

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Δ. ΣΕΡΠΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ Α.Π.Θ.**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ**  
**ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ**  
**ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Δ. ΣΕΡΠΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ Α.Π.Θ.**

**M.Sc. ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ-ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΕΚΠΑ**

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΜΕ ΤΗ  
ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ  
ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ »**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του τομέα Φυσικής,  
Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.

**Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης: 2/12/2013**

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγήτρια Κουίδου Σοφία (Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γηρούση Στέλλα (Επιβλέπουσα καθηγήτρια )

Αναπληρωτής Καθηγητής Ζαχαριάδης Γεώργιος (Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Ανθεμίδης Αριστείδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Οικονόμου Αναστάσιος

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σαμανίδου Βικτώρια

Αναπληρωτής Καθηγητής Σωτηρόπουλος Σωτήρης

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Κωνσταντίνας Σέρπη, Χημικού Μηχανικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης την 2/12/2013 όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της Διατριβής με τίτλο **«Ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων με τη χρήση νανοϋλικών και εφαρμογής τους στη βιοανάλυση»**. Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της επιστήμης.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Καθηγήτρια Κουίδου Σοφία (Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γηρούση Στέλλα (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)

Αναπληρωτής Καθηγητής Ζαχαριάδης Γεώργιος (Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Ανθεμίδης Αριστείδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Οικονόμου Αναστάσιος

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σαμανίδου Βικτώρια

Αναπληρωτής Καθηγητής Σωτηρόπουλος Σωτήρης

© Κωνσταντίνα Δ. Σέρπη

© Α.Π.Θ.

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ»

ISBN

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το τμήμα Χημείας του  
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών  
του συγγραφέως» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2)

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων τα νανοϋλικά από άνθρακα, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοϊνες, τα φουλερένια και τα διαμάντια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή των DNA βιοαισθητήρων.

Ο κύριος στόχος της εφαρμογής των νανοϋλικών στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες DNA είναι η βελτίωση της ακινητοποίησης των μορίων του DNA, η ενίσχυση της μοριακής αναγνώρισης, αλλά και η ενίσχυση του σήματος μετάλλαξης. Αν και το κυριότερο πλεονέκτημα των νανοδομημένων υλικών είναι το μεγάλο εμβαδόν της επιφάνειάς τους, η χημική τροποποίηση των υλικών αυτών από διάφορα ένζυμα και ηλεκτροενεργά μόρια (μεσολαβητές, δείκτες), οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις στην ηλεκτροχημική ανίχνευση.

Ανάμεσα στα υλικά αυτά, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) καταδεικνύουν μια εξαιρετική βιοσυμβατότητα και προσφέρουν ένα περιβάλλον, το οποίο είναι κατάλληλο για την ακινητοποίηση βιολογικών συστατικών, ενώ ο υψηλός λόγος της επιφάνειάς τους προς τον όγκο τους συνεπάγεται και την αυξημένη συσσώρευση των βιομορίων.

Ειδικότερα η χρήση τους στην κατασκευή χημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων επιτρέπει την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών μετάλλαξης σήματος, βελτίωση της ακινητοποίησης βιοσυστατικών, απλές και γρήγορες αναλύσεις με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα καθώς και αναλύσεις *in vivo*.

Αντικείμενο, λοιπόν, της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτέλεσε η κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων DNA με τη χρήση νανοσωλήνων άνθρακα. Μελετήθηκε ο τρόπος κατασκευής των ηλεκτροδίων, η βολταμμετρική τους συμπεριφορά, οι συνθήκες ακινητοποίησης του DNA και προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των αισθητήρων.

Το σύνολο του πειραματικού μέρους της Διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ.Στέλλας Γηρούση, την οποία ευχαριστώ για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και παρακολούθηση καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής. Οφείλω, όμως, να την ευχαριστήσω για όλα αυτά τα χρόνια καλής και αποδοτικής

συνεργασίας, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με αποτέλεσμα τη συνεχή βελτίωσή μου, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Στον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Βουλγαρόπουλο, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, θα ήθελα να εκφράσω όχι μόνο τις ευχαριστίες μου για τη σημαντική συνεισφορά του στην ολοκλήρωση της Διατριβής, αλλά και την εκτίμηση και το θαυμασμό που τρέφω στο πρόσωπό του σε επιστημονικό και όχι μόνο επίπεδο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ.Σοφία Κουίδου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές της πάνω στα θέματα της Βιοχημείας, αλλά και για τη γενικότερη συνεισφορά της.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ.Κοβάτση Λήδα, από τον Τομέα Ανατομικής και Παθολογικής Ιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής, ευχαριστώ για την προσφορά των δειγμάτων DNA.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής επιτροπής για τις καθοριστικές παρατηρήσεις και διορθώσεις τους, κατά τη συγγραφή της Διατριβής, που συντέλεσαν στη διαμόρφωση της τελικής μορφής της.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελένη Παυλίδου, από τον Τομέα Φυσικής Στερεής Κατάστασης, του Τμήματος Φυσικής, ευχαριστώ για την αναντικατάστατη βοήθειά της στον οπτικό χαρακτηρισμό των ηλεκτροδίων.

Ευχαριστώ ακόμη τον κ. Χαράλαμπο Σιδηρόπουλο από το Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας, και τον κ. Στέφανο Χατζηνικολάου από το Εργαστήριο Χημικής Τεχνολογίας και Βιομηχανικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, για τη βοήθεια τους σε τεχνικά θέματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τις Δρ. Δέσποινα Αλεξιάδου και Δρ. Άντρεα Ιωάννου για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές τους, κατά το πρώτο διάστημα εκπόνησης της Διατριβής.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Αναλυτικής Χημείας για την ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας που μου προσέφεραν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια Διδάκτορα κ.Σοφία Καραστογιάννη, για την άριστη συνεργασία και βοήθεια που τόσο απλόχερα μου πρόσφερε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής. Την ίδια,

αλλά και τις Δρ. Ευτυχία Καραγεώργου και Δρ. Ευανθία Τολικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα για τη στήριξη και τη φιλία τους.

Εν κατακλείδι, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το σύζυγό μου, τις αδερφές μου και τη μητέρα μου για την ηθική στήριξη, την αμέριστη συμπαράστασή τους και την υπομονή τους στην προσπάθεια μου αυτή και να τους εκφράσω την αγάπη και την ευγνωμοσύνη μου.

Κωνσταντίνα Δ. Σέρπη  
Θεσσαλονίκη, 2013





*Στη μνήμη του πατέρα μου, Δημήτρη...*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	ι
<b>I.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1 ΟΙ A, B ΚΑΙ Z DNA ΔΟΜΕΣ.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ</b>	<b>12</b>
<b>1.7 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>13</b>
<b>1.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ .....</b>	<b>14</b>
<b>1.9 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>15</b>
<b>1.10 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟ DNA.....</b>	<b>16</b>
<b>2. ΑΝΑΓΩΓΗ, ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 ΑΝΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1 ΑΝΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ.....</b>	<b>24</b>
2.2.2.1 Ηλεκτρόδια άνθρακα .....	24
2.2.2.2 Ηλεκτρόδια υδραργύρου.....	26
<b>2.2.3 ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.4 ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.5 DNA-ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ .....</b>	<b>30</b>

2.2.6 ΣΤΕΡΕΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΑΜΑΛΓΑΜΑΤΟΣ (SAEs).....	32
2.3.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ .....	33
2.3.2 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΑΝΘΡΑΚΑ .....	34
2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA .....	34
3.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ .....	37
3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ –ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ .....	37
3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ .....	39
3.3 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ .....	41
3.3.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ .....	41
3.3.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ .....	43
3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	47
3.4.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	47
4.ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	49
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	49
4.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....	54
4.2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	54
4.2.2 ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....	55
4.3 ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΑ .....	58
1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ.....	59
4.4.1 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ.....	59
4.4.2 ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ .....	59
4.4.3 ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ .....	59
4.4.4 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....	61
4.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΕΩΣ .....	62
4.5.1 ΑΝΟΔΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....	62
4.5.2 ΚΑΘΟΔΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ .....	63
4.5.3 ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....	64
1.5.4 ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΑΛΛΑΓΗΣ ΜΕΣΟΥ .....	67
4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	67
4.6.1 Ο ΦΕΡΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΗΣ.....	67
4.6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ pH .....	68
4.6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΕΚΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ .....	70
4.6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΡΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ .....	70

4.6.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΩΝ .....	71
4.6.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΑΣΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ..	71
<b>5. ΝΑΝΟΥΪΚΑ .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 ΟΙ ΑΛΛΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ-ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.1 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΜΟΝΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ     (SWNTs).....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.2 ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ (MWNTs)     .....</b>	<b>77</b>
<b>5.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ.....</b>	<b>78</b>
<b>5.4.1 ΗΛΕΚΤΡΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ .....</b>	<b>78</b>
<b>5.4.2 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ .....</b>	<b>79</b>
<b>5.4.3 ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....</b>	<b>79</b>
<b>5.6 Η ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΥΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ DNA .....</b>	<b>79</b>
<b>6. ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>6.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....</b>	<b>100</b>
<b>6.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ .....</b>	<b>101</b>
<b>6.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ .....</b>	<b>102</b>
<b>6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ.....</b>	<b>105</b>
<b>6.4.1 ΓΕΝΙΚΑ.....</b>	<b>105</b>
<b>6.4.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΣΗ .....</b>	<b>105</b>
<b>7. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....</b>	<b>110</b>
<b>7.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....</b>	<b>110</b>
<b>7.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΑΣΙΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....</b>	<b>112</b>
<b>7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ .....</b>	<b>113</b>
<b>8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>116</b>
<b>II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>119</b>

<b>9. ΟΡΓΑΝΑ –ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ -ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ .....</b>	<b>119</b>
<b>9.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>119</b>
<b>9.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....</b>	<b>120</b>
<b>9.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA .....</b>	<b>121</b>
<b>9.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ JURKAT DNA.....</b>	<b>121</b>
<b>10. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ.....</b>	<b>123</b>
<b>10.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>123</b>
<b>10.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>124</b>
<b>10.3 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ (CNTPEs).....</b>	<b>125</b>
<b>10.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ CPE ΚΑΙ MWNTPEs .....</b>	<b>130</b>
<b>10.5 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ.....</b>	<b>131</b>
<b>10.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ.....</b>	<b>132</b>
<b>10.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>134</b>
<b>10.7.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>134</b>
<b>10.7.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....</b>	<b>135</b>
<b>10.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ.....</b>	<b>136</b>
<b>10.9 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .....</b>	<b>146</b>
<b>10.9.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>146</b>
<b>10.9.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA .....</b>	<b>147</b>
<b>10.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>149</b>
<b>11. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΥΜΕΝΙΟ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>150</b>
<b>11.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>150</b>

<b>11.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>150</b>
<b>11.2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (MWNTS/GCE) .....</b>	<b>150</b>
<b>11.2.2 ΥΜΕΝΙΟ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (MF/MWNTS/GCE) .....</b>	<b>151</b>
<b>11.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>151</b>
<b>11.3.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ MWNTS/GCE..</b>	<b>151</b>
<b>11.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>151</b>
<b>11.4 ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....</b>	<b>152</b>
<b>11.4.1 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ MWNTs/GCE.....</b>	<b>152</b>
<b>11.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΧΟΥΣ ΤΟΥ ΥΜΕΝΙΟΥ MWNTs-DMF.....</b>	<b>154</b>
<b>11.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ, ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ Hg<sup>2+</sup> .....</b>	<b>155</b>
<b>1 1.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ss ΚΑΙ dsDNA .....</b>	<b>157</b>
<b>11.6 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ DNA .....</b>	<b>162</b>
<b>11.7 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ DNA ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ.....</b>	<b>166</b>
<b>12. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ .....</b>	<b>169</b>
<b>12.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>169</b>
<b>12.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>169</b>
<b>12.2.1 ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....</b>	<b>169</b>
<b>12.2.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ .....</b>	<b>170</b>
<b>12.3 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ IL-CNTPE170</b>	
<b>12.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH.....</b>	<b>173</b>
<b>12.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>175</b>
<b>12.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>178</b>
<b>12.6.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>178</b>
<b>12.6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....</b>	<b>178</b>

<b>12.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΟΣ.....</b>	<b>180</b>
<b>12.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ.....</b>	<b>181</b>
<b>12.9 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΟ CNTPE ΚΑΙ ΣΤΟ ΠL-CNTPE .....</b>	<b>184</b>
<b>12.10 ΕΦΑΡΜΟΓΗ.....</b>	<b>185</b>
<b>12.10.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>185</b>
<b>12.10.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA .....</b>	<b>185</b>
<b>12.11 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>188</b>
<b>13. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....</b>	<b>189</b>
<b>13.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>189</b>
<b>13.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>189</b>
<b>13.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>189</b>
<b>13.2.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>189</b>
<b>13.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ MWNTS / CPE.....</b>	<b>191</b>
<b>13.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH.....</b>	<b>193</b>
<b>13.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>194</b>
<b>13.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ .....</b>	<b>195</b>
<b>13.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>197</b>
<b>13.8.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>197</b>
<b>13.8.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....</b>	<b>197</b>
<b>13.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ.....</b>	<b>198</b>
<b>13.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>202</b>
<b>14. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΤΑΣΕΝΕΡΓΩΝ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>203</b>



<b>14.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>203</b>
<b>14.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>203</b>
<b>14.2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (MWNTs/CPE) .....</b>	<b>203</b>
<b>14.2.2 ΥΜΕΝΙΟ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΤΑΣΕΝΕΡΓΩΝ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ (DTAB/MWNTs/CPE ΚΑΙ ΤΤΑΒ/MWNTs/CPE) .....</b>	<b>203</b>
<b>14.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>204</b>
<b>14.3.1 ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ.....</b>	<b>204</b>
<b>14.3.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ .....</b>	<b>204</b>
<b>14.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ DTAB/MWNTs/CPE ΚΑΙ ΤΤΑΒ/MWNTs/CPE.....</b>	<b>204</b>
<b>14.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH.....</b>	<b>206</b>
<b>14.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>208</b>
<b>14.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΟΣ.....</b>	<b>210</b>
<b>14.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>211</b>
<b>14.8.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ .....</b>	<b>211</b>
<b>14.8.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....</b>	<b>212</b>
<b>14.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ.....</b>	<b>213</b>
<b>14.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>219</b>
<b>15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>220</b>
<b>Περίληψη .....</b>	<b>233</b>
<b>Extented summary .....</b>	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
<b>Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής .....</b>	<b>241</b>
<b>Δημοσιεύσεις που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα με την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής σε συναφή πεδίο με το αντικείμενο της διατριβής.....</b>	<b>244</b>
<b>Συντομογραφίες.....</b>	<b>245</b>

