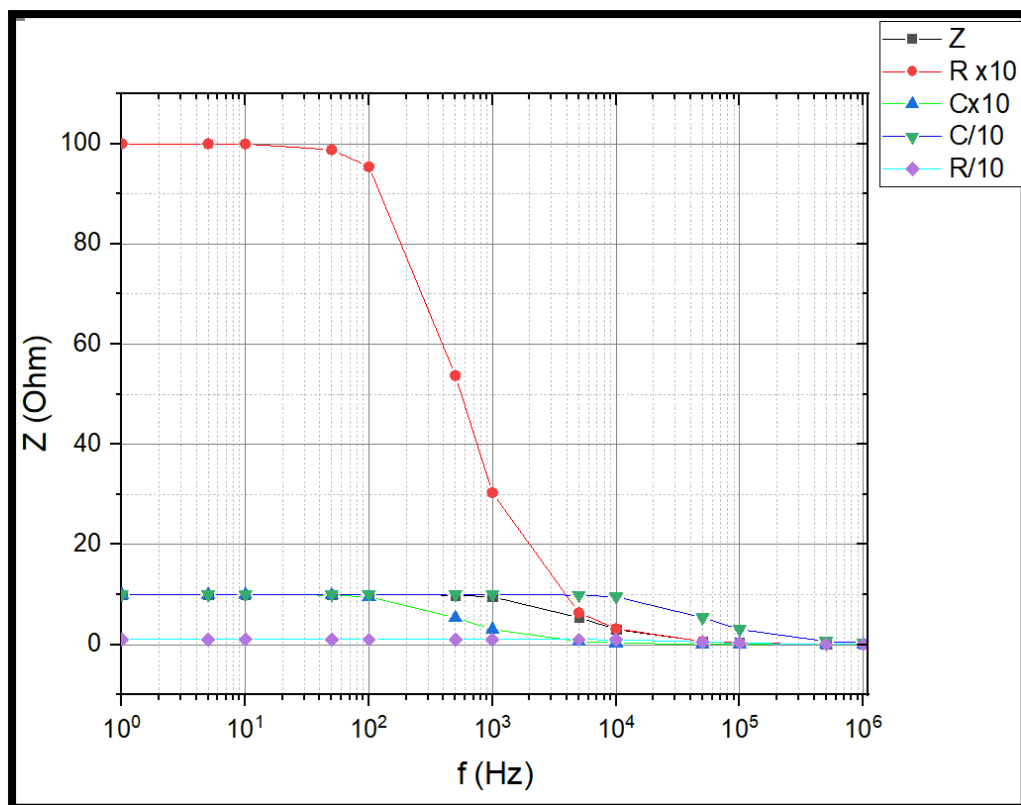


Εικόνα 38: Ταυτόχρονη αύξηση της αντίστασης και της τιμής της χωρητικότητας στο πρόγραμμα προσομοίωσης SPICE

Το επόμενο πείραμα προσομοίωσης που εκτελέσαμε, ήταν να δεκαπλασιάσουμε και να υποδεκαπλασιάσουμε τις τιμές της αντίστασης και της χωρητικότητας ώστε να παρατηρήσουμε ξανά την τιμή του μέτρου της εμπέδησης.

Στην Εικόνα 39, παρατηρούμε ότι αν κρατήσουμε σταθερή την αντίσταση και αυξήσουμε ταυτόχρονα την χωρητικότητα, η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή του μέτρου της εμπέδησης δεν μεταβάλλονται. Παρατηρούμε βέβαια ότι αυτό που μεταβάλλεται είναι η συχνότητα αποκοπής.

Αντιθέτως, αν αυξήσω 10 φορές την αντίσταση, παρατηρώ ότι η μέγιστη τιμή του μέτρου της εμπέδησης πολλαπλασιάζεται επί 10, και μειώνεται και η συχνότητα αποκοπής.



Εικόνα 39: Αλλαγές στις τιμές της χωρητικότητας του πυκνωτή και της αντίστασης στο πρόγραμμα προσομοίωσης SPICE

Η παρατήρηση που γίνεται και από το πείραμα προσομοίωσης, είναι ότι την μεγαλύτερη συνεισφορά για την μεταβολή του μέτρου της εμπέδησης την δίνει η τιμή της αντίστασης. Στις εικόνες (πχ εικόνα 31) που εξάγονται από τα πειράματά μου παρατηρώ ότι οι καμπύλες που μετρώ είναι δεξιά από τον buffer, οπότε το κάτω frequency έχει μετακινηθεί ελαφρώς δεξιά.

