

**UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA**  
**FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA**  
**MEDIULUI**

Rezumatul tezei de doctorat

**Materiale compozite pe bază de carbon pentru  
senzori și biosenzori electrochimici**

doctorand ing. **Elida Cristina ILINOIU**

Conducător științific,

**Prof. Univ. Dr. Ing. Rodica PODE**

Președinte comisie:

**Prof.univ.dr.ing. Teodor TODINCA**

Referenți științifici:

**Conf. univ. dr. Pier Andrea SERRA**

**Prof. univ.dr.ing. Ciprian RADOVAN**

**Prof. univ. Dr. Ing. Nicolae VASZILCSIN**

2013

# Materiale compozite pe bază de carbon pentru senzori și biosenzori electrochimici

**Tematica tezei de doctorat vizează** dezvoltarea unor senzori electrochimici miniaturizați, sensibili și ieftin de realizat prin cuplarea conceptelor noi în ceea ce privește tehnologiile avansate inovative care deschid noi oportunități pentru o utilizare clinică cât mai largă a acestora.

În general, eficiența senzorilor electrochimici poate fi evaluată din punct de vedere al timpului de răspuns, relației semnal-zgomot pentru aprecierea sensibilității, selectivității, și limitei de detecție (LOD). În plus, pentru aplicațiile *in vivo* se impune anumite caracteristici specifice: biocompatibilitatea și biostabilitatea pe termen lung. Pentru ca un material de electrod să opereze ca și senzor, trebuie să îndeplinească următoarele caracteristici: să prezinte conductivitate suficientă pentru aplicația aleasă, dimensiunea potrivită mediului investigat, ușurința de fabricare, stabilitate, compatibilitate cu mediul, eliminarea inconveniențelor legate de procesarea semnalului, integrarea într-un sistem funcțional. În această direcție, se impune necesitatea găsirii unor materiale noi cât și tehnologii de fabricare a microelectrozilor utilizați în înregistrare, stimulare și detecție.

Materialele de electrod pe bază de carbon prezintă potențial ridicat în electroanaliză deoarece sunt caracterizați de o fereastră de potențial largă și selectivitate superioară pentru detecția analiților țintă de tipul moleculelor neurotransmițătoare.

Materialele din carbon sub formă de grafit, carbon sticlos, fibră de carbon, nanotuburi de carbon, etc., sunt materiale importante în dezvoltarea electrozilor solizi, dar considerând materialele compozite pe bază de carbon în general, proprietățile lor prezintă îmbunătățiri în comparație cu electrozii solizi de carbon din cauza anumitor avantaje interesante: ușurința în fabricare care permite construcția unor senzori cu configurații și mărimi diferite, matricea polimerică care oferă stabilitate mecanică și chimică a compozitului, curent de fond mic, comportament de rețea de microelectrozi, miniaturizarea ușoară, completat de o compatibilitate bună pentru electroanaliza *in-vivo* a moleculelor neurotransmițătoare.

Pentru a înlătura dezavantajul major pe care îl prezintă materialele compozite pe bază de carbon cu privire la cinetica lentă, se impune încorporarea unor materiale catalitice specifice în matricea compozitului. Amestecul de zeolit și grafit a fost propusă din anii 1980 în forme variate, ducând la o clasă de electrozi modificați cu zeolit (ZME). Combinând materialele în deajuns de sensibile cu geometrii mai mici ale electrozilor funcționali, se pot obține echipamente importante de detecție pentru monitorizarea *in-vivo* a compușilor în celulele organismelor vii. Mai mult, microelectrozii care conțin materiale compozite, cuplează avantajele sistemului de microelectrozi cu avantajele compozitului asigurând o cădere de tensiune mai mică, o stabilitate a semnalului, o creștere a curentului util și un raport semnal-zgomot mai bun.

**Cercetările noastre s-au concentrat pe studiul** răspunsului anodic al dopaminei (DA), un neurotransmițător semnificativ, care joacă un rol important în sistemul nervos central, cardiovascular și hormonal. Anormalități extreme ale nivelelor de concentrație ale DA pot da indicații asupra bolii Parkinson și de asemenea, semnale clinice ale infecțiilor HIV. Deci, există un interes continuu în dezvoltarea metodelor simple, sensibile și de încredere pentru determinarea dopaminei. Dopamina este un neurotransmițător și un neurohormon ce aparține familiei catecolamine a compușilor fenolici. Dopamina este folosită de asemenea ca și drog și acționează asupra sistemului nervos pentru a crește ritmul cardiac și presiunea în sânge. Se presupune că o deficiență de dopamină în creier cauzează schizofrenia și boala Parkinson. Deci detecția dopaminei din țesutul creierului este vitală în diagnosticările clinice.