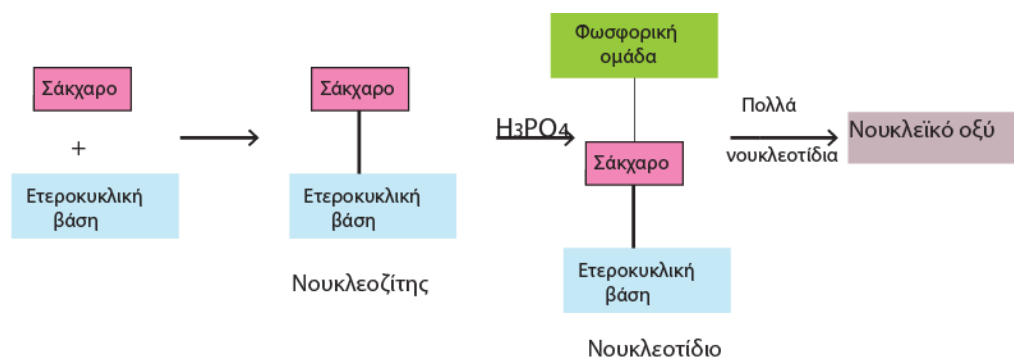


# Ι.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA

### 1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Τα νουκλεϊκά οξέα ,**δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA)** και **ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA)**, είναι τα μόρια –φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Στα μόρια των DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των άλλων πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

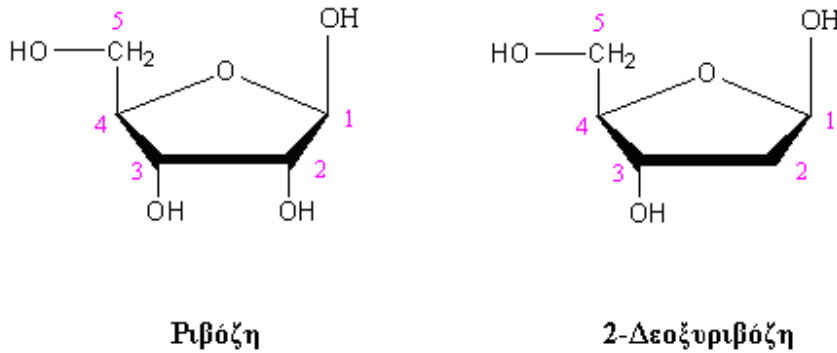


**Σχήμα 1.1.** Γενικευμένη δομή των νουκλεϊκών οξέων.

Όπως οι πρωτεΐνες είναι βιοπολυμερή που αποτελούνται από αμινοξέα, έτσι και τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιοπολυμερή που απαρτίζονται από νουκλεοτίδια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες(Σχήμα 1.1). Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν νουκλεοζίτη συνδεδεμένο με μια φωσφορική ομάδα, ενώ κάθε νουκλεοζίτης αποτελείται από ένα σάκχαρο (αλδοπεντόζη) συνδεδεμένο με μια ετεροκυκλική βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης.

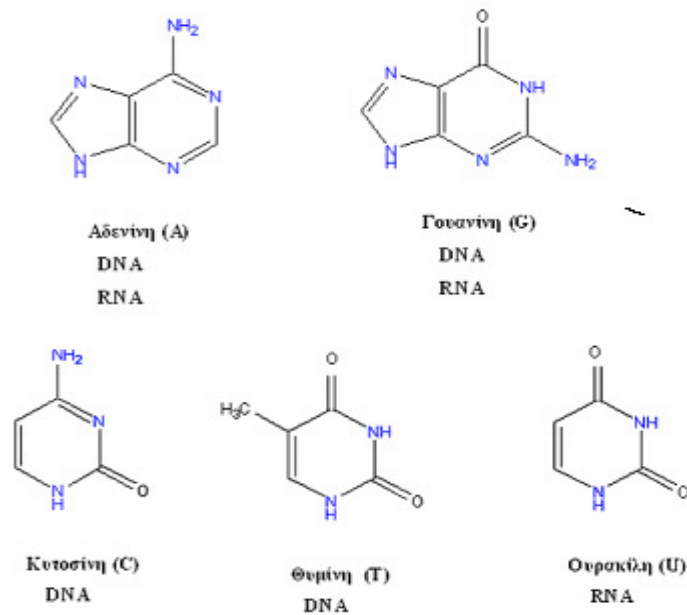
Το σάκχαρο που συμμετέχει στα RNA είναι η ριβόζη, ενώ αυτό που συμμετέχει στα DNA είναι η 2' - δεοξυριβόζη (Σχήμα 1.2). (Το πρόθεμα 2' - δεοξυ υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει άτομο οξυγόνου στη θέση 2' της ριβόζης. Οι αριθμοί που τονίζονται

αναφέρονται σε θέσεις του σακχάρου του νουκλεοτιδίου , ενώ οι αριθμοί χωρίς τονισμό αναφέρονται σε θέσεις του ετεροκυκλικού δακτυλίου της βάσης).



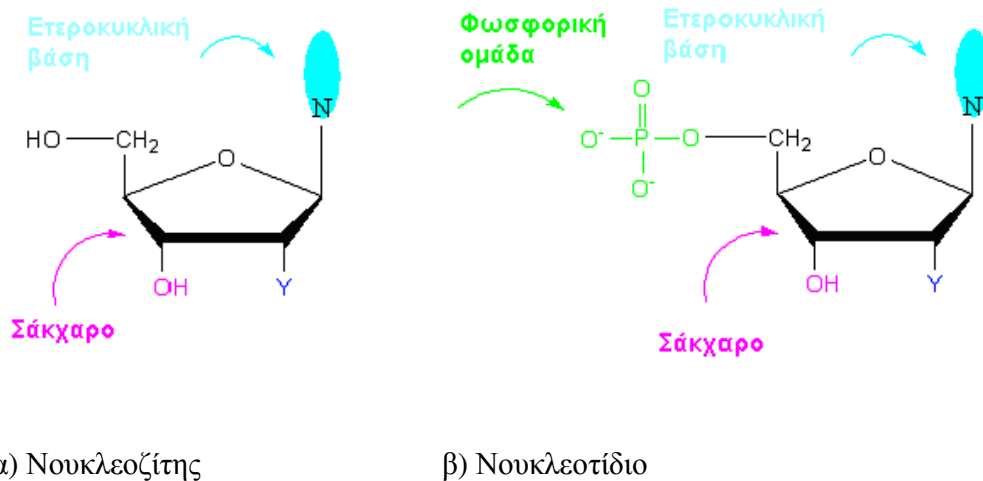
**Σχήμα 1.2.** Δομή των σακχάρων των νουκλεϊκών οξέων.

Στα δεοξυριβονουκλεοτίδια απαντούν τέσσερις διαφορετικές ετεροκυκλικές βάσεις. Οι δύο είναι υποκατεστημένες πουρίνες (**αδενίνη** και **γουανίνη**), ενώ οι άλλες δύο είναι υποκατεστημένες πριμιδίνες (**κυτοσίνη** και **θυμίνη**). Η αδενίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη αποτελούν, επίσης, συστατικά των RNA, όμως η θυμίνη δεν απαντά σε αυτά και αντικαθίσταται από μια άλλη πριμιδινική βάση που λέγεται **ουρακίλη**.

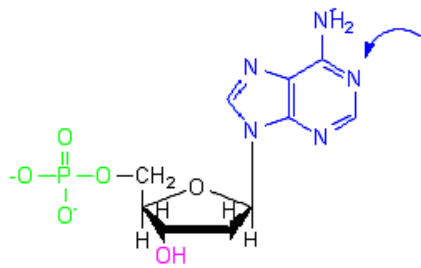


**Σχήμα 1.3.** Οι βάσεις του DNA

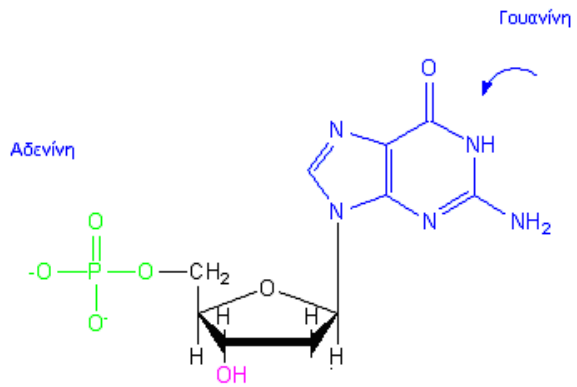
Τόσο στα DNA όσο και στα RNA, οι ετεροκυκλικές αμίνες (οι βάσεις) ενώνονται με τον C 1' του σακχάρου, ενώ η φωσφορική ομάδα ενώνεται μέσω εστερικού δεσμού με τον C5' του σακχάρου. Έτσι, οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν τη γενική δομή που φαίνεται στο Σχήμα 1.4. Οι πλήρεις δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων παρατίθεται στο Σχήμα 1.5.



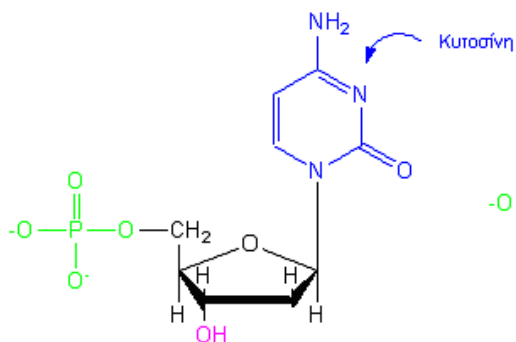
**Σχήμα 1.4.** α) Ένας νουκλεοζίτης και β) ένα νουκλεοτίδιο. Όταν  $Y=H$ , το σάκχαρο είναι η δεοξυριβόζη. Όταν  $Y=OH$ , το σάκχαρο είναι η ριβόζη.



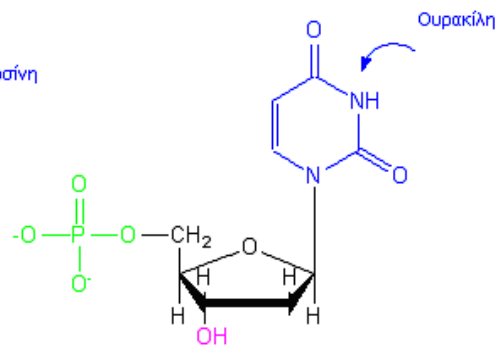
5'-Φωσφορική 2'-δε οξυαδενοσίνη



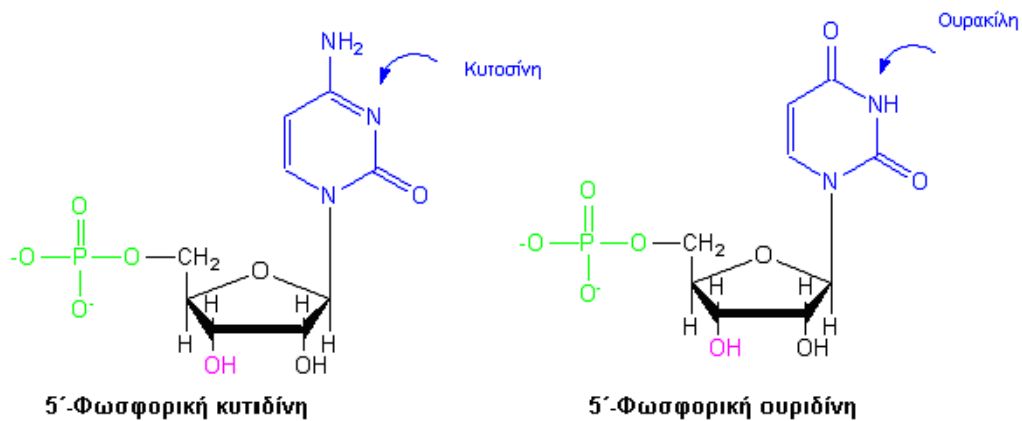
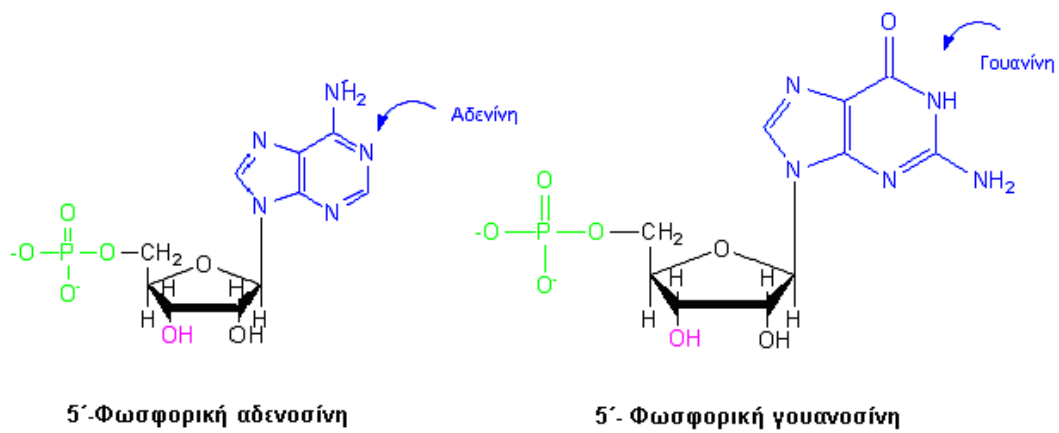
5'-Φωσφορική 2'-δεοξυγουανοσίνη



5'-Φωσφορική 2'-δεοξυκυτιδίνη



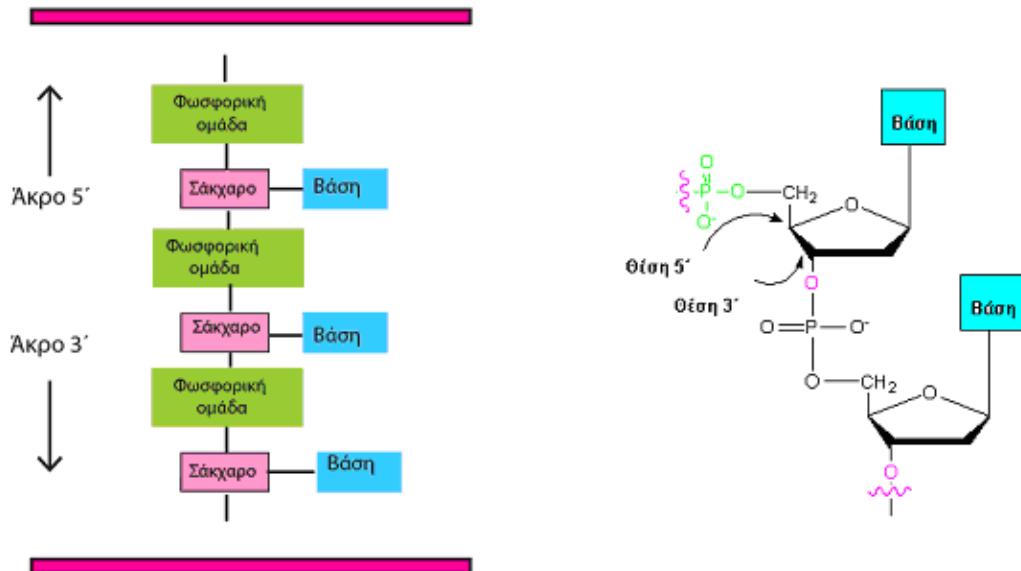
5'-Φωσφορική 2'- δεοξυθυμιδίνη



**Σχήμα1.5.** Ονομασίες και δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων.

Παρόλο που τα DNA και τα RNA είναι παρόμοια από χημική άποψη, έχουν διαφορετικό μέγεθος και διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο. Τα μόρια των DNA είναι τεράστια. Έχουν μοριακά βάρη που μπορεί να φτάσουν τα 150

δισεκατομμύρια , μήκος μέχρι 12 cm και απαντούν κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων. Αντίθετα, τα μόρια των RNA είναι πολύ μικρότερα (το μοριακό βάρος τους δεν υπερβαίνει τις 35.000) και απαντούν κυρίως έξω από τον πυρήνα του κυττάρου.