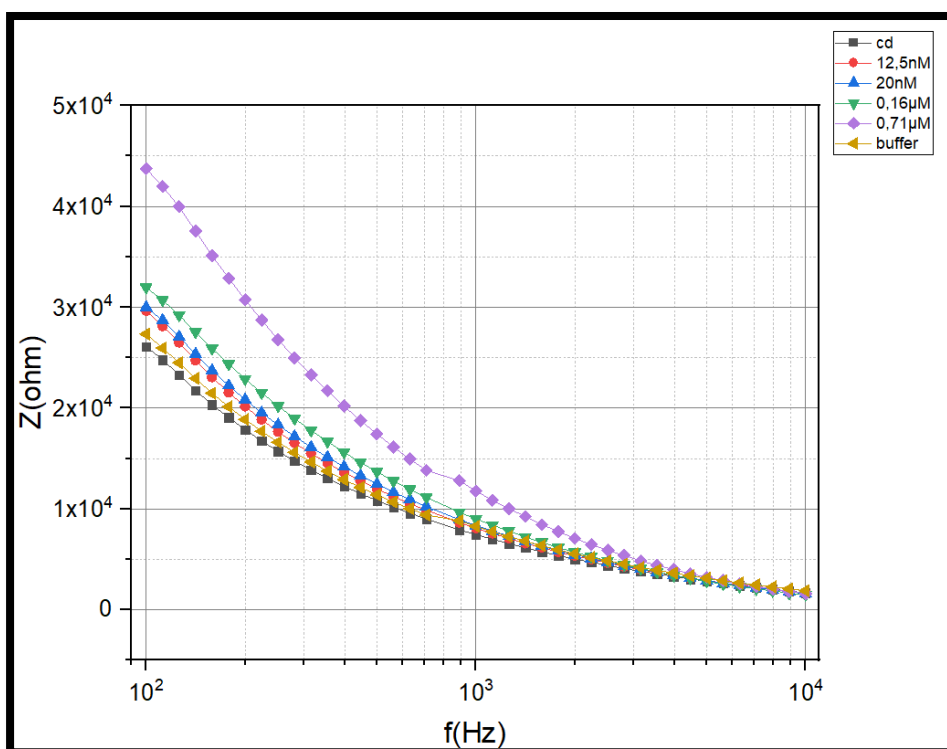
Συμπερασματικά λοιπόν, στο πείραμα μας συμβαίνει αύξηση και της αντίστασης, αλλά και της χωρητικότητας του πυκνωτή αλλά η τελευταία δεν μπορεί να υπερνικήσει την αύξηση της αντίστασης, η οποία επηρεάζει συνολικά και την τιμή του μέτρου της εμπέδησης.

III.

Πείραμα επιλεκτικότητας για ανίχνευση ιόντων μολύβδου σε αισθητήρες που έχει γίνει επιφανειακή τροποποίηση με αμινομάδες.

Πειράματα επιλεκτικότητας γίνονται ανάμεσα σε αισθητήρες όπου έχουν ενζυματικό DNA το οποίο είναι διαλυμένο μέσα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

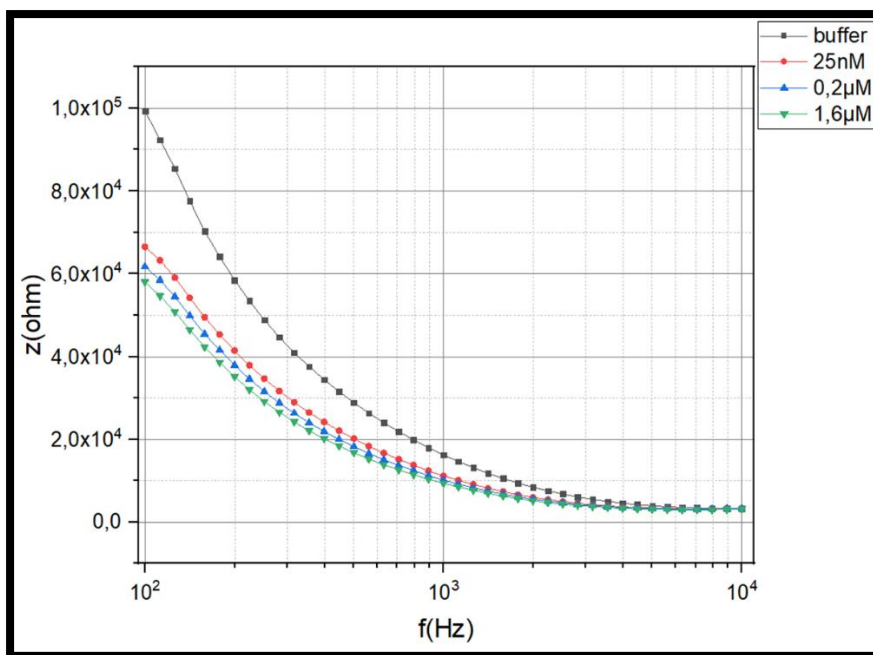
Για αυτό τον λόγο στο παρακάτω πείραμα χρησιμοποιήσαμε έναν αισθητήρα που είναι κατασκευασμένος για την ανίχνευση ιόντων μολύβδου και αφού εκτελέσαμε την διαδικασία με τις διάφορες συγκεντρώσεις όπως και πριν, στο τέλος κάναμε ρίψη μιας μεγάλης ποσότητας ιόντων καδμίου (συγκεκριμένα ποσότητας 2μL και συγκέντρωση 5μM) για να εξετάσουμε την απόκριση του. Τα αποτελέσματα που παρατηρούμε, είναι ότι ο αισθητήρας μας είναι επιλεκτικός ως προς τον μόλυβδο που είναι κατασκευασμένος, ενώ δεν έχει ανίχνευση ως προς το κάδμιο.



Εικόνα 40: Πείραμα επιλεκτικότητας. Σε αισθητήρα κατασκευασμένο για ανίχνευση ιόντων μολύβδου, κάνω ρίψη καδμίου και δεν αποκρίνεται.

IV.

Πείραμα επιλεκτικότητας σε αισθητήρα κατασκευασμένο για ανίχνευση ιόντων μολύβδου με επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης στους οποίους κάνω ρίψης ιόντων καδμίου σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το αποτέλεσμα είναι ότι ο αισθητήρας δεν έχει απόκριση.