**Pentru a atinge obiectivul tezei,** mai mulți microelectrozi compoziți grafit-epoxi, ex.,  $\mu$ -GEC( microelectrod be bază de grafit simplu în matrice de epoxi ) ,  $\mu$ -ZN-GEC (microelectrod be bază de grafit în matrice de epoxi modificat cu zeolit natural),  $\mu$ -ZS-GEC(microelectrod be bază de grafit în matrice de epoxi modificat cu zeolit sintetic) și CNT-film  $\mu$ -ZS-GEC(microelectrod be bază de grafit în matrice de epoxi modificat cu zeolit sintetic și acoperit cu film de nanotuburi de carbon) în comparație cu aceeași compoziție de macroelectrozi, ex., M-GEC(macroelectrod be bază de grafit simplu în matrice de epoxi), M-ZN-GEC (macroelectrod be bază de grafit în matrice de epoxi modificat cu zeolit natural) și M-ZS-GEC(macroelectrod be bază de grafit în matrice de epoxi modificat cu zeolit sintetic), au fost studiați pentru a selecta schema unei detecții selective și simultane optime a dopaminei în prezența acidului ascorbic. Protocolul de preparare a fost stabilit pe baza optimizării metodei de amestecare, a raportului dintre componentele epoxi, raportul dintre grafit și epoxi, cât și a raportului grafit-zeolit-epoxi în relație cu comportamentul electrochimic al sistemului clasic redox ferri/ferrocianură de potasiu, care permite și determinarea ariei suprafeței electroactive a electrozilor. De asemenea, membrana polimerică de Nafion a fost testată în vederea detecției selective a dopaminei în prezența altor componenți relevanți, precum acidul ascorbic, DOPAC - un produs metabolic al dopaminei-și în prezența acidului uric, care ar putea interfera în detecția dopaminei.

În plus, a fost testat efectul electrocatalitic al nanotuburilor de carbon, în vederea îmbunătățirii sensibilității pentru detecția dopaminei.

O altă direcție a cercatării a avut în vedere monitorizarea amperometrică *in-vivo* a oxigenului dizolvat din creier, cel mai important substrat oxidativ pentru reacții biochimice și pentru producerea energiei necesare creierului.

Pe baza protocolului de preparare propus, au fost construiți cu succes mai mulți microelectrozi compoziți grafit-epoxi:  $\mu$ -GEC,  $\mu$ -ZN-GEC și  $\mu$ -ZS-GEC în comparație cu aceeași compoziție de macroelectrozi, ex., M-GEC, M-ZN-GEC și M-ZS-GEC.

Compozitul simplu grafit-epoxi a fost considerat ca și referință și electrozii modificați cu zeolit au fost construiți pentru a testa efectul superiorității prezenței zeolitului în matricea compozitului asupra performanțelor de detecție în aplicații ulterioare stabilite.

Au fost folosite tehnici de voltametrie ciclică pentru a determina aria suprafeței electroactive a materialelor construite. Aria suprafeței electroactive a M-GEC a fost egală cu  $0.165 \text{ cm}^2$ , care a fost cea mai mare dintre toți macrosenzorii, suprafață care a scăzut de la M-

GEC la M-ZS-GEC ( $0.135 \text{ cm}^2$ ) și M-NZ-GEC ( $0.127 \text{ cm}^2$ ), dar în toate cazurile ariile suprafețelor electroactive au fost mai mici decât aria geometrică calculată de  $0.196 \text{ cm}^2$ .

Construcția microsenzorilor a prezentat o geometrie de  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$  și o lungime finală de 5 cm. Pentru studiile de interferență și îmbunătățire a performanțelor electroanalitice ulterioare, au fost construiți microelectrozi cu strat de Nafion (Nafion-  $\mu$ -GEC, Nafion-  $\mu$ -ZN-GEC, Nafion-  $\mu$ -ZS-GEC) și respective strat de nanotuburi de carbon (CNT-film-  $\mu$ -ZS-GEC).