**Σχήμα 1.6.** Γενικευμένη δομή των DNA

## 1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

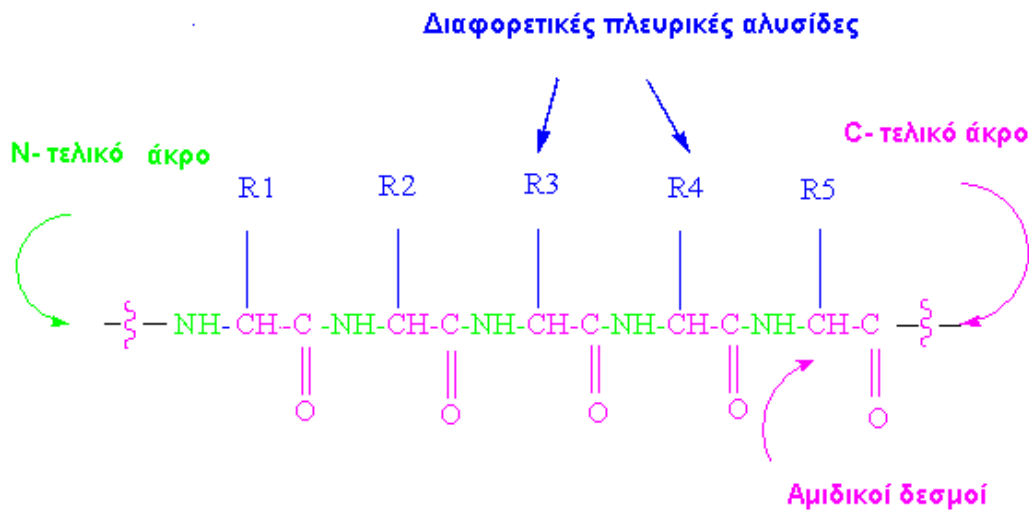
Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους στα DNA , μέσω ενός φωσφορικού δεσμού , ανάμεσα στην 5'-φωσφορική ομάδα του ενός νουκλεοτιδίου και την 3'-υδροξυλομάδα του σακχάρου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Το ένα άκρο του πολυμερούς νουκλεϊκού οξέος έχει μια ελεύθερη υδροξυλομάδα στον C3' (το **άκρο 3'**), ενώ το άλλο άκρο έχει μια ελεύθερη φωσφορική ομάδα στον C5' (το **άκρο 5'**).

Όπως η δομή μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από την ακολουθία με την οποία είναι ενωμένα τα αμινοξέα , έτσι και η δομή των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από την ακολουθία των νουκλεοτιδίων. Κατ' αναλογία, όπως μια πρωτεΐνη αποτελείται από πολυαμιδική αλυσίδα με διάφορες πλευρικές ανθρακικές αλυσίδες συνδεδεμένες σε αυτή , έτσι και

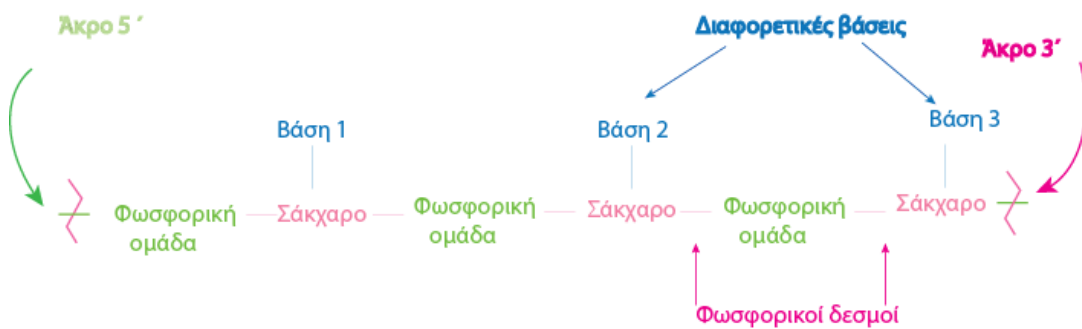


στο σκελετό του νουκλεϊκού οξέος υπάρχει μια εναλλαγή μορίων σακχάρου – φωσφορικής ομάδας με διάφορες βάσεις.

Μία πρωτεΐνη



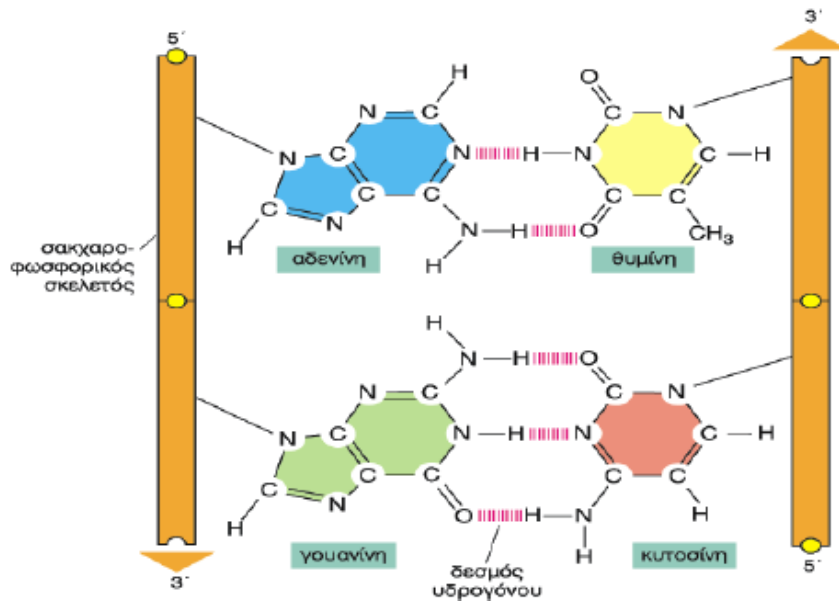
Ένα νουκλεοτίδιο



Ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται μεταξύ τους τα νουκλεοτίδια προσδίδει σ' έναν κλώνο DNA χημική πολικότητα. Η πολικότητα μιας αλυσίδας DNA υποδεικνύεται με τον ορισμό του ενός άκρου ως 3' και του άλλου ως 5'. Ο συμβατικός αυτός ορισμός βασίζεται στις λεπτομέρειες του χημικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδικών υπομονάδων.

Οι δυο πολυνουκλεοτιδιακές αλυσίδες στη διπλή έλικα (double helix) του DNA συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των διαφορετικών κλώνων. Επομένως, όλες οι βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας, ενώ ο σακχαρο-φωσφορικός σκελετός στο εξωτερικό της. Ωστόσο, οι βάσεις δεν ζευγαρώνουν στην τύχη. Η αδενίνη ζευγαρώνει πάντα με τη θυμίνη και η γουανίνη πάντα με την κυτοσίνη (Σχήμα 1.7). Σε κάθε περίπτωση, μια πιο ογκώδης βάση με δυο δακτυλίους (μια βάση πουρίνης) ζευγαρώνει με μια βάση μ'έναν δακτύλιο (μια βάση πυριδίνης). Το «ζευγάρισμα» ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις επιτρέπει στα ζεύγη των βάσεων (base pairs) να παρατάσσονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας στην πιο ευνοϊκή, από ενεργειακή άποψη, διάταξη. Σε αυτή τη διάταξη, κάθε ζεύγος βάσεων έχει παρόμοιο εύρος, ώστε να διατηρεί τον σακχαρο-φωσφορικό σκελετό σε ίση απόσταση κατά μήκος του μορίου του DNA (Σχήμα 1.7), ενώ επιπρόσθετα, οι σακχαρο-φωσφορικοί σκελετοί περιελίσσονται ο ένας γύρω από τον άλλο για να σχηματίσουν μια διπλή έλικα (Σχήμα 1.7), που περιέχει 10 βάσεις ανά στροφή. Αυτή η περιέλιξη, επίσης, συνεισφέρει στην ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA.

Τα μέλη κάθε ζεύγους βάσεων προσαρμόζονται μέσα στη διπλή έλικα μόνο όταν οι δυο κλώνοι της είναι αντιπαράλληλοι (antiparallel), δηλαδή μόνο όταν η πολικότητα του ενός κλώνου έχει αντίθετο προσανατολισμό από την πολικότητα του άλλου (Σχήμα 1.7). Για το λόγο αυτό ο κάθε κλώνος ενός μορίου DNA περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία είναι ακριβώς συμπληρωματική (complementary) προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του άλλου. Αυτό έχει ζωτική σημασία για την αντιγραφή του DNA [2].



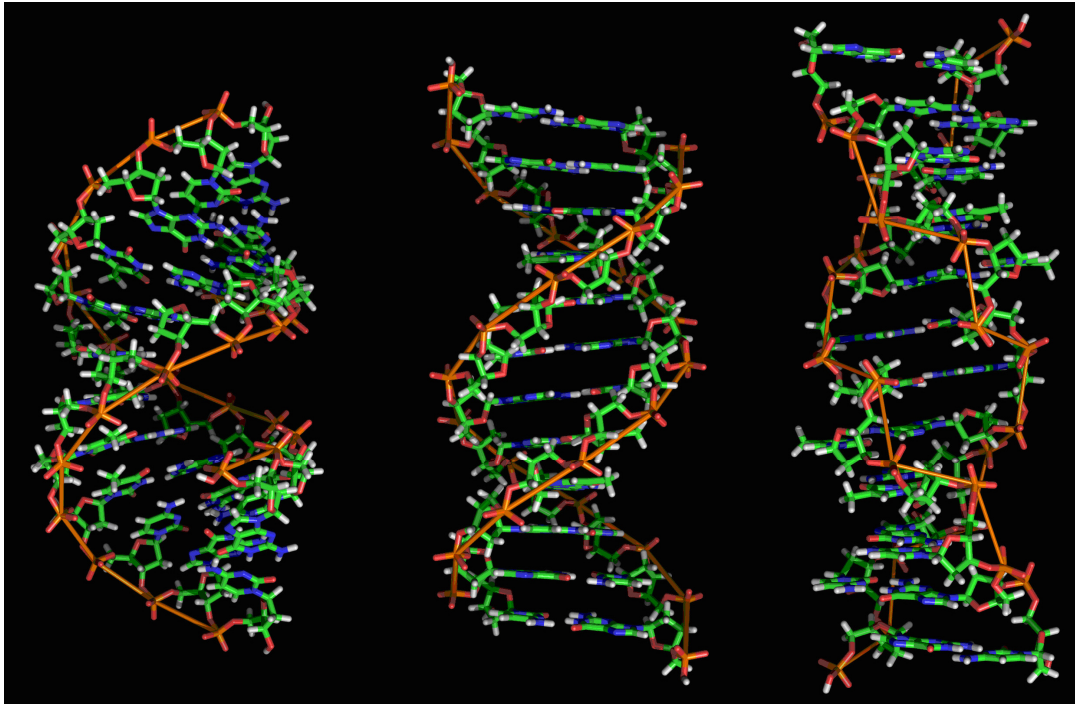
**Σχήμα 1.7.** Τα ζεύγη των συμπληρωματικών βάσεων στη διπλή έλικα του DNA.. Το σχήμα και η χημική δομή των βάσεων επιτρέπουν να σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μόνο μεταξύ των βάσεων A και T και μεταξύ των βάσεων G και C. Σε αυτά τα ζεύγη βάσεων, τα άτομα τα οποία μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου πλησιάζουν χωρίς να διαταράσσεται η διπλή έλικα. Ανάμεσα στις βάσεις A και T σχηματίζονται δυο δεσμοί υδρογόνου, ενώ ανάμεσα στις G και C τρεις. Οι βάσεις ζευγαρώνουν με αυτόν τον τρόπο μόνο όταν οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες.

### 1.2.1 Οι A, B και Z DNA δομές

Η διπλή έλικα του DNA εμφανίζεται με διαφορετικές πιθανές δομές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι δεξιόστροφες A και B καθώς και η αριστερόστροφη Z (Σχήμα 1.8). Η A-δομή προκύπτει με αφυδάτωση της B-δομής και σε κάθε στροφή της έλικάς της υπάρχουν 11 βάσεις ενώ στη B-δομή 10. Τα επίπεδα των βάσεων στην A-δομή έχουν μια κλίση ως προς τον άξονα της έλικας, ενώ στη B-δομή οι βάσεις είναι κάθετες ως προς τον άξονα. Η B-δομή είναι η μόνη δεξιόστροφη δομή που απαντιέται σε ζωντανούς οργανισμούς.

Η μόνη αριστερόστροφη, η Z-δομή, δημιουργείται σε περιοχές του DNA που αποτελούνται από εναλλασσόμενες βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης. Η μορφή αυτή είναι ενδιαφέρουσα γιατί έχει αντιγονικές ιδιότητες, δηλ. προκαλεί τη δημιουργία

αντισωμάτων. Χρησιμοποιώντας τέτοια αντισώματα βρέθηκε η Z-δομή σε φυσικό DNA [3].



**Σχήμα 1.8.** Σχηματική αναπαράσταση των δομών του δίκλωνου DNA. A, B, και Z δομή από αριστερά προς δεξιά.

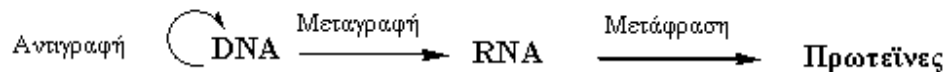
### 1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα μόρια των DNA αποτελούν το χώρο αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας ενός οργανισμού, οι οποίες αποθηκεύονται στην αλυσίδα των DNA ως συγκεκριμένη ακολουθία δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Αυτό που ο Crick ονόμασε «κεντρικό δόγμα της μοριακής γενετικής» λέει ότι η λειτουργία των DNA σχετίζεται με την αποθήκευση μιας γενετικής πληροφορίας και τη μεταφορά της στα RNA την κατάλληλη στιγμή. Η λειτουργία των RNA σχετίζεται με την ανάγνωση, την αποκωδικοποίηση και τη χρήση της πληροφορίας που έχει ληφθεί από τα DNA, με σκοπό τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Αποκωδικοποιώντας το σωστό τμήμα των DNA την κατάλληλη στιγμή και στο σωστό μέρος, ένας οργανισμός μπορεί

να χρησιμοποιήσει γενετικές πληροφορίες για να συνθέσει τις πολλές χιλιάδες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση των βιοχημικών του διεργασιών [1].