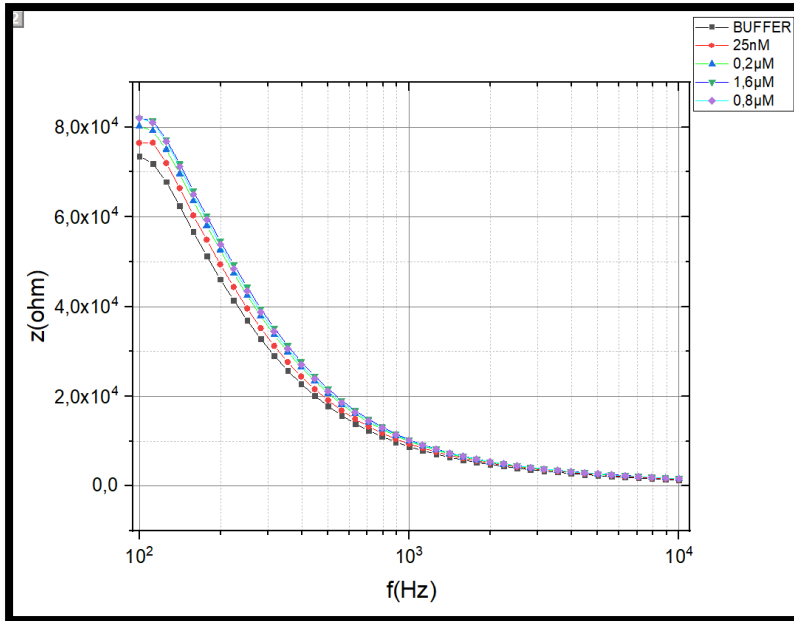
Εικόνα 41: Πείραμα επιλεκτικότητας. Σε αισθητήρα για Pb βάζω Cd.

Και τα δύο πειράματα επιλεκτικότητας που περιγράψαμε παραπάνω, έδειξαν ότι οι αισθητήρες μας είναι επιλεκτικοί ως προς τα ιόντα μολύβδου.

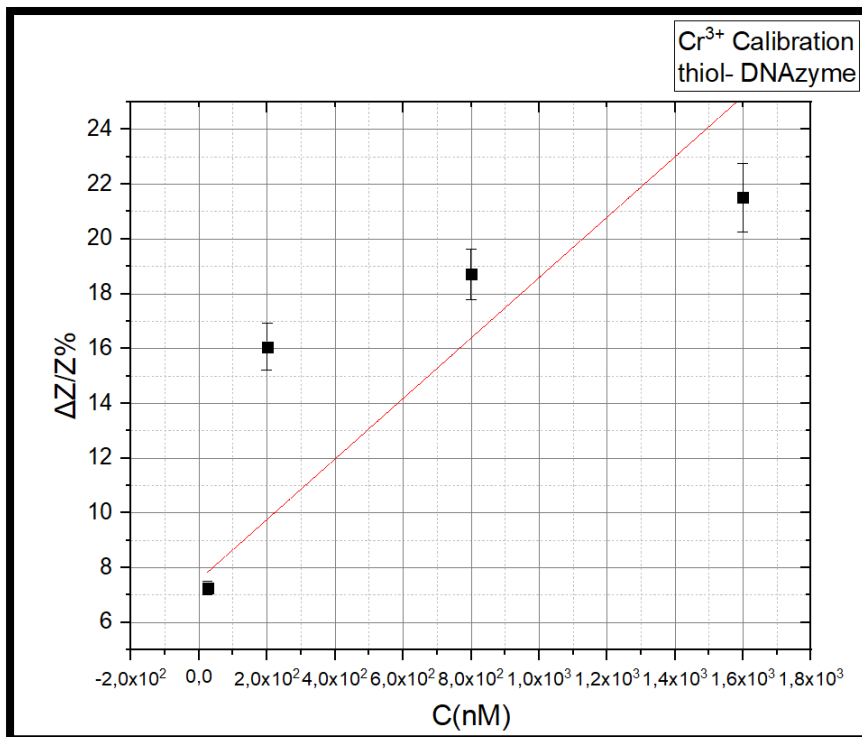
Παρακάτω ακολουθούν αντίστοιχα πειράματα για ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου.

V.

Μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα τρισθενούς χρωμίου. Στον συγκεκριμένο αισθητήρα έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Παρατηρούμε ότι το όριο ανίχνευσης είναι τα 25nm και η ευαισθησία $0,01103 \pm 0,00424 \text{ nM}^{-1}$