Materialul de electrod compozit simplu grafit-epoxi ca material de referință și compozitele grafit-zeolit-epoxi au fost construite în etape ce au implicat mai multe proceduri de optimizare: găsirea celor mai bune condiții de polimerizare a răsinii epoxi, o metodă potrivită de amestecare a componentelor epoxi cu particule de grafit, urmat de optimizarea raportului grafit-epoxi și optimizarea raportului grafit-zeolit-epoxi, toate procedurile de optimizare bazându-se pe caracteristicile de reversibilitate și sensibilitate ridicată pentru sistemul redox feri-ferrocianură de potasiu.

Conform sistemului clasic ferri/ferrocianură și cu ajutorul voltametriei ciclice au fost determinate ariile suprafețelor electroactive ale materialelor construite. Aria suprafeței electroactive pentru  $\mu$ -GEC egală cu  $1.03 \cdot 10^{-3}$  a fost cea mai mare dintre toți senzorii, valoare ce a scăzut de la  $\mu$ -GEC la  $\mu$ -ZN-GEC ( $5.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ) și  $\mu$ -ZS-GEC ( $3.8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ), dar în toate cazurile ariile suprafețelor electroactive au fost mai mari decât ariile suprafețelor geometrice de  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ . Rezultate comparabile au fost găsite și pentru microsenzorul CNT film- $\mu$ -ZS-GEC cu valori ale ariei egale cu  $5.88 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ .

Toți senzorii construiți au prezentat un număr mare de microzone conductive și majoritatea suprafeței lor s-a dovedit a fi electroactivă. De asemenea, pe baza relației liniare a  $I$  vs.  $v^{1/2}$  la valori ale vitezei de scanare între 25 până la  $454 \text{ mV s}^{-1}$ , s-a găsit că procesul electrochimic care decurge la suprafața senzorilor e controlat de difuzie.

O investigație mai detaliată a fost făcută pentru microelectrozii compoziți grafit-epoxi ( $\mu$ -GEC), grafit-zeolit natural-epoxi ( $\mu$ -NZ-GEC), grafit-zeolit sintetic-epoxi ( $\mu$ -SZ-GEC) din punct de vedere al comportamentului de tip macroelectrod/microelectrod. Toate voltamonogramele la viteze de scanare lente au prezentat un răspuns sigmoidal consistent cu un comportament de microelectrod. La viteze de scanare rapide, din forma voltamogramelor au fost evidențiate picurile de oxidare/reducere, o histereză substanțială în special la senzorul  $\mu$ -SZ-GEC, caracteristic pentru un comportament de macroelectrozi solizi.

Luând în considerare că scopul principal al acestor materiale compozite este de a detecta selectiv/simultan dopamina (DA) și acidul ascorbic (AA) au fost investigate capacitățile de adsorbție pentru dopamină și acid ascorbic ale zeolitului natural și la celui sintetic. Zeolitul sintetic a prezentat o capacitate de adsorbție bună pentru DA, ceea ce îl face potrivit pentru a fi folosit ca și o membrană permselectivă pentru a îmbunătăți detecția selectivă a DA în prezența AA. Această proprietate este datorată posibilității preconcentrării DA pe zeolitul sintetic încorporat în electrodul compozit pe bază de carbon îmbunătățind astfel concentrația locală și excluzând prezența AA la suprafața electrodului.

Voltametria ciclică, voltametria diferențială pulsată și voltametria cu undă patrică, testate pentru detecția simultană de AA și DA pe macroelectrozi compoziți, au permis detecția ambilor analiți, observându-se o sensibilitate mai bună a macroelectrozilor compoziti de tip grafit-epoxi -modificat cu zeolit sintetic pentru detecția dopaminei. De

asemenea, la acest electrod, s-a obținut o valoare maximă de separare a potențialelor de oxidare a celor doi analiți investigați de minim 200 mV, folosind voltmetria cu undă patratică, în condițiile optimizate caracterizate prin un pas de potențial de 0.0025V, amplitudinea de modulație de 0.1V și frecvența de 50 Hz. În condițiile experimentale mai sus prezentate, efectul catalitic privind detecția dopaminei s-a dovedit favorabil la microelectrozii compoziți grafit-epoxi modificat cu zeolit sintetic, permițând creșterea sensibilității și selectivității față de dopamină datorită unei posibile atracții electrostatice între cationul dopaminei și suprafața încărcată negativ a zeolitului sintetic și respingerea electrostatică a anionului de acid ascorbic.