Ουσιαστικά λοιπόν η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται από το DNA στο RNA και τέλος στις πρωτεΐνες.



Αρχικά συντίθενται υβρίδια DNA-RNA, δηλαδή μόρια που ο ένας κλώνος είναι DNA και ο συμπληρωματικός του είναι RNA. Τα περισσότερα γονίδια (αλληλουχία νουκλεοτιδίων, η οποία περιέχει το γενετικό μήνυμα) των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ασυνεχή, αποτελούνται δηλαδή από εξόνια, τα οποία είναι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που η κάθε μια κωδικοποιεί μέρος του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος, αλλά και από ιντρόνια, τα οποία είναι ενδιάμεσες αλληλουχίες που δεν περιέχουν πληροφορίες. Η πολυμεράση του RNA μεταγράφει το σύνολο του γονιδίου, τόσο τα εξόνια, όσο και τα ιντρόνια σε ένα μόριο RNA, το οποίο αποτελεί τον πρόδρομο αγγελιοφόρο RNA (διεθνώς mRNA). Στη συνέχεια οι περιοχές που προέρχονται από μεταγραφή των ιντρονίων απομακρύνονται ενζυμικά, ενώ οι περιοχές που προέρχονται από μεταγραφή των εξονίων ενώνονται μεταξύ τους και έτσι προκύπτει το mRNA, το οποίο θα μεταφέρει την πληροφορία από το DNA στις πρωτεΐνες [3].

#### 1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ

Τα διαλύματα του DNA [3] παρουσιάζουν μεγάλο ιξώδες. Καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, ουσιαστικά των δεσμών υδρογόνου, έχει ως αποτέλεσμα δραματική ελάττωση του ιξώδους.

Η δευτεροταγής φωσφορική ομάδα του DNA είναι ιοντισμένη πάνω από pH 4,0. Διάφορες ομάδες των αζωτούχων βάσεων επίσης ιοντίζονται σε διάφορα pH. Οι ενολικές υδροξυλομάδες ιοντίζονται σε pH 12,0, ενώ σε pH 2,0-3,0 οι αμινομάδες πρωτονιώνονται. Επειδή η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ βάσεων εξαρτάται από την ιοντική τους μορφή, οι δεσμοί υδρογόνου καταστρέφονται σε ακραίες τιμές pH (κάτω από 4,0 και πάνω από 11,0) και η διπλή έλικα μετατρέπεται σε δύο

μονόκλινα μόρια. Η μετουσίωση αυτή της διπλής έλικας μπορεί να γίνει και με άλλους τρόπους εκτός από μεταβολές του pH. Έτσι αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή δεσμών υδρογόνου, και τη μετουσίωση του DNA. Μάλιστα επειδή το ζεύγος G-C έχει τρεις δεσμούς υδρογόνου, ενώ το ζεύγος A-T δύο, τα μόρια DNA με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε G-C μετουσιώνονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Το δίκλινο μόριο του DNA, όταν είναι σε υδατικό διάλυμα, μπορεί να μετουσιωθεί, να μετατραπεί δηλαδή σε μονόκλινο, είτε σε ακραίες τιμές pH, κάτω από 4,0 και πάνω από 11,0, είτε με θέρμανση. Η μετουσίωση του DNA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορροφητικότητας του διαλύματος στο υπεριώδες (υπερχρωμία) και ελάττωση του ιξώδους των διαλυμάτων.

Διαλύματα DNA παρουσιάζουν μεγάλο ιξώδες, επειδή η διπλή ελικοειδής δομή είναι δύσκαμπτη και τα μόρια είναι ραβδοειδή. Καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, δηλαδή των δεσμών υδρογόνου, έχει ως αποτέλεσμα δραματική μείωση του ιξώδους.

### **1.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA**

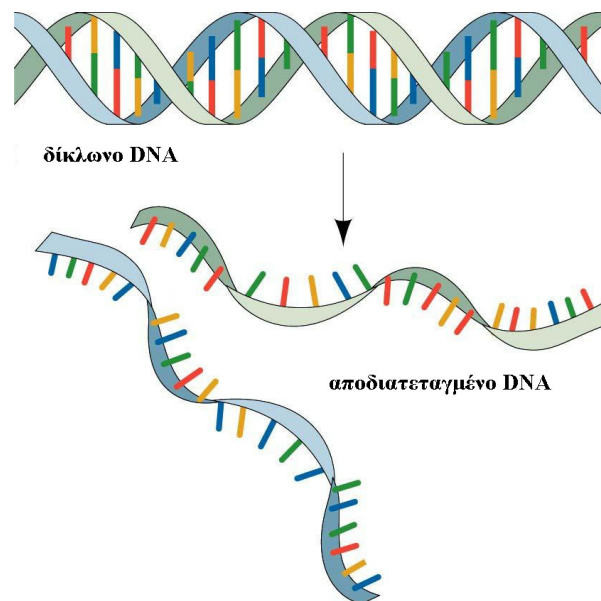
Τα νουκλεϊκά οξέα δίνουν ένα πολύ χαρακτηριστικό φάσμα στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας με μέγιστο στα 260 nm και ελάχιστο στα 230 nm. Το 1950 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το φαινόμενο της «υπερχρωμίας», δηλαδή αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm μετά από θέρμανση. Με θέρμανση οι δεσμοί υδρογόνου, καταστρέφονται, οι βάσεις απομακρύνονται μεταξύ τους και η απορρόφηση στα 260 nm πλησιάζει εκείνη των ελεύθερων νουκλεοτιδίων [4].

### **1.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ**

Αποδιάταξη του DNA ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο διαχωρίζονται οι κλώνοι της έλικας με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μονόκλωνων κομματιών. Για την επίτευξη της αποδιάταξης του DNA απαιτείται το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των βάσεων στη δίκλινη έλικα. Από θερμοδυναμική προσέγγιση, την πιο σημαντική συνεισφορά στη σταθερότητα της δίκλινης έλικας δίνει η επιστοίβαξη των βάσεων μεταξύ τους. Οπότε, πρέπει να ξεπεραστεί το εμπόδιο του

αυστηρού πακεταρίσματος που καθορίζεται από υδρόφοβες δυνάμεις (stacking energy), ώστε να γίνει καταστροφή της δευτεροταγούς δομής του DNA.

Η αποδιάταξη του DNA, δηλαδή το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και επομένως η καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες, όπως το χαμηλό pH και η χαμηλή συγκέντρωση αλάτων, αλλά κυρίως από την αύξηση της θερμοκρασίας [4].



**Σχήμα 1.9.** Δίκλωνο και αποδιατεταγμένο DNA.

## 1.7 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η επιγενετική έχει οριστεί ως η κληρονομικότητα των αλλαγών στη γονιδιακή λειτουργία χωρίς την ύπαρξη αλλαγής στην αλληλουχία του DNA. Η πιο σημαντική και περισσότερο μελετημένη επιγενετική τροποποίηση που μπορεί να υποστεί το μόριο του DNA είναι η μεθυλίωση.

Η μεθυλίωση του DNA παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1948 σε DNA θύμου αδένος βοειδούς. Λαμβάνει χώρα στη N6 θέση της αδενίνης και στις N4 και C5 θέσεις της κυτοσίνης. Επίσης, παρατηρείται μεθυλίωση στη N7 θέση της γουανίνης, η οποία όμως προκαλείται από έκθεση σε μεθυλιωτικές χημικές ουσίες και αποτελεί μοριακό δείκτη

για έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες. Το μεγάλο μειονέκτημα της παρουσίας μεθυλιωμένων κυτοσινών είναι ότι μπορούν εύκολα να απαμινωθούν και να δώσουν θυμίνη (T), σε αντιδιαστολή με την κυτοσίνη που, όταν υφίσταται την ίδια απαμίνωση, δίνει ουρακίλη, μια βάση που είναι μέρος της φυσιολογικής δομής του DNA και διαφεύγει από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς [5].

Από αυτές τις μεθυλίωσεις, στα ανώτερα θηλαστικά, λαμβάνει χώρα μόνον η τελευταία.

Στο DNA των θηλαστικών το 5% περίπου της κυτοσίνης είναι μεθυλιωμένο στην 5 θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου (Σχήμα 1.10). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η μεθυλίωση της κυτοσίνης πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ενζύμου και παρατηρείται μόνο σε κυτοσίνες που προηγούνται της βάσης της γουανίνης, δηλαδή στις θέσεις CpG. Στο γονιδίωμα, οι θέσεις αυτές εντοπίζονται σε πολύ χαμηλότερες συχνότητες σε σχέση με τις αναμενόμενες με βάση τη σύνθεση των βάσεων. Οι θέσεις, στις οποίες οι αλληλουχίες CpG εμφανίζουν μεγάλη συχνότητα βρίσκονται συνήθως σε περιοχές που προηγούνται των γονιδίων (προαγωγείς), οι οποίες καλούνται νησίδες CpG. Οι περισσότερες αλληλουχίες CpG δεν είναι μεθυλιωμένες, αλλά υπάρχουν κάποιες σημαντικές εξαιρέσεις.

Η μεθυλίωση του DNA επιτελείται από ειδικά ένζυμα. Το πρότυπο μεθυλίωσης είναι κληρονομήσιμο και οι μεταβολές του, που συνοδεύονται από μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου και πραγματοποιούνται χωρίς αλλαγές στη σειρά των βάσεων του DNA, είναι γνωστές ως επιγενετικές μεταλλάξεις [6].

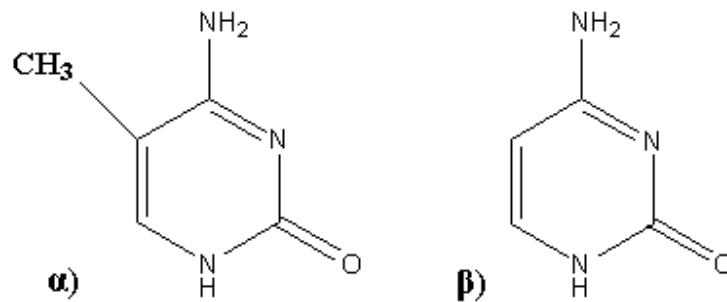
## **1.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ**

Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα, οδήγησαν αρχικά στην υπόθεση ότι οι μεταβολές της μεθυλίωσης στον καρκίνο αφορούσαν μόνο γενικευμένη απομεθυλίωση του γονιδιώματος, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μαζική υπερέκφραση ογκογονιδίων.

Η δεύτερη μεταβολή της μεθυλίωσης του DNA που παρατηρείται στον καρκίνο είναι η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων σε περιοχές προαγωγέων γονιδίων, σχετίζεται δε με καταστολή της μεταγραφής και αποτελεί, μαζί με τις μεταλλάξεις μηχανισμό για αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.



Η μεθυλίωση του DNA εκτός από τον καρκίνο έχει βρεθεί ότι παίζει καταλυτικό ρόλο και σε άλλες ασθένειες, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, νοσήματα που οφείλονται στην έκφραση ορισμένων γονιδίων, που εξαρτάται από τον γονέα από τον οποίο προέρχονται (imprinting diseases) καθώς και καρδιαγγειακά νοσήματα [7].



**Σχήμα 1.10.** Συντακτικοί τύποι α) 5-μεθυλο-κυτοσίνης και β) κυτοσίνης.

## 1.9 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην ανάλυση του DNA είναι :

❖ **Χρωματογραφία.** Σχεδόν όλες οι κλασικές μέθοδοι χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για απομόνωση και καθαρισμό των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων.

❖ **Ηλεκτροφόρηση.** Ο διαχωρισμός των κλασμάτων του DNA με διαφορετικά μεγέθη μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των διαφορετικών κλασμάτων του DNA μέσα στην πηκτή, μπορεί να γίνει: 1) με χρώση με ουσία που φθορίζει στο υπεριώδες φως, 2) με υβριδοποίηση με ανιχνευτή σηματομένο με ραδιοϊσότοπο (συνήθως P32) και αυτοραδιογραφία (Southern blot).

❖ **Κόψιμο του DNA** σε ειδικές θέσεις με νουκλεάσες περιορισμού για την απομόνωση και το χειρισμό των γονιδίων.

❖ **Κλωνοποίηση** του DNA με κατάλληλους φορείς (cloning vectors) ή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), έτσι ώστε ένα μόριο DNA να μπορεί να αντιγραφεί εκατομμύρια φορές.

❖ **Υβριδισμός** νουκλεϊνικών οξέων, για την εύρεση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA σε έναν οργανισμό, στο ζευγάρι αυτής με μια άλλη, που έχει συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων.

❖ **Καθορισμός της αλληλουχίας** των νουκλεοτιδίων των τμημάτων του DNA (sequencing) για την αναγνώριση των γονιδίων.

❖ **Καταγραφή** της έκφρασης κάθε γονιδίου σε έναν κυτταρικό πληθυσμό με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών (microarrays).

## 1.10 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟ DNA

Όπως προαναφέρθηκε, η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες, όσο και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ασθενειών, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση [7].

Η συνολική περιεκτικότητα της μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα προκύπτει συνήθως υπολογίζοντας την αναλογία ανάμεσα στην 5-μεθυλο-κυτοσίνη και την κυτοσίνη. Οι τυπικές διαδικασίες που ακολουθούνται σήμερα περιλαμβάνουν ενζυματική υδρόλυση του DNA, ακολουθούμενη από υψηλής ανάλυσης διαχωρισμό για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε βάσεις. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές είναι οι διαχωριστικές τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές τεχνικές που βασίζονται στη χρήση βακτηριακής DNA μεθυλοτρανσφεράσης ή σε αντισώματα ειδικά για τη 5-μεθυλο-κυτοσίνη.

Σε αντίθεση με την ανάλυση της μεθυλίωσης σε ολόκληρο το DNA, η οποία μπορεί να γίνει απευθείας στο μόριο αυτό, οι διαδικασίες για την ανάλυση της μεθυλίωσης σε συγκεκριμένο γονίδιο απαιτούν αρχικά τον πολλαπλασιασμό της προς μελέτη αλληλουχίας. Οι DNA πολυμεράσες, όμως, δε διακρίνουν την κυτοσίνη από τη 5-

μεθυλο-κυτοσίνη, οπότε όλες οι πληροφορίες της 5-μεθυλο-κυτοσίνης εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ένζυμα και χημικές ενώσεις για ομοιοπολική τροποποίηση της βάσης, ώστε να γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στην κυτοσίνη και τη 5-μεθυλο-κυτοσίνη. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ενδονουκλεάσες περιορισμού εκλεκτικές στη μεθυλίωση και οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι το όξινο θειώδες ανιόν, η υδραζίνη και το υπερμαγγανικό ανιόν [8-11].

Όλες οι μέχρι σήμερα γνωστές μέθοδοι διερεύνησης της μεθυλίωσης είναι ως επί το πλείστον αρκετά περίπλοκες, χρονοβόρες και απαιτούν πολύπλοκους χειρισμούς του DNA [12], αυξάνοντας έτσι το κόστος και την πιθανότητα πειραματικών σφαλμάτων [13]. Έτσι, η ανάπτυξη εναλλακτικών τεχνικών είναι σημαντική και κύρια προτεραιότητα στη σημερινή εποχή.