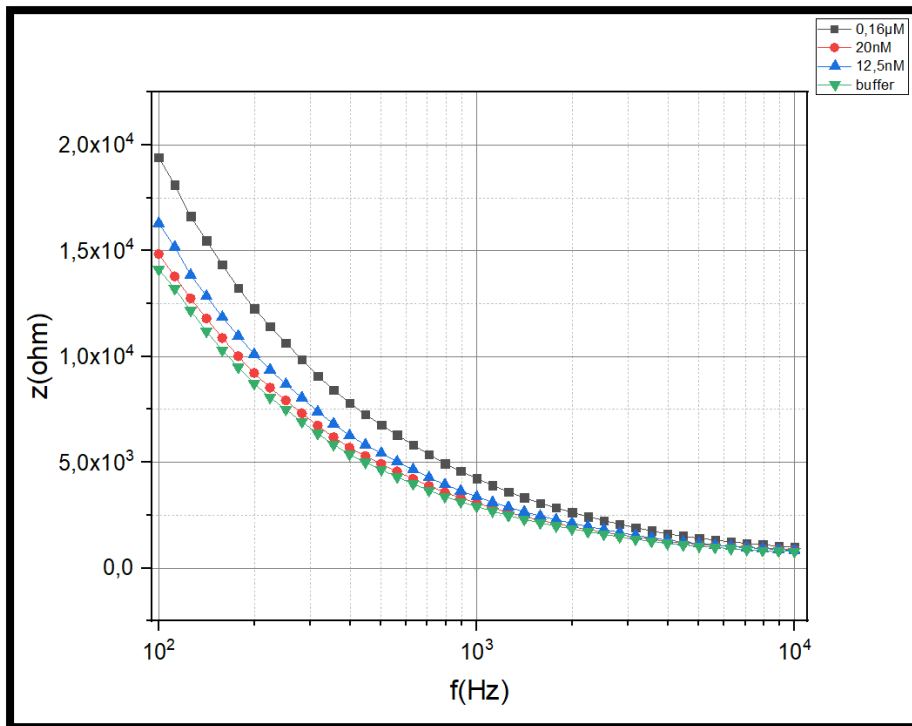
Εικόνα 42: Ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου σε αισθητήρα με επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης.



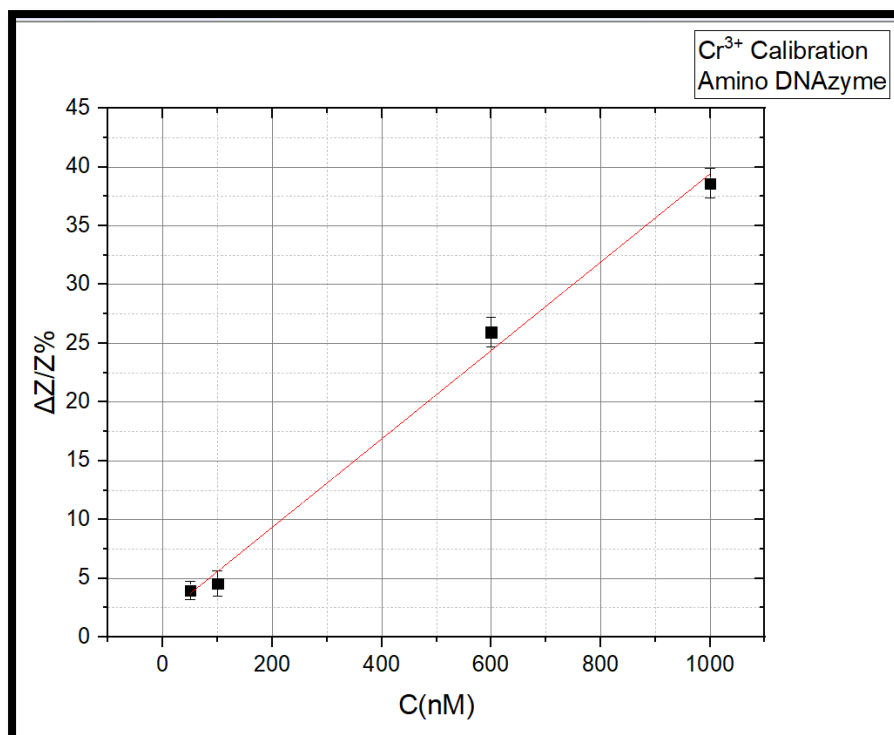
Εικόνα 43: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Cr^{3+} . Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες θειόλης. Όριο ανίχνευσης: 25 nM. Ευαισθησία: $0,01103 \pm 0,00424 \text{ nM}^{-1}$

VI.

Μέτρηση αισθητήρα σε υπόστρωμα πυριτίου με απόκριση σε ιόντα τρισθενούς χρωμίου. Στον αισθητήρα έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες αμίνης. Παρατηρούμε ότι το όριο ανίχνευσης είναι τα 12,5nM και η ευαισθησία $0,0375 \pm 0,00172 \text{ nM}^{-1}$