De asemenea, macroelectrozii compoziți cu zeolit sintetic au dat cele mai bune rezultate electroanalitice la detecția dopaminei folosind cronoamperometria, cea mai utilă tehnică pentru aplicații practice.

Comportamentul electrochimic a AA a fost investigat prin CV la toți microsenzorii compoziți pe bază de carbon, oferind o imagine asupra sensibilității pentru acidul ascorbic. CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC a prezentat sensibilitatea cea mai mare egală cu 2145 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  și un potențial de oxidare mai mic de 0.220V/ Ag/AgCl, pe când microsenzorii  $\mu$ -SZ-GEC au prezentat cea mai mică sensibilitate la detecția acidului ascorbic și cel mai mare potențial de oxidare, egal cu 0.521 V.

Aplicații ulterioare cu privire la detecția selectivă a dopaminei în prezența acidului ascorbic, au demonstrat o usoară scădere a sensibilității pentru detecția AA la microsenzorul  $\mu$ -SZ-GEC (sensibilitate egală cu 554.11 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  și  $E=0.521$  V). Mai mult, pentru a evita interferența AA în detecția DA în aplicații practice și poate fi investigată de asemenea membrana Nafion permselectivă.

Detecția directă a DA pe  $\mu$ -GEC,  $\mu$ -ZN-GEC și  $\mu$ -ZS-GEC cu tehnica CV a arătat că microsenzorul  $\mu$ -ZS-GEC a prezentat sensibilitate bună (2027 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ), potențial de oxidare îmbunătățit ( $E=0.161$  V / Ag/AgCl) cu o diferență de potențial între picurile de oxidare/reducere de  $\Delta E=0.069$  V și cea mai bună valoare pentru limita de detecție (7.03  $\mu\text{M}$ ) prin comparație cu microsenzorii  $\mu$ -GEC și  $\mu$ -ZN-GEC.

Când au fost comparați microsenzorii compoziți grafit-zeolit sintetic-epoxi cu cei acoperiți cu film de nanotuburi de carbon, parametrii analitici au arătat rezultate îmbunătățite din punct de vedere al sensibilității pentru CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC (12321 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ) dar nu și când s-a comparat valoarea potențialului de oxidare al dopaminei, care pentru CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC a fost la  $E=0.216$  V Ag/AgCl.

Microelectrozii, deși au avut aceeași compoziție ca și macroelectrozii, au permis obținerea unor sensibilități mai bune pentru detecția DA. O sensibilitate de 2044 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  a fost atinsă cu microelectrozii compoziți conținând zeolit sintetic față de 0.58 nA  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$  obținută la aceeași compoziție de macroelectrozi.

Acest rezultat obținut pentru cazul de detecție directă al dopaminei poate deschide calea către noi abordări pentru cuantificarea sa analitică. În această direcție, microsenzorii menționați mai sus au fost acoperiți cu un strat de Nafion.

Deși membrane permselectivă de Nf este folosită în mare parte în electroanaliză, în condiții particulare,  $\mu$ -ZS-GEC este evidențiat ca fiind cel mai bun material pentru detecția DA. Trebuie menționat, că prin acoperirea microsenzorilor cu Nafion, poate fi considerată o detecție indirectă, datorită apariției unor picuri bine evidențiate pe partea de reducere, fapt ce

este de asemenea valabil pentru microsenzorii CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC. Avantajul microsenzorilor modificați cu polimerul Nafion de a fi selectiv asupra celor mai importante molecule interferente va fi exploatat în măsurători ulterioare în aplicațiile *in-vivo*. Potențialul de folosire a acestor microsenzori în aplicații *in-vivo*, în special  $\mu$ -ZS-GEC care a prezentat cel mai mare procentaj de respingere față de acidul ascorbic (94.95%) calculat din tehnicile CV, necesită totuși investigații ulterioare. Trebuie evidențiate totuși rezultatele comparative de detecție individuală a dopaminei cât și simultane pe  $\mu$ -ZS-GEC, care a arătat că în prezența acidului ascorbic, semnalul voltametric al dopaminei a crescut cu doar cu 0.8%, ceea ce înseamnă că acidul ascorbic nu a interferat în detecția dopaminei.