## **2. ΑΝΑΓΩΓΗ, ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ**

### **2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Τα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων (NAs) (οι βάσεις, τα νουκλεοτίδια και οι νουκλεοζίτες) είναι ηλεκτροενεργά. Τα ηλεκτρόδια υδραργύρου είναι κατάλληλα για μελέτες που αφορούν στην αναγωγή των νουκλεϊκών οξέων (NAs), ενώ τα στερεά ηλεκτρόδια και ειδικά αυτά του άνθρακα χρησιμοποιούνται για διεργασίες οξειδωσης.

#### **2.1.1 Αναγωγή**

Πολαρογραφική αναγωγή των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) παρατηρήθηκε σε σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME), γύρω στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, με την αδενίνη (A) να είναι η πρώτη βάση που εμφανίστηκε ως ηλεκτροενεργή [13]. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι η αδενίνη (A) και η κυτοσίνη (C), μαζί με τα νουκλεοσίδια και τα νουκλεοτίδιά τους, ανάγονται σε υδατικά μέσα σε όξινο pH, με τα δυναμικά μισού-κύματος ( $E_{1/2}$ ) να είναι -1,33 V για την αδενίνη (A) και -1,44 V για την κυτοσίνη (C) (vs SCE) σε pH 4,2 [14-18]. Τα δυναμικά αναγωγής για τα νουκλεοτίδια της κυτιδίνης και της κυτοσίνης εμφανίζονται πιο θετικά από εκείνα της ελεύθερης βάσης. Το δυναμικό ημίσεως-κύματος ( $E_{1/2}$ ) της κυτοσίνης (C) και των παραγώγων της μετατοπίζονται προς αρνητικότερες τιμές με την αύξηση του pH, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο της πρωτονίωσης [19]. Η αναγωγή της αδενίνης (A) πραγματοποιείται σε πιο θετικό δυναμικό από την αναγωγή της κυτοσίνης (C) και παρατηρείται μεταφορά 4e (σε σύγκριση με τη μεταφορά 3e, που παρατηρείται στην περίπτωση της κυτοσίνης (C)). Επιπλέον, η πολαρογραφική συμπεριφορά της αδενίνης (A) δε διαφέρει σημαντικά, είτε βρίσκεται ελεύθερη, είτε ενσωματωμένη σε νουκλεοσίδια ή νουκλεοτίδια. Η γουανίνη (G) ανάγεται, επίσης, σχηματίζοντας ένα ασταθές προϊόν. Οξείδωση του προϊόντος αναγωγής της γουανίνης (G) παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας π.χ., κυκλική ή ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία, η τελευταία αποτελείται από εφαρμογή αρνητικού

δυναμικού (περίπου  $-1,8$  V σε ουδέτερο μέσο, συνήθως μικρής διάρκειας), ακολουθούμενη από ανοδική σάρωση του δυναμικού [20].

Αναγωγή της ουρακίλης (U) και της θυμίνης (T) δεν παρατηρήθηκε σε υδατικά διαλύματα, τουλάχιστον εντός του παράθυρου δυναμικού των ηλεκτροδίων υδραργύρου. Για την αποκάλυψη των σημάτων αναγωγής της ουρακίλης (U) και της θυμίνης (T), που συνήθως περιπλέκεται από την αναγωγή των πρωτονίων (από τα μόρια του νερού), χρησιμοποιήθηκαν μη υδατικοί διαλύτες με ευρύτερα παράθυρα δυναμικού. Χρησιμοποιώντας λοιπόν διμεθυλοσουλφοξείδιο ή ακετονιτρίλιο, η ουρακίλη (U) και η θυμίνη (T) υποβλήθηκαν σε πολύπλοκες διαδικασίες αναγωγής, σε πολύ αρνητικά δυναμικά, στις οποίες συμμετέχουν πολλές ρίζες [21,22]. Πρόσφατα για τη μελέτη της αναγωγής της γουανίνης (G), χρησιμοποιήθηκαν ιοντικά υγρά σε συνδυασμό με ηλεκτρόδια λευκοχρύσου. Η αναγωγή έλαβε χώρα σε δυναμικό  $-2,2$  V (vs Ag/AgCl) [23].

### 2.1.2 Οξείδωση

Τα ηλεκτρόδια άνθρακα είναι κατά πάσα πιθανότητα τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ηλεκτρόδια σε μελέτες οξείδωσης των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs), των νουκλεοτιδίων ή νουκλεοσιδίων τους. Οι βάσεις των πουρινών απαιτούν χαμηλότερο υπερδυναμικό για την οξείδωσή τους από αυτές των πυριμιδινών, με τη γουανίνη (G) να οξειδώνεται πιο εύκολα. Και οι δύο βάσεις, η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) παράγουν κορυφές οξείδωσης σε ένα ευρύ φάσμα pH (από 0 έως 12,5) [24,25]. Έχει αποδειχτεί ότι η αδενίνη (A) οξειδώνεται με μια διαδικασία που περιλαμβάνει έξι ηλεκτρόνια ανά μόριο αδενίνης (A) με τον ενδιάμεσο σχηματισμό δικαρβονικών ιόντων. Το ενδιάμεσο αυτό προϊόν είναι ασταθές και υφίσταται μια σειρά από περαιτέρω αντιδράσεις [24]. Η γουανίνη (G) οξειδώνεται ηλεκτροχημικά με μια διαδικασία που περιλαμβάνει τέσσερα ηλεκτρόνια, με τον ενδιάμεσο σχηματισμό ενός ασταθούς προϊόντος, το οποίο υφίσταται περαιτέρω αντιδράσεις και τελικά μετατρέπεται είτε σε παραβανικό οξύ, είτε σε οξαλική γουανίνη [24]. Αν και οι βάσεις των πουρινών αποτέλεσαν το επίκεντρο των περισσότερων μελετών, η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) έχουν, επίσης, αποδειχθεί ότι οξειδώνονται παράγοντας ηλεκτροχημικά σήματα [26-30]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται

ο ταυτόχρονος προσδιορισμός και των τεσσάρων μονοφωσφορικών DNA νουκλεοζιτών χρησιμοποιώντας βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE), με το όριο ανίχνευσης να είναι μικρότερο από 1  $\mu\text{M}$  για κάθε νουκλεοτίδιο [27]. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν, επίσης, σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE), χρησιμοποιώντας βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV). Τα δυναμικά κορυφής των επιμέρους νουκλεοτιδίων, σε ουδέτερο pH, ήταν +1,00 V για τη μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP), +1,28 V για τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), +1,47 V για τη μονοφωσφορική θυμιδίνη (TMP) και + 1,53 V για τη μονοφωσφορική κυτιδίνη (CMP) (vs Ag/AgCl) [28].

Κορυφές οξειδωσης και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων παρατηρήθηκαν, επίσης, σε ηλεκτρόδια γραφενίου [29] και σε ηλεκτρόδια που κατασκευάστηκαν με υμένια νανοάνθρακα με τη μέθοδο του ηλεκτρονικού συντονισμού κυκλοτρονίου (ECR) [30]. Σε σύγκριση με τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα (GCEs), τόσο τα ηλεκτρόδια γραφενίου, όσο και τα ηλεκτρόδια από υμένια νανοάνθρακα παρουσιάζουν κορυφές οξειδωσης και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων ακόμη και όταν αυτά βρίσκονται σε κάποιο ολιγονουκλεοτίδιο (ODN). Χρησιμοποιώντας μια μη λεία επιφάνεια εποξειδικού γραφίτη παρατηρήθηκαν χαμηλότερα υπερδυναμικά κατά την οξειδωση των βάσεων του DNA (σε σχέση με τις προαναφερθείσες επιφάνειες). Η ελεύθερη γουανίνη (G) οξειδώνεται σε δυναμικό 0,35 V και η ελεύθερη αδενίνη (A) σε δυναμικό 0,63 V (vs Ag / AgCl). Για την κυτοσίνη (C) και την ινοσίνη, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν κορυφές [31]. Τράχυνση της επιφανείας οδήγησε σε πιο ευαίσθητο προσδιορισμό των βάσεων του DNA (κυρίως πουρινών), όπως αποδεικνύεται με τη χρήση ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) με εξαιρετικά μεγάλη επιφανειακή τράχυνση [32] ή ενός ηλεκτροδίου πυρολιτικού γραφίτη μηχανικά αλεσμένου [33].

Παρατηρήθηκε άμεση οξειδωση της γουανοσίνης και αδενοσίνης σε υδατικά μέσα, που οφειλόταν στο ευρύ παράθυρο δυναμικού ηλεκτροδίου από διαμάντι ενισχυμένο με βόριο (BDD [34]. Για να επιτευχθεί αυτό, όμως, απαιτείται ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου με την εφαρμογή εξαιρετικά υψηλών οξειδωτικών δυναμικών. Όταν η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) περιέχονταν σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο (ODN), οι κορυφές οξειδωσής τους ήταν ανεπαρκώς σχηματισμένες, λόγω της προσρόφησης του προϊόντος της οξειδωσης της γουανίνης (G). Πρόσφατα, το ηλεκτρόδιο που

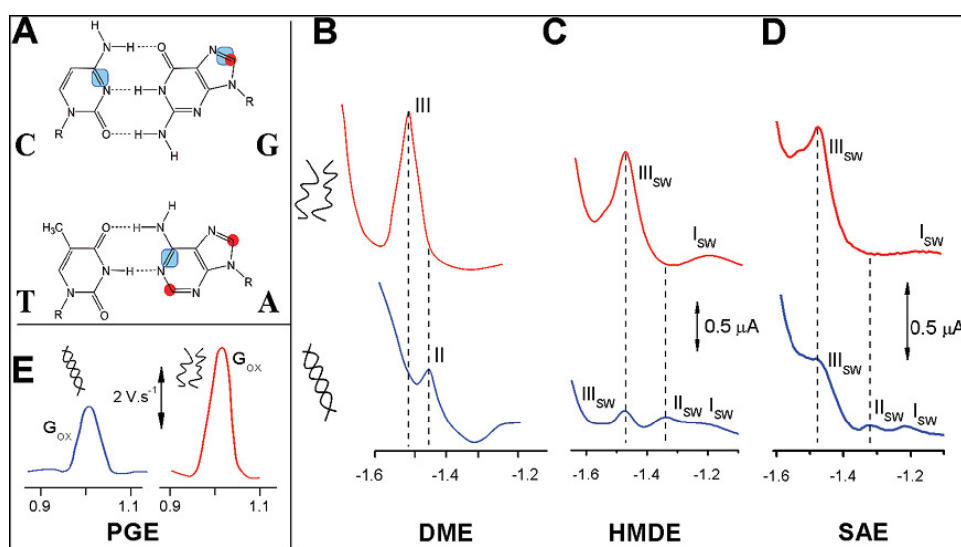
προαναφέρθηκε (BDD) χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία για την ταυτόχρονη ανίχνευση αδενίνης (A), γουανίνης (G), κυτοσίνης (C), θυμίνης (T) και 5-μεθυλοκυτοσίνης (mC) σε ένα ενιαίο μίγμα, χρησιμοποιώντας αμπερομετρικό ανιχνευτή [35]. Ωστόσο, δεδομένου ότι επιλέχθηκε μόνο μια τιμή του δυναμικού στα 1,6 V (vs Ag / AgCl) για την αμπερομετρική ανίχνευση καταγράφηκαν χαμηλά ρεύματα οξειδωσης της κυτοσίνης (C) και τη θυμίνης (T) (σε σύγκριση με αυτά της γουανίνης (G) και της αδενίνης (A)), κοντά στο θόρυβο υποβάθρου. Ανοδικά οξειδωμένο το παραπάνω ηλεκτρόδιο (BDD) χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τη μελέτη της οξειδωσης της γουανίνης (G) και της αδενίνης (A) σε υδρολυμένα με οξύ ολιγονουκλεοτίδια (ODNs), με την παρουσία ιόντων χαλκού [36].

Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν και άλλους τύπους στερεών ηλεκτροδίων εκτός από αυτά του άνθρακα. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι τα νουκλεοτίδια της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) μπορούσαν να ανιχνευθούν κάτω από μικρομοριακές συγκεντρώσεις με ηλεκτρόδια χαλκού, λόγω της παρουσίας του σακχάρου που είναι ηλεκτροενεργό στην επιφάνεια του χαλκού [37]. Πρόσφατα εξετάστηκε η συμπεριφορά της γουανίνης, της γουανοσίνης, και της μονοφωσφορικής γουανοσίνης σε ηλεκτρόδια από οξείδιο του ινδίου και του κασσιτέρου (ΙΤΟ) τροποποιημένα με οξειδοαναγωγικές μεμβράνες διαφόρων πολυμερών [38]. Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση της καταλυτικής οξειδωσης της γουανίνης (G) στα διαφορετικά ηλεκτρόδια εργασίας με δυναμικά οξειδωσης 0,81 V για τη γουανίνη (G) και 1,02 V για τη γουανοσίνη και τη μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) (NHE). Επίσης, έχει δημοσιευτεί ηλεκτροχημική οξειδωση των καταλοίπων της γουανίνης (G) σε πολυκρυσταλλικά ηλεκτρόδια χρυσού [39].

### 2.1.3 Τεχνικές αναδιάλυσης

Για την αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) σε συνδυασμό με την καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (CVS), επιτρέποντας τον προσδιορισμό των συστατικών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) σε συγκεντρώσεις κάτω των  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Η καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (CVS) βασίζεται στο σχηματισμό δυσδιάλυτων ενώσεων

των νουκλεοσιδίων των πουργιών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) στο ηλεκτρόδιο του υδραργύρου σε θετικά δυναμικά και στη συνέχεια στη σάρωση του δυναμικού προς την αρνητική κατεύθυνση, ανάγοντας (ή αναδιαλύοντας), έτσι τις ενώσεις που δημιουργήθηκαν με τον υδράργυρο. Τα νουκλεοσίδια των πυριμιδινών δε σχηματίζουν δυσδιάλυτες ενώσεις με τον υδράργυρο εξαιτίας της παρουσίας του σακχάρου στη θέση N1 [40].



**Σχήμα 2.1..A)** Θέσεις οξείδωσης και αναγωγής των βάσεων. Τα τετράγωνα υποδηλώνουν θέσεις που μπορούν να αναχθούν σε ηλεκτρόδια υδραργύρου και οι κύκλοι δείχνουν τις θέσεις οξείδωσης στα ηλεκτρόδια άνθρακα. **(B-E)** Σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων και ηλεκτροδίων για την ανάλυση φυσικού (*dsDNA*, μπλε) και μετουσιωμένου DNA (*ssDNA*, κόκκινο). **B)** Πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) σε σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME) του *dsDNA* ( $470 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και του *ssDNA* ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Σημειώστε την απουσία της κορυφής III του *dsDNA* και τη μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις του *ds*- και του *ssDNA*. **(C-D)** Βολταμμογράφημα τετραγωνικού παλμού (SWV) του *dsDNA* ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και *ssDNA* ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε **(C)** ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) και σε **(D)** στερεό ηλεκτρόδιο από αμάλγαμα (SAE), χρόνος ακινητοποίησης,  $t_A=60 \text{ s}$ . **(E)** Κορυφή οξείδωσης της γουανίνης ( $G_{ox}$ , έπειτα από διόρθωση της βασικής γραμμής) του *dsDNA* ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και του *ssDNA* ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε ηλεκτρόδιο από πυρολυτικό γραφίτη (PGE,) που μετράται με αναδιαλυτική σταθερή χρονοποτενσιομετρία (CPS) έπειτα από διόρθωση της βασικής γραμμής.