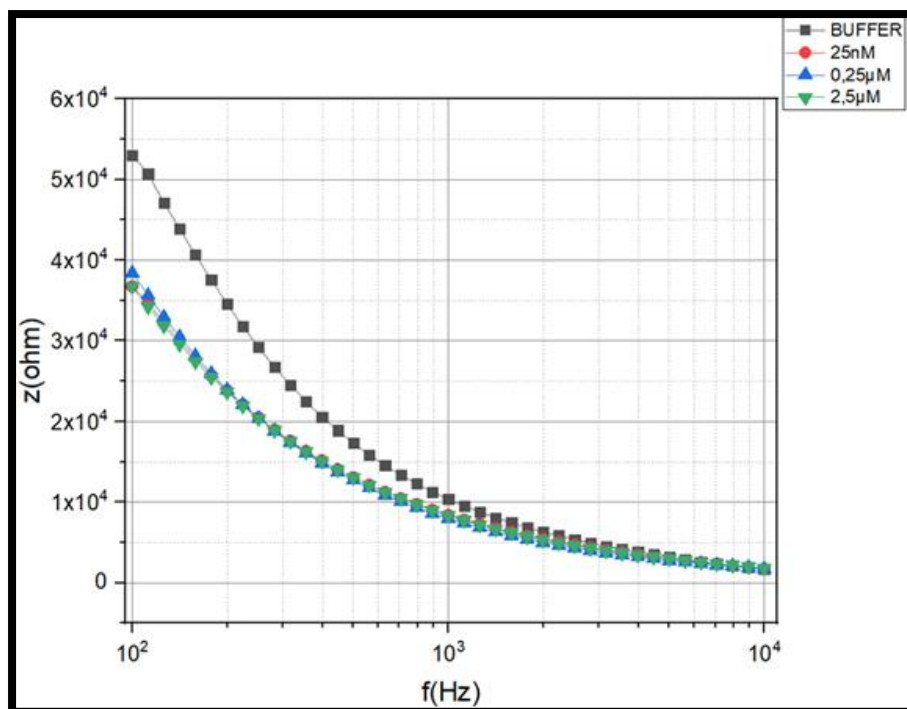


Εικόνα 44: Ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου σε αισθητήρα με επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες αμίνης



Εικόνα 45: Βαθμονόμηση αισθητήρα για διαφορετικές συγκεντρώσεις Cr³⁺. Έχει προηγηθεί επιφανειακή τροποποίηση με ομάδες αμίνης. Όριο ανίχνευσης: 12,5 nM. Ευαισθησία: 0,0375±0,00172 nM⁻¹

Όπως αναφέραμε, πειράματα επιλεκτικότητας γίνονται ανάμεσα σε αισθητήρες όπου έχουν ενζυματικό DNA το οποίο είναι διαλυμένο μέσα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Για το τρισθενές χρώμιο δεν ήταν διαθέσιμο κάποιο μέταλλο που να έχει αντίστοιχα το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Έτσι λοιπόν είναι αδύνατον να κάνουμε πειράματα επιλεκτικότητας με την μεθοδολογία που ακολουθήσαμε πριν. Παρόλα αυτά σε ένα αισθητήρα ο οποίος ήταν κατασκευασμένος για ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου κάναμε ρίψη μολύβδου σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο αισθητήρας μας δεν είχε κάποια απόκριση όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (46). Παρόλα αυτά το πείραμα μας δεν είναι αξιόπιστο για τους λόγους που περιγράψαμε παραπάνω.



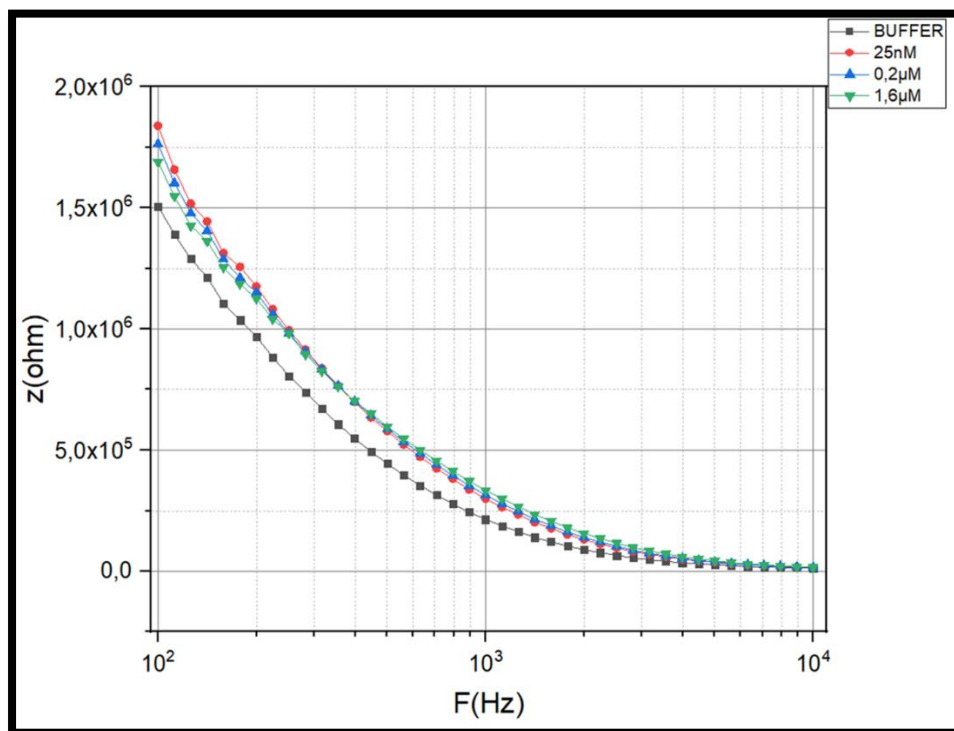
Εικόνα 46: Σε αισθητήρα κατασκευασμένο για ανίχνευση ιόντων τρισθενούς χρωμίου, ρίχνουμε μόλυβδο και δεν ανταποκρίνεται.

VII.

Στο παρακάτω πείραμα κατασκευάσαμε έναν αισθητήρα όπως ακριβώς έχουμε περιγράψει στο κεφάλαιο 5, τροποποιημένο με ομάδες θειόλης. Η διαφορά που είχε από τους προηγούμενους αισθητήρες είναι ότι αυτός δεν είχε νανοσωματίδια πλατίνας. Ο αισθητήρας κατασκευάστηκε για ανίχνευση ιόντων μολύβδου και η απόκριση του, τουλάχιστον στις χαμηλές συγκεντρώσεις είναι εμφανής. Παρόλα αυτά σε μια πληθώρα πειραμάτων που εκτελέσαμε παρατηρήσαμε ότι οι αισθητήρες μας δεν παρουσίαζαν την ίδια συνέπεια με αυτούς που περιείχαν νανοσωματίδια και η ανίχνευση του δεν ήταν ξεκάθαρη (Εικόνα 47).

Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά καθώς 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, αλλά και ομάδων θειόλης. [73], [74]. Η εξήγηση αυτού βασίζεται στην δημιουργία ισχυρότερων

δεσμών μεταξύ των χαρακτηριστικών ομάδων θειόλης με μεταλλικά νανοσωματίδια.[17]



Εικόνα 47: Εκτέλεση πειράματος ανίχνευσης ιόντων μολύβδου σε αισθητήρα χωρίς νανοσωματίδια πλατίνας.

5.5 Σύγκριση Amino – Thiol modified DNAzymes.

Ξεκινώντας, παρατηρούμε ότι και οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν πολύ καλά όρια ανίχνευσης, με το κατώτατο όριο να είναι τα 12,5nM.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι αισθητήρες που είναι τροποποιημένοι με ομάδες θειόλης είναι ότι έχουν σημαντικά ελαττωμένο χρόνο προετοιμασίας, οι διεργασίες έχουν μικρότερο κόστος και η διεργασία κατασκευής είναι πιο απλή. Παρόλα αυτά η δυναμική τους συμπεριφορά κρίνεται ασταθής καθότι χρειάστηκαν περισσότερα πειράματα ώστε να εξαχθούν τα παραπάνω αποτελέσματα.

Από την άλλη πλευρά οι αισθητήρες που είναι τροποποιημένοι με αμινομάδες αν και έχουν μεγαλύτερο κόστος και πιο σύνθετη και χρονοβόρα διαδικασία, μας επιτρέπουν να εξάγουμε αποτελέσματα από αισθητήρες με πιο σταθερή συμπεριφορά και έχουν καλύτερο yield από αυτούς με τις ομάδες θειόλης.

6ο Κεφάλαιο

Συμπεράσματα κα Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρουσιάστηκε η κατασκευή ενός υβριδικού τύπου ηλεκτροχημικού αισθητήρα ο οποίος αποτελείται από νανοσωματίδια πλατίνα και DNAzymes. Ως κύριος σκοπός ήταν με την χρήση της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης να γίνει ανίχνευση δυο μεταλλικών ιόντων Pb^{2+} και Cr^{3+} .

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. Και οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν πετυχημένες καθώς ο βιοαισθητήρας κατάφερε να ανιχνεύσει και τα δύο ιόντα βαρέων μετάλλων σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Συγκρίνοντας παρόλα αυτά τις δύο τεχνικές, η κατάληξη ήταν ότι τα DNAzymes με ομάδες θειόλης, έχουν καλύτερα αποτελέσματα έναντι DNAzymes τροποποιημένα με ομάδες αμίνης.

Επίσης έγιναν πειράματα επιλεκτικότητας ανάμεσα σε αισθητήρες όπου έχουν ενζυματικό DNA το οποίο είναι διαλυμένο μέσα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα να επιβεβαιώσουν την επιλεκτικότητα των βιοαισθητήρων.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία έδειξαν ότι οι ίδιοι βιοαισθητήρες, τροποποιημένοι με ομάδες θειόλης, χωρίς νανοσωματίδια πλατίνας δεν παρουσίαζαν την ίδια συνέπεια με αυτούς που περιείχαν νανοσωματίδια και η ανίχνευσή τους δεν ήταν ξεκάθαρη.

Συμπερασματικά λοιπόν, οι αισθητήρες αποδείχθηκαν αξιόπιστοι, με καλή ευαισθησία, ακρίβεια και επιλεκτικότητα.

Ως στόχοι για μελλοντική έρευνα θα μπορούσαν να είναι η επανεξέταση των πρωτοκόλλων thiol και amino τόσο για να επιτευχθεί καλύτερη ευαισθησία όσο και χαμηλότερο όριο ανίχνευσης. Σημαντικό είναι ακόμα να εξετασθεί η επαναχρησιμοποίηση της διάταξης, αλλά και να γίνουν μετρήσεις εντός μικροροϊκών συστημάτων για καλύτερο έλεγχο των πειραματικών παραμέτρων.

Επίσης μπορούσαν να γίνουν μετρήσεις και για άλλα βαρέα μέταλλα όπως είναι το κάδμιο, ο υδράργυρος κ.α. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε αν γινόταν μελέτη και σε υποστρώματα πολυϊμιδίου (Kapton), λόγω του έντονου τεχνολογικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν και των προοπτικών εφαρμογών τους.

Όσον αφορά το κομμάτι της εξήγησης των πειραματικών αποτελεσμάτων, με την μείωση των συχνοτήτων θεωρούμε ότι θα προκύπταν δεδομένα με τα οποία θα μπορούσαμε να κατασκευάσουμε τα διαγράμματα Nyquist. Με την εξαγωγή αυτών θα αντιλαμβανόμασταν και το αντίστοιχο κύκλωμα που δημιουργείται, και μπορούσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας και με αυτόν τον τρόπο.