Amperometria la potențial constant (CPA), este cea mai practică tehnică folosită pentru detecția directă a dopaminei. Prin aceasta, s-au obținut cele mai bune rezultate cu  $\mu$ -ZS-GEC (în comparație cu  $\mu$ -GEC și  $\mu$ -ZN-GEC) dar comparabile cu microsenzorul CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC, în special la potențialul de oxidare de 0.150 V. Când membrana de Nafion a fost atașată, rezultatele amperometrice sunt considerabil mai bune din punct de vedere a sensibilității și limitelor de detecție, luând în considerare potențialul de oxidare de +0.430 V, cu mențiunea că la microsenzorii CNT-film- $\mu$ -ZS-GEC s-a aplicat un potențial de oxidare de +0.250 V.

Nici o interferență semnificativă nu a fost observată la expunerea microsenzorilor compoziți acoperiți cu film de Nf, molecule electroactive prezente în fluidul extracelular striatal la concentrații farmacologice relevante (raspunsul AA a fost testat pentru concentrații de 500  $\mu$ M, DOPAC pentru 10  $\mu$ M, UA pentru 2.97  $\mu$ M, iar DA pentru 1  $\mu$ M) prin tehnica CPA, la o valoare a potențialului de 0.430 V. La aceasta valoarea de potențial se presupune că toate moleculele ar trebui să fie oxidate, și ca o consecință să interfere cu detecția DA.

Utilitatea microsenzorilor compoziți grafit-epoxi a fost investigată pentru monitorizarea *in vivo* a  $O_2$  dizolvat în creier folosind tehnica amperometriei la potențial constant (CPA).  $O_2$  fiind cel mai important substrat oxidativ pentru reacțiile biochimice și pentru producerea energiei pentru creier. Concentrația oxigenului extracelular din creier a fost stimulată prin injectarea a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahidropyrine (MPTP), care este cunoscută pentru inducerea oxidării neuronale. Folosind calibrări *in vitro*, în urma experimentelor *in vivo*, a fost posibilă estimarea concentrației de  $O_2$  dizolvat, după administrarea MPTP. Procedura *in-vivo* folosind un microsenzor compozit nou zeolit-grafit-epoxi a fost cu succes aplicată în detecția oxigenului extracelular și estimarea concentrației oxigenului molecular bazat pe pre/post calibrări.

Anumite aplicații *in-vivo* sau *in-vitro* vor impune cerințe specifice pentru obținerea anumitor performanțe electroanalitice, care presupun o selecție a construcției microsenzorilor pe bază de carbon în relație directă cu membrane sau filme.

**Nivelul de originalitate** și complexitate al acestui studiu a constat în:

- Elaborarea și manufacturarea de microelectrozi compoziți pe bază de grafit nemodificați sau modificați cu zeolit natural/sintetic cu proprietăți potrivite pentru detecția electrochimică *in-vitro* selectivă și simultană a dopaminei și a acidului ascorbic;

- Elaborarea și manufacturarea de macroelectrozi compoziți pe bază de grafit nemodificați sau modificați cu zeolit natural/sintetic pentru detecția electrochimică *in-vitro* selectivă și simultană a dopaminei și a acidului ascorbic;
- Evaluarea comportamentului materialelor de electrod în soluție de electrolit tampon la pH 7 cât și în prezența aniliților țintă, pentru a stabili o corelare între materialele de electrod obținute și a tipurilor de reacții desfășurate la suprafața lor;
- Realizarea experimentelor de detecție individuală, care oferă informații specifice, precum în cazul detecției de tip amperometric/voltametric, valoarea potențialului de detecție, domeniul de concentrații, calibrări, toate acestea pentru elaborarea unui protocol consistent și complex de detecție;
- Exploatarea caracteristicilor specifice ale tehnicilor voltametrice pulsate, precum voltametria diferențială pulsată sau voltametria cu partratică, pentru a îmbunătăți performanța electroanalitică în vederea detecției selective a dopaminei în prezența acidului ascorbic;
- Elaborarea unui protocol de detecție specific pentru dopamină și acidul ascorbic;
- Elaborarea unui protocol de detecție selectivă a dopaminei în prezența acidului ascorbic la microelectrozii compoziți pe bază de grafit acoperiți cu membrană de Nafion;
- Realizarea experimentelor de detecție *in vitro* îmbunătățită a dopaminei la microelectrozi pe bază de grafit modificați cu zeolit sintetic și acoperiți cu film de nanotuburi de carbon;
- Monitorizarea amperometrică *in vitro* a oxigenului dizolvat din creier cu ajutorul microelectrozilor modificați cu zeolit.