Μια άλλη επιλογή για την ενίσχυση του σήματος των βάσεων του DNA στηρίζεται στον σχηματισμό δυσδιάλυτων συμπλόκων ιόντων χαλκού με την αδερίνη (A) και τη γουανίνη (G) που οδηγεί σε ένα ευαίσθητο προσδιορισμό των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) σε ηλεκτρόδια υδράργυρου [41-45] και άνθρακα [46,47]. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε, επίσης, και στον υβριδισμό του DNA [43,48]. Μετά τον υβριδισμό του μη επισημασμένου στόχου DNA με την ακινητοποιημένη με μαγνητικά σφαιρίδια αλληλουχία -ανιχνευτή, το DNA-στόχος υδρολύθηκε και απελευθερώθηκαν βάσεις πουρινών, οι οποίες ανιχνεύθηκαν είτε βολταμετρικά σε ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE), [43] είτε ποτενσιομετρικά σε ηλεκτρόδιο άνθρακα [48].

## **2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Οι οξειδοαναγωγικές δράσεις των νουκλεϊκών οξέων (NAs) αφορούν κυρίως στην αναγωγή και την οξείδωση των βάσεων. Η αναγωγή των νουκλεϊκών οξέων (NAs) παρατηρήθηκε μόνο σε ηλεκτρόδια υδραργύρου, ενώ η οξείδωση σε διαφορετικές επιφάνειες συμπεριλαμβανομένων του άνθρακα, του λευκόχρυσου, του χρυσού, του αργύρου και άλλες.

### **2.2.1 Αναγωγή**

Παρόμοια με τη συμπεριφορά των ελεύθερων συστατικών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1, τα κατάλοιπα της αδερίνης (A) και της κυτοσίνης (C) ανάγονται σε ηλεκτρόδια υδραργύρου σε μονόκλινα νουκλεϊκά οξέα διαφόρων μηκών (από μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) έως το πολύ μακρύ χρωμοσωμικό DNA. Παρόλο που η ουρακίλη (U) και η θυμίνη (T) βρέθηκαν να είναι ηλεκτροχημικά ανενεργές σε υδατικά μέσα, αναγωγή της ουρακίλης (U) σε αλυσίδες πολυ-ουρακίλης (poly(U)) παρατηρήθηκε σε μη υδατικά διαλύματα [49]. Αναγωγή της θυμίνης (T) στο DNA δεν έχει παρατηρηθεί ακόμη. Η γουανίνη (G) ανάγεται σε πολύ αρνητικά δυναμικά (περίπου -1.8 V σε ουδέτερο pH), αλλά είναι πιο ωφέλιμο να

μελετήσει κανείς την οξειδωση του προϊόντος της αναγωγής της, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, πως τα κατάλοιπα της αδερίνης (A) σε νουκλεϊκά οξέα (NAs) ανάγονται σε ουδέτερο pH (σε σύγκριση με την ελεύθερη αδερίνη (A) που ανάγεται μόνο σε όξινο pH) εάν χρησιμοποιηθεί ο κατάλληλος ηλεκτρολύτης που να περιέχει ιόντα που να εξουδετερώνουν αποτελεσματικά τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων [50]. Με την απουσία κατιόντων, το πολυανιονικό DNA θα απωθηθεί έντονα, σε ουδέτερο pH, από το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί άλατα με μεγάλα κατιόντα, για παράδειγμα μυρμηκικό αμμώνιο ή CsCl [50-52].

### **2.2.2 Οξείδωση**

Η μέτρηση των σημάτων οξειδωσης των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) γίνεται, συνήθως, σε στερεά ηλεκτρόδια. Εκτός από τα ηλεκτρόδια άνθρακα που είναι αναμφίβολα τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα για τη χωρίς επισήμανση (label free) ανίχνευση του DNA σε βιοαισθητήρες, σε μικρότερο βαθμό έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα στερεά ηλεκτρόδια, όπως για παράδειγμα αργύρου, πλατίνας [53,54,23], χαλκού [39], ή χρυσού [40]. Ακόμη, υγρά ηλεκτρόδια υδραργύρου χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της οξειδωσης του προϊόντος αναγωγής της γουανίνης (G). Το σήμα οξειδωσης της γουανίνης (G) σε ηλεκτρόδια άνθρακα χρησιμοποιείται, για παράδειγμα, για την παρακολούθηση της δραστηριότητας της τελομεράσης [55] ή των βλαβών στο DNA, που προκαλούνται από την επίδραση ακτινοβολίας [56,57], χρωμίου [58], υπεροξεινιτρικού [59] και άλλων παταγόντων.

#### **2.2.2.1 Ηλεκτρόδια άνθρακα**

Διάφορα υλικά άνθρακα χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (NAs), συμπεριλαμβανομένων του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG), του γραφίτη από μόλυβι, των λιθογραφικά εκτυπωμένων ηλεκτροδίων του άνθρακα, τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE), των ηλεκτροδίων υαλώδους άνθρακα (GCE), των

ηλεκτροδίων από διαμάντι εμποτισμένα με βόριο (BDD), των αγωγίμων υμενίων από διαμάντι, του γραφενίου, των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) κλπ. Μερικά από τα υλικά αυτά έχουν συγκριθεί σε μια μελέτη που δείχνει ότι τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE), πυρολυτικού γραφίτη, του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG) και τα λιθογραφικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα (SPCE) είναι κατάλληλα για την ανάλυση των ιχνών DNA, ενώ τα ηλεκτρόδια ινών άνθρακα και υαλώδους άνθρακα απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις DNA [60].

Οξείδωση των καταλοίπων της αδενίνης (A) και της γουανίνης (G) στα ηλεκτρόδια άνθρακα παρατηρήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 [61,62] με κατώτερη, όμως, ευαισθησία σε σύγκριση με τα ηλεκτρόδια υδραργύρου. Τα ηλεκτρόδια άνθρακα ανταγωνίστηκαν τα ηλεκτρόδια υδραργύρου στην ευαισθησία μόνο μετά την εφαρμογή αναδιαλυτικής χρονοποτενσιομετρικής ανάλυσης σταθερού ρεύματος (CPS) ή βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού (SWV) με διόρθωση της βασικής γραμμής, οπότε και επιτράπηκε ο προσδιορισμός υπομικρομοριακών συγκεντρώσεων ολιγονουκλεοτιδίων (ODNs) [63,64].

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) έφεραν περαιτέρω εξελίξεις στο ραγδαία εξελισσόμενο τομέα των αισθητήρων του DNA. Η συνεισφορά των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) έγκειται κυρίως στις μοναδικές ηλεκτρικές, θερμικές, χημικές, μηχανικές και χωρικές 3-D ιδιότητές τους [65,66]. Εκτός από μελέτες που ασχολούνται με την ανίχνευση του υβριδισμού DNA χρησιμοποιώντας μονόκλωνες αλληλουχίες επισημασμένες με ένζυμα που συνδέονται με τους νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), αρκετές μελέτες αφιερώθηκαν και στην άμεση οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης (G) του DNA σε ηλεκτρόδια νανοσωλήνων άνθρακα [67-73]. Η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση του σήματος της οξείδωσης της γουανίνης (G), λόγω της μεγάλης επιφάνειας των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs), η οποία προσφέρει αύξηση του αριθμού των μορίων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) που προσροφώνται. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με χρήση των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) αναφέρονται στο Κεφάλαιο 5.

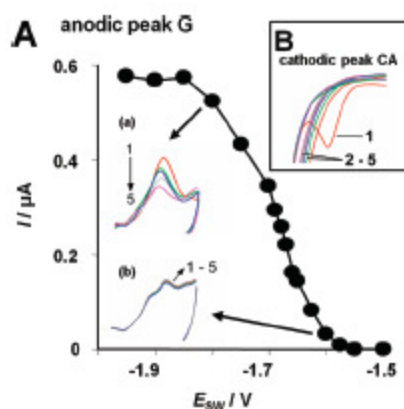
Το γραφένιο είναι ένα άλλο πολλά υποσχόμενο υλικό για την ανάλυση των εγγενών σημάτων οξείδωσης του DNA [29,74-77]. Παρόλο που παραδοσιακά παρασκευάζεται με απολέπιση του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG) [78,79], ο πιο οικονομικός τρόπος για την προετοιμασία γραφενίου θεωρείται η χημική ή

η θερμική αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου. Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα του Zhou και των συνεργατών του χρησιμοποίησαν χημικώς ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) για τον προσδιορισμό των τεσσάρων βάσεων του DNA, σε φυσιολογικό pH, χωρίς την ανάγκη για το στάδιο της προ-υδρόλυσης και ανίχνευσαν τον πολυμορφισμό απλού νουκλεοτιδίου (SNP) σε ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) μικρού μήκους [29]. Αναλογικά με τον προηγούμενο βολταμμετρικό προσδιορισμό των τεσσάρων νουκλεοτιδίων σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) [27], η συγκέντρωση του DNA ήταν ακόμα μάλλον υψηλή ( $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι, εκτός από το ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιταξιακό γραφενίο για την ανάλυση του DNA. Για παράδειγμα, έχουν επιτευχθεί η διαφοροποίηση μεταξύ του dsDNA και του ssDNA, η αλληλεπίδραση του DNA με ουρικό οξύ ή ντοπαμίνη και η διάκριση του πολυμορφισμού απλών νουκλεοτιδίων (SNPs) [74,77].

#### **2.2.2.2 Ηλεκτρόδια υδραργύρου**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σήματα οξειδωσης του DNA μπορούν να ληφθούν, με κυκλική βολταμμετρία και σε ηλεκτρόδια υδραργύρου [60,80]. Όταν το ηλεκτρόδιο υδραργύρου εκτίθεται σε υψηλό αρνητικό δυναμικό (-1,8 V σε υδατικό μέσο και σε ουδέτερο pH), τα κατάλοιπα γουανίνης (G) σε ένα προσροφημένο μόριο νουκλεϊκού οξέος (NA) ανάχθηκαν και το προϊόν της αναγωγής της γουανίνης (G) (7,8-διυδροξγουανίνη) παρέμεινε στο ηλεκτρόδιο και επανοξειδώθηκε σε γουανίνη (G) κατά την ανοδική σάρωση, αποδίδοντας μια κορυφή οξειδωσης (κορυφή γουανίνης (G) ~ -0,3 V). Στις κατάλληλες συνθήκες, η μέθοδος έδειξε να είναι χημικά αναστρέψιμη, γεγονός που υποστηρίζεται από σταθερό ύψος της κορυφής της γουανίνης (G) κατά τη διάρκεια επανειλημμένων σαρώσεων με την κυκλική βολταμμετρία (Σχήμα 2.2) [81].

Εκτός από την κυκλική βολταμμετρία (CV) χρησιμοποιείται και η τεχνική της βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (SWV), που αποτελείται από μια σύντομη εφαρμογή αρνητικού δυναμικού περίπου -1,8 V και ακολουθείται από τη σάρωση σε θετικά δυναμικά [82].



**Σχήμα 2.2.** Κυκλική βολταμετρία του DNA σε ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE). (A) Η εξάρτηση της ανοδικής κορυφής της γουανίνης (G) (περίπου  $-0,3$  V) με το δυναμικό,  $E_{SW}$ . (α) 5 επαναλαμβανόμενες σαρώσεις (1-5) σε  $E_{SW} -1,8$  V, όπου μειώνεται σταδιακά η κορυφή της γουανίνης (G) (β) 5 επαναλαμβανόμενες σαρώσεις σε  $E_{SW} -1,6$  V όπου δε φαίνεται μείωση της κορυφής της γουανίνης (G). (B) 5 επαναλαμβανόμενες σαρώσεις όπου εμφανίζονται οι καθοδικές κορυφές (αναγωγή αδενίνης (A) και κυτοσίνης (C)) σε αρνητικό δυναμικό (περίπου  $-1,5$  V), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναγωγή των καταλοίπων της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) ήταν μη αναστρέψιμη (η κορυφή CA εξαφανίστηκε μετά την πρώτη σάρωση, ως αποτέλεσμα της δέσμευσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου από το προϊόν της αναγωγής του DNA). Σε αντίθεση, η κορυφή της γουανίνης (G) ήταν χημικώς αναστρέψιμη.

### 2.2.3 Αλλαγές στη δομή του DNA

Στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) με την πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) παράγονται δύο κορυφές : κορυφή I ( $\sim -1,2$  V) χωρητικής φύσης και κορυφή III (μεταξύ  $-1,4$  και  $-1,5$  V) που οφείλεται στην αναγωγή της αδενίνης (A)

και της κυτοσίνης (C) (σχηματίζοντας μια μοναδική κορυφή Εικόνα 2.1(B)). Η αναγωγή ήταν μη αντιστρεπτή και πραγματοποιήθηκε σε ένα πρωτονιωμένο στάδιο [51]. Στο δίκλωνο DNA (dsDNA) παράγεται η χωρητική κορυφή I, ακολουθούμενη από μια πολύ μικρότερη κορυφή II (~ 80 mV πιο θετικά από την κορυφή III του ssDNA), αλλά η κορυφή III δεν εμφανίζεται. Η κορυφή II αποδίδεται στις ανοιχτές περιοχές του δίκλωνου DNA (dsDNA), όπως σε μονόκλινα σπασίματα (ssb) ή στα άκρα των μορίων του, όπως τεκμηριώνεται από την απουσία της κορυφής II σε ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (υπερελικωμένο DNA, scDNA) σε θερμοκρασία δωματίου [83]. Ιικό RNA(viral RNA), στην A- μορφή, εμφανίζει αποκρίσεις με πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) παρόμοιες με εκείνες του δίκλωνου DNA (dsDNA) στη B-μορφή [84]. Μετουσιωμένο RNA εμφάνισε υψηλή κορυφή III παρόμοια με εκείνη του μετουσιωμένου DNA (Σχήμα 2.1 (B)).