Βιβλιογραφία

- [1] Δημήτρης Τσουκαλάς, «Απόσπασμα Σημειώσεων του Μεταπτυχιακού Μαθήματος "Μίκρο-Νανοαισθητήρες",» Αθήνα, 2010.
- [2] Fraden Jacob. Handbook of modern sensors: physics, designs, and applications. Vol. 3. New York: springer, 2010.
- [3] Μαδιανός Λεωνίδας, ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ " Χημικοί αισθητήρες νανοσωματιδίων " , Αθήνα 2013
- [4] Gardner, Julian W., and Florin Udrea. *Microsensors: principles and applications*. John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [5] Elwenspoek, Miko, and Remco J. Wiegerink. *Mechanical microsensors*. Springer Science & Business Media, 2001.
- [6] Sinclair, Ian. *Sensors and transducers*. Elsevier, 2000.
- [7] Naresh, Varnakavi, and Nohyun Lee. "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors." *Sensors* 21.4 (2021): 1109.
- [8] Lucilene Dornelles Mello, Lauro Tatsuo Kubota," Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries "Food Chemistry (2002)
- [9] Roduner Emil. "Size matters: why nanomaterials are different." *Chemical society reviews* 35, no. 7 (2006): 583-592
- [10] Lange, F.F. and Metcalf, M. (1983). "Processing-Related Fracture Origins: II, Agglomerate Motion and Cracklike Internal Surfaces Caused by Differential Sintering". *J. Am.*
- [11] Φλεμοτόμος Γιάννης, Διπλωματική Εργασία: «Χημικοί Αισθητήρες Νανοσωματιδίων για Ανίχνευση Υγρασίας», Αθήνα 2017
- [12] Zabet-Khosousi Amir and Al-Amin Dhirani. "Charge transport in nanoparticle assemblies." *Chemical reviews* 108, no. 10 (2008): 4072-4124
- [13] ΣΚΟΤΑΔΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ, ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, " ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ", ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2013
- [14] Zabet-Khosousi Amir and Al-Amin Dhirani. "Charge transport in nanoparticle assemblies." *Chemical reviews* 108, no. 10 (2008): 4072-4124.
- [15] Μαργαρίτα Δημακογιάννη, Διδακτορική Διατριβή, "Μελέτη της Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας Μονοδιάστατων Άτακτων Συστημάτων Εφαρμογή στο DNA και σε άλλες συναφείς δομές" Αθήνα 2011

- [16] D. Rawtani, B. Kuntmal, Y. Agrawal, Charge transfer in DNA and its diverse modelling approaches, *Front Life Sci.* 9 (2016) 214–225.
- [17] 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
- [18] 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.
- [19] Tudose Ioan Valentin, Florin Comanescu, Petronela Pascariu, Stefan Bucur, Laurentiu Rusen, Felicia Iacom, Emmanuel Koudoumas and Mirela Petruta Suche. "Chemical and physical methods for multifunctional nanostructured interface fabrication." *Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications* (2019): 15-26
- [20] Evangelos Aslanidis, PhD thesis, " Nanoparticle Sensor Arrays on Flexible Substrates", April 2021
- [21] Mattox Donald M. "Physical sputtering and sputter deposition (sputtering)." *Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing* (2010): 237-286.
- [22] Smentkowski Vincent S. "Trends in sputtering." *Progress in Surface Science* 64, no. 1- 2 (2000): 1-58.
- [23] Farnsworth H. E. "A Simple Contamination-Free Electron Gun." *Review of Scientific Instruments* 21, no. 1 (1950): 102-102
- [24] Plummer James D. *Silicon VLSI technology: fundamentals, practice, and modeling*. Pearson Education India, 2009.
- [25] Ai-Yu Liou, Thesis, " Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Sensors for the Detection of Heavy Metal Ions in Water-based Solutions", Delft University, November 2020
- [26] Υψηλάντη Όλγα, Πτυχιακή Εργασία, " Βαρέα μέταλλα σε υγρά απόβλητα. Η περίπτωση του υδραργύρου, του καδμίου και του μολύβδου", Μυτιλήνη 2012
- [27] 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.
- [28] Sharma, Sanjay K., ed. *Heavy metals in water: presence, removal and safety*. Royal Society of Chemistry, 2014.
- [29] 'Η Χημεία του Περιβάλλοντος με μία Ματιά', 1 η έκδ. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Κωνσταντίνου, Κ., Σ. και Φουρναράκη, Α., Κ., Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2008

- [30] . Kotaś, J. and Stasicka, Z. (2000) 'Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation', *Environmental Pollution*, 107(3), pp. 263–283
- [31] Jacobs, James A., and Stephen M. Testa. "Overview of chromium (VI) in the environment: background and history." *Chromium (VI) handbook* (2005): 1-21.
- [32] Jobby, Renitta, et al. "Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr (VI)]: a comprehensive review." *Chemosphere* 207 (2018): 255-266.
- [33] McConnell, Erin M., et al. "Biosensing with DNAzymes." *Chemical Society Reviews* 50.16 (2021): 8954-8994.
- [34] Aguirre, Sergio D., et al. "A sensitive DNA enzyme-based fluorescent assay for bacterial detection." *Biomolecules* 3.3 (2013): 563-577.
- [35] Ali, Monsur, and Bruno Salena. "A Sensitive DNA Enzyme-Based Fluorescent Assay for Bacterial Detection."
- [36] Breaker, Ronald R., and Gerald F. Joyce. "A DNA enzyme that cleaves RNA." *Chemistry & biology* 1.4 (1994): 223-229.
- [37] Yang, Hualin, et al. "Development of DNA biosensors based on DNAzymes and nucleases." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (2021): 1-16.
- [38] Tram, Kha, Pushpinder Kanda, and Yingfu Li. "Lighting up RNA-cleaving DNAzymes for biosensing." *Journal of Nucleic Acids* 2012 (2012).
- [39] 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.
- [40] 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
- [41] 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.
- [42] Lisdat, Fred, and D. Schäfer. "The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing." *Analytical and bioanalytical chemistry* 391 (2008): 1555-1567.
- [43] Πρίφτης, Παναγιώτης. "Χαρακτηρισμός διεπιφανειών με τεχνικές ηλεκτροχημικής εμπέδησης." (2019).
- [44] Bahadır, Elif Burcu, and Mustafa Kemal Sezgintürk. "A review on impedimetric biosensors." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 44.1 (2016): 248-262.