Οι αναγόμενες περιοχές στην αδενίνη (A) και την κυτοσίνη (C) αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και κρύβονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας του DNA. Η αναγόμενη περιοχή της γουανίνης (G) στα ηλεκτρόδια υδραργύρου, καθώς και οι οξειδούμενες περιοχές στην αδενίνη (A) και στη γουανίνη (G) σε ηλεκτρόδια άνθρακα δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, και βρίσκονται πλησιέστερα προς την επιφάνεια του μορίου. Σε συμφωνία με τις θέσεις των αναγόμενων περιοχών της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου στο μοντέλο των Watson-Crick, τα σήματα αναγωγής του DNA δείχνουν υψηλή ευαισθησία στη δομή του DNA. Τα σήματα αυτά σχετίζονται με τη δευτεροταγή δομή του DNA σε συνδυασμό με τις σχετικές θέσεις των αναγόμενων τμημάτων. Ένας σημαντικός παράγοντας για την αναγωγή της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) είναι η πρωτονίωσή τους, η οποία μπορεί να λάβει χώρα στην περιοχή ουδέτερων pH, αρκεί το άζωτο στη θέση 1 της αδενίνης (A) ή αυτό στη θέση 3 της κυτοσίνης (C) να μπορούν να δεχθούν το πρωτόνιο. Στα ηλεκτρόδια άνθρακα, η διαφορά μεταξύ του ύψους της κορυφής της γουανίνης (G) στο μονόκλωνο (ssDNA) και στο δίκλωνο DNA (dsDNA) ήταν ουσιαστικά μικρότερη σε σύγκριση με τις διαφορές στην κορυφή III (που μετريέται με πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) / βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) στο ηλεκτρόδιο υδραργύρου), σε συμφωνία με τη θέση οξείδωσης της γουανίνης (G) κοντά στην επιφάνεια του μορίου.

Όπως προαναφέρθηκε, οι οξειδούμενες περιοχές στην αδενίνη (A) και (G) δεν αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και γι' αυτό το λόγο οι διαφορές στη βολταμμετρική συμπεριφορά του δίκλωνου και του μονόκλωνου DNA καθορίζονται κυρίως από τις διαφορές στην ευκαμψία των δύο μορφών του DNA. Έτσι, το μονόκλωνο DNA είναι σχετικά ευλύγιστο και κατά την προσρόφηση στην επιφάνεια, του ηλεκτροδίου γραφίτη παίρνει θέση προς την επιφάνεια με αποτέλεσμα περισσότερα κατάλοιπα αδενινών και γουανινών να είναι προσβάσιμα και να δίνουν μεγαλύτερα ρεύματα κορυφής σε σύγκριση με το δίκλωνο DNA, το οποίο έχει πιο άκαμπτη δομή.

#### **2.2.4. Προσροφητικές αναδιαλυτικές τεχνικές**

Για την αύξηση της ευαισθησίας των ηλεκτροχημικών αναλύσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) χρησιμοποιήθηκε η προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική (AdS), αξιοποιώντας την ισχυρή προσρόφηση των νουκλεϊκών οξέων (NAs) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE). Με ανάδευση, τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων (NAs) μεταφέρονται ταχύτερα και ακινητοποιούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, (από ότι στο σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME), με αποτέλεσμα αυξημένα αναγωγικά ή οξειδωτικά σήματα από τα προσροφημένα νουκλεϊκά οξέα (NAs).

Εφαρμογή της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (DPV) ή αναδιαλυτικής βολταμμετρίας γραμμικής σάρωσης (LSV) για τη μέτρηση των σημάτων αναγωγής των καταλοίπων της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) δεν απέδωσε την επιθυμητή αύξηση της ευαισθησίας, διότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι καθοδικές κορυφές συγχωνεύτηκαν με το ρεύμα υποβάθρου [85]. Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας προσροφητική αναδιαλυτική (AdS) κυκλική βολταμμετρία (CV) για τη μέτρηση της ανοδικής κορυφής της γουανίνης (G) σε πιο θετικά δυναμικά (~-0,3 V) ή βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος (ACV) αποδίδοντας μη φαρανταϊκά (τενσαμετρικά) σήματα. Αν και η ευαισθησία βελτιώθηκε κατά 2 τάξεις μεγέθους, ανταγωνιζόμενη την ηλεκτροφόρηση πηκτής για πρώτη φορά, ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν ακόμη σχετικά μεγάλος ( $\geq 1$  mL).

Πρόσφατα, μια καλά αναπτυγμένη καθοδική κορυφή  $SW_{III}$  καταγράφηκε με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (AdSSWV) (Σχήμα 2.1(C)), συγκρίσιμη με την κορυφή III από την πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) (Σχήμα 2.1(B)). Χρησιμοποιώντας την κορυφή  $SW_{III}$  παρατηρήθηκε καλύτερη ευαισθησία από αυτή που λαμβάνεται με την ανοδική κορυφή της γουανίνης (G). Αυτή η κορυφή, αν και ελάχιστα λιγότερο σχηματισμένη από ότι στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE), εμφανίστηκε, επίσης, και σε στερεά ηλεκτρόδια αμαλγάματος (Σχήμα 2.1(D)) [86].

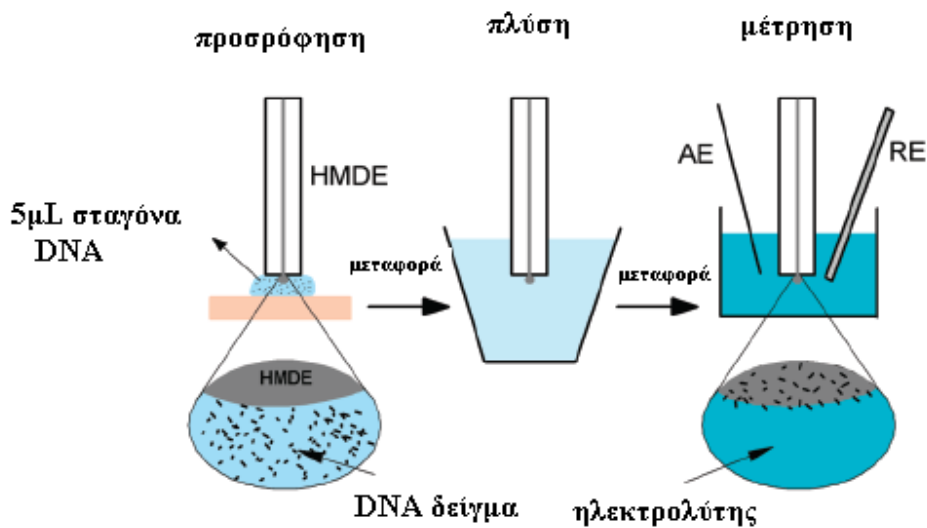
### **2.2.5 DNA-τροποποιημένα ηλεκτρόδια**

Η ποσότητα του DNA σε ένα mL δειγμάτων ήταν μάλλον υψηλή, σε σύγκριση με εκείνη της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης πηκτής που χρησιμοποιείται συνήθως για τις μελέτες των πλασμιδιακών και των ικών DNAs. Για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες, για τη μείωση του όγκου των δειγμάτων DNA, που απαιτούνται για ηλεκτροχημική ανάλυση. Σημαντική μείωση του όγκου επιτεύχθηκε με την προσρόφηση μορίων νουκλεϊκών οξέων (NAs) από μικρές σταγόνες του δείγματος (3-5  $\mu$ L), ακολουθούμενη από τη μεταφορά του NA-τροποποιημένου ηλεκτροδίου σ' έναν ηλεκτρολύτη [85]. Η τεχνική αυτή, η οποία ονομάζεται προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική αλλαγής μέσου (AdTS, *ex situ*, Σχήμα 2.3) κατέστησε δυνατό τον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό των δειγμάτων νουκλεϊκών οξέων (NAs), τα οποία συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές ποσότητες, όπως για παράδειγμα δείγματα πλασμιδιακών και ικών DNAs και των θραυσμάτων τους, συνθετικών ολιονουκλεοτιδίων (ODNs) και άλλων. Η προσροφημένη στιβάδα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) ήταν σχετικά σταθερή, αντιστεκόταν στην πλύση παρέχοντας έτσι τα πρώτα DNA- ή RNA-τροποποιημένα ηλεκτρόδια. Τα σήματα που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή δε διαφέρουν ουσιαστικά από αυτά που λαμβάνονται με τη συμβατική προσροφητική αναδιαλυτική (AdS) τεχνική. Αποδείχθηκε ότι, μετά τη μεταφορά, το dsDNA διατηρούσε τη διαμόρφωσή του και θα μπορούσε να διακριθεί από το ssDNA [85].

Η προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdTSV) προσφέρει, επίσης, και πολλά πρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα (α) πολλές



ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (MB), αλλά όχι το DNA, θα μπορούσαν εύκολα να απομακρυνθούν κατά την πλύση και έτσι να μην παρεμποδίζουν την ανάλυση (β) ο διαχωρισμός του μέσου προσρόφησης από τον ηλεκτρολύτη κατέστησε δυνατή την ξεχωριστή βελτιστοποίηση των συνθηκών για την προσρόφηση και για την ηλεκτροχημική μέτρηση (γ) είναι δυνατό να μελετηθούν αλληλεπιδράσεις του DNA-τροποποιημένου ηλεκτροδίου με άλλα μόρια που υπάρχουν στο διάλυμα, χωρίς να επηρεάζονται από τις αλληλεπιδράσεις του DNA με το εσωτερικό του διαλύματος (bulk)[85]. Η προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική αλλαγής μέσου (AdTS) φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και σε ηλεκτρόδια άνθρακα [87].



**Σχήμα 2.3.** Απλοποιημένο σχήμα της αναδιαλυτικής προσροφητικής τεχνικής αλλαγής μέσου (AdTS, *ex situ*). Το DNA προσροφάται από μικρές σταγόνες στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE). Το DNA-τροποποιημένο ηλεκτρόδιο στη συνέχεια πλένεται, και μεταφέρεται στον ηλεκτρολύτη, όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροχημική μέτρηση.

### 2.2.6 Στερεά ηλεκτρόδια αμαλγάματος (SAEs)

Παρά τα μοναδικά χαρακτηριστικά των υγρών ηλεκτροδίων υδραργύρου, συμπεριλαμβανομένων της λείας επιφάνειας, της εύκολης αναγέννησης της επιφάνειας (και συνεπώς της εξαιρετικής αναπαραγωγιμότητας μιας καθαρής επιφάνειας ηλεκτροδίου) και του μεγάλου καθοδικού υπερδυναμικού, υπάρχει μια τάση να αποφεύγεται η χρήση τους στους αισθητήρες DNA, γεγονός που οφείλεται στη χαμηλή μηχανική σταθερότητα (δυσκολία εφαρμογής σε συστήματα συνεχούς ροής ή σε φορητούς αισθητήρες), καθώς επίσης και λόγω του φόβου της τοξικότητας του υδραργύρου. Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων με μέταλλα ή με απλές ενώσεις έχει δείξει ότι τα στερεά ηλεκτρόδια αμαλγάματος υδραργύρου (SAEs, ή με κάποιο εναλλακτικό μέταλλο (Me-SAEs), όπου το μέταλλο (Me) μπορεί να είναι Ag, Au, Cu, Ir, κλπ.) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία [88-90]. Υπάρχουν διάφοροι τύποι στερεών ηλεκτροδίων αμαλγάματος (SAEs) ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της επιφάνειάς τους. Αυτά περιλαμβάνουν ηλεκτρόδια με λεία επιφάνεια (SAEs, που δεν περιέχουν υγρό υδράργυρο-p-SAE), τροποποιημένα με μηνίσκους (με μηνίσκους υδραργύρου· m-SAE), τροποποιημένα με υμένιο υδραργύρου (MF-SAE), σύνθετα (με στερεά πολυμερή), ή ηλεκτρόδια πάστας αμαλγάματος (όπου το αμάλαμα βρίσκεται σε μορφή σκόνης).

Πολλά από αυτά τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των συστατικών νουκλεϊκών οξέων (NAs), [44,45,91], ολιγονουκλεοτιδίων (ODNs) [92], πλασμιδιακών [44, 93] ή χρωμοσωμικών DNAs [43,44,193,86,94]. Η προσρόφηση του DNA στην επιφάνεια των στερεών ηλεκτροδίων αμαλγάματος (SAEs) είναι αρκετά ισχυρή επιτρέποντας έτσι την ανάλυση μικρών όγκων δειγμάτων με αναδιαλυτικές προσροφητικές τεχνικές αλλαγής μέσου (AdTS). Η ερευνητική ομάδα του Kucharikova έδειξε ότι υπερελικωμένο (sc) DNA-τροποποιημένο στερεό ηλεκτρόδιο αμαλγάματος αργύρου (Ag), αρχικά τροποποιημένου με μηνίσκους υδραργύρου, (m-AgSAE) μπορεί να αντικαταστήσει ικανοποιητικά το ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) στην ανίχνευση των σπασιμάτων των κλώνων του DNA [95], σε μελέτες των βάσεων του DNA και σε αλληλεπιδράσεις τους με διάφορα δραστικά είδη οξυγόνου [96], καθώς και στη μικροανάλυση τροποποιημένων νουκλεϊκών οξέων (NAs) με όσμιο

(Os) [93]. Έχει δημοσιευτεί, επίσης, προσδιορισμός ιχνών των πουρινικών βάσεων εφαρμόζοντας καθοδική βολταμμετρία (CSV) με τη χρήση στερεού ηλεκτροδίου αμαλγάματος αργύρου (Ag) τροποποιημένου με μηνίσκους υδραργύρου (m-AgSAE) [43,44]. Η ερευνητική ομάδα του Fadriá [93] έδειξε, ότι, όπως στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) και στο στερεό ηλεκτρόδιο αμαλγάματος αργύρου (Ag) τροποποιημένο με μηνίσκους υδραργύρου (m-AgSAE), μετρήσεις σε στερεό ηλεκτρόδιο αμαλγάματος αργύρου (Ag) τροποποιημένου με υμένιο υδραργύρου (MF-AgSAE) επέτρεψαν τη διαφοροποίηση μεταξύ sc και linDNA και εφαρμόστηκαν επιτυχώς για την ανίχνευση θραύσεων των κλώνων του DNA, που προκαλούνται από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας.

### 2.3.1 Προσρόφηση σε ηλεκτρόδια υδραργύρου

Γενικά η προσρόφηση των νουκλεϊκών οξέων (NAs) (και άλλων βιοπολυμερών) είναι πιο περίπλοκη από ό,τι εκείνη των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (MB).

Η συμπεριφορά προσρόφησης-εκρόφησης του dsDNA διαφέρει από εκείνη του ssDNA [97] Σε χαμηλότερη ιοντική ισχύ, το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο έλκει ανεπαρκώς τα θωρακισμένα αρνητικά φορτία του φωσφορικού σκελετού. Σε αρνητικά δυναμικά, τα εκτεθειμένα φορτία απωθούνται από το ηλεκτρόδιο, και χαρακτηρίζονται από μια τενσαμετρική κορυφή προσρόφησης/εκρόφησης. Σε υψηλότερη ιοντική ισχύ υπερисχύουν μη ηλεκτροστατικές (υδρόφοβες) δυνάμεις. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, εμφανίζεται μια κορυφή εκρόφησης στο dsDNA σε λιγότερο αρνητικό δυναμικό (κορυφή 2 σε  $\sim -1,2$  V vs SCE) από ότι στο ssDNA (κορυφή  $\sim 3$  σε  $-1,4$  V vs SCE). Η προηγούμενη κορυφή προκύπτει από την προσρόφηση / εκρόφηση τμημάτων του dsDNA που περιέχουν μικρό αριθμό καταλοίπων προσβάσιμων βάσεων, ενώ η κορυφή 3 οφείλεται σε εκρόφηση του ssDNA, που προσροφάται ισχυρότερα στο ηλεκτρόδιο μέσω των υδρόφοβων βάσεων.