- [45] Benavente, J. "Electrochemical impedance spectroscopy as a tool for electrical and structural characterizations of membranes in contact with electrolyte solutions." *Recent Advances in Multidisciplinary Applied Physics*. Elsevier Science Ltd, 2005. 463-471.
- [46] Lvovich, V. F. "Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) applications to sensors and diagnostics." *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*; Kreysa, G., Ota, K.-i., Savinell, RF, Eds (2014): 485-507.
- [47] Magar, Hend S., Rabeay YA Hassan, and Ashok Mulchandani. "Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications." *Sensors* 21.19 (2021): 6578.
- [48] Αντώνης Καραντώνης, "Ηλεκτροχημική εμπέδηση στη Χημική Μηχανική Βασικές αρχές μέσα από τρία παραδείγματα", 7 Σεπτεμβρίου 2009
- [49] Μαδιανός, Λεωνίδα, Διδακτορική Διατριβή, "Ανάπτυξη χημικών και βιολογικών αισθητήρων με εφαρμογή στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων." (2018).
- [50] Barsoukov, Evgenij, and J. Ross Macdonald. "Impedance spectroscopy theory, experiment, and." *Applications, 2nd ed.*(Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2005) (2005).
- [51] Yuan, Xiao-Zi, et al. "Electrochemical impedance spectroscopy in PEM fuel cells: fundamentals and applications." (2010).
- [52]) Lisdat, F.; Schäfer, D. The Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy for Biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391 (5), 1555–1567
- [53] Randviir, E. P.; Brownson, D. A. C.; Gómez-Mingot, M.; Kampouris, D. K.; Iniesta, J.; Banks, C. E. Electrochemistry of Q-Graphene. *Nanoscale* 2012, 4 (20), 6470.
- [54] Daniels, J. S.; Pourmand, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*. 2007, pp 1239–1257.
- [55] Jorcin, Jean-Baptiste, et al. "CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy." *Electrochimica Acta* 51.8-9 (2006): 1473-1479.
- [56] Evgenij Barsoukov, J. Ross Macdonald, "Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications Second Edition", John Wiley & Sons, 2005, Chapters 1, 2.2, 4.5.3
- [57] Sato, Norio. *Electrochemistry at metal and semiconductor electrodes*. Elsevier, 1998.
- [58] Bockris, J. O. M., and A. K. N. Reddy. "Modern Electrochemistry 2B: Electrodics in Chemistry." *Engineering, Biology and Environmental Science. 2nd ed., Revised: Kluwer Academic Publishers* (2000).
- [59] Κούτσουπα, Σεβαστή, Διπλωματική Εργασία, "Ηλεκτροχημική αναγωγή σε στερεά κατάσταση οξειδίων του σιδήρου από κατάλοιπα βωξίτη." (2019).

- [60] Bard, Allen J., Larry R. Faulkner, and Henry S. White. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2022.
- [61] J. O. Bockris, A. K. Reddy και M. E. Gamboa-Aldeco, *Modern Electrochemistry 2A*, 2000: Springer US
- [62] del Valle, Manel, and Alessandra Bonanni. "Impedimetric DNA biosensors based on nanomaterials." *Biosensors Nanotechnology* (2014): 81-110.
- [63] Macdonald, J. R. "DR Franceschetti in JR Macdonald. impedance spectroscopy." (1987).
- [64] Sun, Jianbo, and Yuxin Liu. "Unique constant phase element behavior of the electrolyte-graphene interface." *Nanomaterials* 9.7 (2019): 923.
- [65] Magar, Hend S., Rabeay YA Hassan, and Ashok Mulchandani. "Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications." *Sensors* 21.19 (2021): 6578.
- [66] Krause S (2003) *Encyclopedia of electrochemistry, vol 3: instrumentation and electroanal chem*. Wiley VCH, Weinheim
- [67] Crespilho, Frank N., ed. "Advances in Bioelectrochemistry Volume 5: Emerging Techniques and Materials, Biodevice Design and Reactions." (2022).
- [68] Γουρζής, Τηλέμαχος. "Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός ηλεκτροδίων με νανοδομημένες πολυμερικές μεμβράνες με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα για την αφαλάτωση και τον καθαρισμό υδάτων." (2022).
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] Ibrahim, Mouhamad, et al. "Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy." *Journal of Electrical Bioimpedance* 4.1 (2013): 13-22.
- [72] Πιπερτζής Αχιλλέας, Διδακτορική Διατριβή, " Ιοντική αγωγιμότητα στερεών πολυμερικών ηλεκτρολυτών με εφαρμογές σε μπαταρίες ιόντων Λιθίου", 2020
- [73] 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.

[74] 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