Πεπτιδικό νουκλεϊνικό οξύ (PNA), με ουδέτερο σκελετό [98] άντεξε κατά την έκθεσή του σε πολύ αρνητικά δυναμικά (με προϋποθέσεις επαρκείς για να απομακρυνθεί αρνητικά φορτισμένο DNA με την ίδια αλληλουχία), όπως αποδεικνύεται από μετρήσεις εμπέδησης εναλλασσόμενου ρεύματος [99,100]. Μια τέτοια ισχυρή προσρόφηση

αποδόθηκε σε ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του PNA με την επιφάνεια και επίσης σε πλευρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων PNA.

### **2.3.2 Προσρόφηση σε ηλεκτρόδια άνθρακα**

Όπως για πρώτη φορά αποδείχθηκε πριν από τρεις δεκαετίες, τα νουκλεϊκά οξέα (NAs) προσροφώνται σταθερά και μη αναστρέψιμα σε ηλεκτρόδια άνθρακα. Λόγω της υδρόφιλης φύσης της επιφάνειας του άνθρακα (που επιτυγχάνεται π.χ. με οξειδωτική προκατεργασία), τα νουκλεϊκά οξέα (NAs) προσροφώνται μέσω του φωσφορικού σκελετού, αφήνοντας τις βάσεις προσβάσιμες για υβριδισμό. Εάν το ηλεκτρόδιο άνθρακα είναι θετικά φορτισμένο, η ηλεκτροστατική έλξη με τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό καθιστά την προσρόφηση ακόμη ισχυρότερη. Αναλογικά, μετατόπιση προς αρνητικότερα δυναμικά έχει ως αποτέλεσμα την εκρόφιση του DNA, που προκαλείται από ηλεκτροστατική απόθεση. Εκτός από το δυναμικό ακινητοποίησης και άλλες παράμετροι, συμπεριλαμβανομένων της ιοντικής ισχύος ή του τύπου του ηλεκτρολύτη, μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά προσρόφησης του DNA στα ηλεκτρόδια άνθρακα. Αντίθετα, το ουδέτερο PNA έδειξε διαφορετική συμπεριφορά. Η προσρόφηση του PNA στα ηλεκτρόδια άνθρακα χαρακτηρίζεται από αύξηση στο "πακετάρισμα" της επιφάνειας, κυρίως λόγω διαμοριακών επιφανειακών αλληλεπιδράσεων και από μια ασθενέστερη προσρόφηση σε θετικά δυναμικά, σε σύγκριση με DNA [101].

## **2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA**

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 (παράγραφος 1.10) όλες οι μέχρι σήμερα γνωστές μέθοδοι διερεύνησης της μεθυλίωσης είναι στην πλειοψηφία τους αρκετά περίπλοκες, χρονοβόρες και απαιτούν πολύπλοκους χειρισμούς του DNA [12] αυξάνοντας έτσι το κόστος και την πιθανότητα πειραματικών σφαλμάτων [13].

Από την άλλη πλευρά, οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για απλούστερες, ταχύτερες και φθηνότερες αναλύσεις του DNA και συνεπώς και σε επιγενετικές αναλύσεις, (όπως είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης (C) [102]. Η ηλεκτροχημική ανίχνευση των βλαβών του DNA αντανακλά το

γεγονός, ότι η ηλεκτροχημική απόκριση του DNA εξαρτάται ισχυρά από τη δομή του [13].

Πρόσφατα, στο εργαστήριό μας [13] μελετήθηκε η ηλεκτροχημική συμπεριφορά δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν 5-μεθυλο-κυτοσίνη και 7-δεαζα-γουανοσίνη ως ανάλογα νουκλεοτιδίων, καθώς και ενζυμικού Jurkat DNA διαφορετικού βαθμού μεθυλίωσης με βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος (ACV) και βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το σχηματισμό μιας πιο σταθερής, συμπαγούς δομής με την αύξηση της μεθυλίωσης του DNA. Με βάση τη σύζευξη των ηλεκτροχημικών DNA αισθητήρων με DNA (ενισχυμένο με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)) από ανθρώπινο γαστρικό καρκινικό ιστό και ολόκληρα κύτταρα του αίματος υγιών ανθρώπων, η ερευνητική ομάδα του Peng [103] ανέπτυξε μια μέθοδο για την ηλεκτροχημική ανίχνευση του βαθμού μεθυλίωσης του DNA του ανθρώπινου γονιδίου p16Ink4a, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου.

Ακόμη πιο πρόσφατα, ο Kato και οι συνεργάτες του [104] χρησιμοποίησαν ένα υμένιο νανοάνθρακα, το οποίο κατασκεύασαν με την τεχνική του συντονισμού του ηλεκτρονικού κυκλοτρονίου (ECR), με στόχο την ανάπτυξη μιας απλής ηλεκτροχημικής μεθόδου ανάλυσης της μεθυλίωσης του DNA. Με τη μέθοδο αυτή διαπιστώθηκε ανιχνεύσιμη διαφορά μεταξύ των κορυφών οξειδωσης της κυτοσίνης (C) και μεθυλοκυτοσίνης (mC) εφαρμόζοντας βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV).

Τέλος, προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 5 του p53 με αντικατάσταση κατά 60 % της κυτοσίνης (C) από την 5-μεθυλο-κυτοσίνη (5-mC) μελετήθηκαν με την παρουσία SYBR Green I, αιθιδίου βρωμιδίου [105] και προφλαβίνης [106] με τη βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV). Ο Wang και οι συνεργάτες του [107], παρουσίασαν μια αποτελεσματική ηλεκτροχημική μέθοδο για τη διερεύνηση της μεθυλίωσης του DNA, σύμφωνα με την άμεση ηλεκτροκαταλυτική οξείδωση των βάσεων του DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), το οποίο αρχικά τροποποίησαν με ένα υμένιο από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) και στη συνέχεια με χλωριούχο χολίνη (ChCl) (MWNTs / Ch / GCE). Όλες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, γουανίνη (G), αδενίνη (A), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C) και 5-

μεθυλοκυτοσίνη (5-mC) διαχωρίστηκαν και προσδιορίστηκαν και επίσης η κορυφή οξείδωσης της θυμίνης (T), η οποία επικαλύπτει την κορυφή οξείδωσης της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5-mC), εξαλείφθηκε επιτυχώς με μια καινοτόμο στρατηγική, η οποία αναπτύχθηκε σύμφωνα με τις αρχές της σύζευξης της συμπληρωματικότητας των βάσεων.

### 3.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ –ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν διατάξεις στις οποίες η χημική αναγνώριση επιτελείται με τη βοήθεια ενός βιοχημικού μηχανισμού. Πιο συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες είναι αυτοτελείς διατάξεις ικανές να παράγουν ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες αναγνώρισης [108].

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικά τμήματα συνδεδεμένα σε σειρά: Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης και το φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος.



Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση ενός βιοαισθητήρα.

#### Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης

Το τμήμα αυτό μεταφράζει πληροφορίες βιοχημικού χαρακτήρα, συνήθως τη συγκέντρωση του αναλύτη, σε φυσικό ή χημικό σήμα εξόδου, με συγκεκριμένη ευαισθησία. Πρόκειται συνήθως για ένα μακρομόριο, το οποίο μπορεί είτε να αποικοδομεί το υπόστρωμα, ή μπορεί να υφίσταται κάποια δομική αλλαγή ή να αλλάζει τις βιολογικές ή φυσικοχημικές του ιδιότητες κατά τη διαδικασία δέσμευσης. Το μακρομόριο αυτό βρίσκεται ακινητοποιημένο στη διεπιφάνεια του αισθητήρα με το προς

ανάλυση δείγμα. Με βάση τον τρόπο αλληλεπίδρασης του βιομορίου με τον αναλύτη οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες [108] :

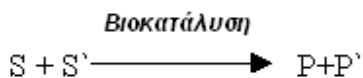
### **i) Βιοαισθητήρες Συγγένειας (χημικής αγκιστείας)**

Η λειτουργία του βιοαισθητήρα βασίζεται στην αλληλεπίδραση του αναλύτη με βιολογικά μακρομόρια. Η αναγνώριση και δέσμευση του αναλύτη οφείλεται στην αντιστρεπτή δέσμευση μεταξύ υποδοχέα-υποστρώματος, που παρουσιάζουν συμπληρωματικές δομές, και την αποκατάσταση ισορροπίας. Στην κατηγορία αυτή ο βιολογικός υποδοχέας μπορεί να αποτελείται από αντισώματα, ολιγονουκλεοτίδια ή λεκτίνες. Βασικό μειονέκτημα των συστημάτων αυτών είναι η ισχυρή σύμπλεξη μεταξύ υποδοχέα-αναλύτη, που δεν επιτρέπει τη γρήγορη αναγέννηση του βιοαισθητήρα.

### **ii) Βιοαισθητήρες Κατάλυσης**

Οι βιοαισθητήρες κατάλυσης βασίζονται στην καταλυτική δράση βιολογικών υποδοχέων-μακρομορίων που βρίσκονται προστατευμένα στο βιολογικό τους περιβάλλον (κύτταρα, μικροοργανισμοί κ.τ.λ.) ή έχουν προηγούμενα απομονωθεί από αυτό, ενώ, επίσης, μπορεί να έχουν υποστεί και γενετική τροποποίηση.

Στους βιοαισθητήρες κατάλυσης, ο αναλύτης αντιδρά παρουσία του βιομορίου προς το προϊόν P.



Η ανίχνευση του αναλύτη / υποστρώματος S μπορεί να βασίζεται :

- Στην κατανάλωση του υποστρώματος S και την συνεπακόλουθη μείωση του σήματος.
- Στην παραγωγή του προϊόντος P και την επακόλουθη αύξηση του σήματος.



## Μεταλλάκτης σήματος

Οι φυσικοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του βιολογικού τμήματος του βιοαισθητήρα και του αναλύτη πρέπει να μετατραπούν σε σήμα, το οποίο ακολούθως θα υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να ληφθεί η αναλυτική πληροφορία. Η επιλογή του μεταλλάκτη σήματος εξαρτάται από το αποτέλεσμα της βιολογικής αναγνώρισης και το είδος των αλλαγών που επιφέρει στο σύστημα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης είναι δυνατό να μεταβάλλονται ταυτόχρονα διαφορετικές παράμετροι δίνοντας έτσι τη δυνατότητα επιλογής και χρήσης διάφορων μεταλλακτών σήματος.

Οι βιοαισθητήρες ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο μεταλλάκτη σήματος κατηγοριοποιούνται σε:

- ✓ Ηλεκτροχημικούς (αμπερομετρικός, ποτενσιομετρικός,αγωγιμομετρικός)
- ✓ Οπτικούς (UV/Vis απορρόφηση,φθορισμομετρία)
- ✓ Θερμικούς
- ✓ Μάζας

### 3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούν την κυριότερη κατηγορία βιοαισθητήρων. Αυτού του είδους οι βιοαισθητήρες παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα που τους καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικούς για χρήση. Έτσι χρησιμοποιούνται σε ποσοστό 66% με πρώτους σε εφαρμογή τους ποτενσιομετρικούς και αμπερομετρικούς, ενώ ακολουθούν οι βιοαισθητήρες με μεταλλάκτη επαγόμενου πεδίου και οι αγωγιμομετρικοί [109]. Καταρχήν, με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας, είναι δυνατή η μαζική παραγωγή τους, ως συμπαγείς, μικρού μεγέθους και χαμηλού κόστους διατάξεις, που παρουσιάζουν μηχανική αντοχή, απλότητα και αξιοπιστία στη χρήση.

Επίσης:

- ✓ Μπορούν να εφαρμοστούν σε πολύπλοκα δείγματα.
- ✓ Καλή ευαισθησία.
- ✓ Είναι συμβατοί με αρκετά βιοχημικά συστήματα.
- ✓ Απλή ενσωμάτωση με τα ηλεκτρονικά συστήματα.
- ✓ Αξιοπιστία και ταχύτητα κατά την in vivo και in vitro βιοανάλυση.
- ✓ Λειτουργικότητα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, δηλ. ιδανικοί για φορητά συστήματα).

Οι κυριότεροι περιορισμοί στη χρήση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι οι εξής :

- ✓ Η ύπαρξη ηλεκτροδραστικών ουσιών στο δείγμα, οι οποίες παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.
- ✓ Παθητικοποίηση της ηλεκτροδιακής επιφάνειας (fouling).

Στη συνέχεια δίνεται μια σύντομη περιγραφή της αρχής λειτουργίας των διαφόρων ηλεκτροχημικών μεταλλακτών σήματος [108,110]:

### **Ποτενσιομετρικοί Βιοαισθητήρες**

Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας. Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται οφείλεται σε επιλεκτική δέσμευση του αναλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και είναι ανάλογη του λογαρίθμου της ενεργότητας του αναλύτη, όπως περιγράφεται στην εξίσωση του Nernst [111].

### **Βιοαισθητήρες Επαγόμενου Πεδίου (Field Effect Transistor, FET)**

Οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου είναι συσκευές που βασίζουν τη λειτουργία τους στην τεχνολογία ημιαγωγών και κύρια στην τεχνολογία των ημιαγωγών οξειδίων των μετάλλων, όπως είναι το  $\text{SiO}_2, \text{Al}_2\text{O}_3$  κ.τ.λ. (MOS, Metal Oxide Semiconductor). Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στην αλληλεπίδραση της επιφάνειας του αισθητήρα με τα ιόντα του διαλύματος, η οποία επηρεάζει μέσω φαινομένων επαγόμενου πεδίου την αντίσταση του ημιαγωγού. Οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου στην επιφάνεια των οποίων έχει προσαρτηθεί μια μεβράνη βιομορίου ονομάζονται συνήθως ENFET (enzyme FET) ή IMFET (immunological FET).

### **Αγωγιμομετρικοί Βιοαισθητήρες**

Η αγωγιμότητα ενός διαλύματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα και η αλγεβρική τιμή της εξαρτάται από το φορτίο των ιόντων, την κινητικότητά τους και τη σταθερά διάστασής τους. Πολλές ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν σε μεταβολή του φορτίου ή της κινητικότητας των ιόντων με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η χρήση αγωγιμομετρικών μεταλλακτών. Προκειμένου η μέτρηση να μην παρεμποδίζεται από την αγωγιμότητα του διαλύματος συνήθως πραγματοποιούνται διαφορετικές μετρήσεις μεταξύ του ενζυμικού ηλεκτροδίου και ενός πανομοιότυπου ηλεκτροδίου χωρίς ένζυμο.

Η θεωρία που διέπει τη λειτουργία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων εξετάζεται πιο αναλυτικά στην παράγραφο 3.3.

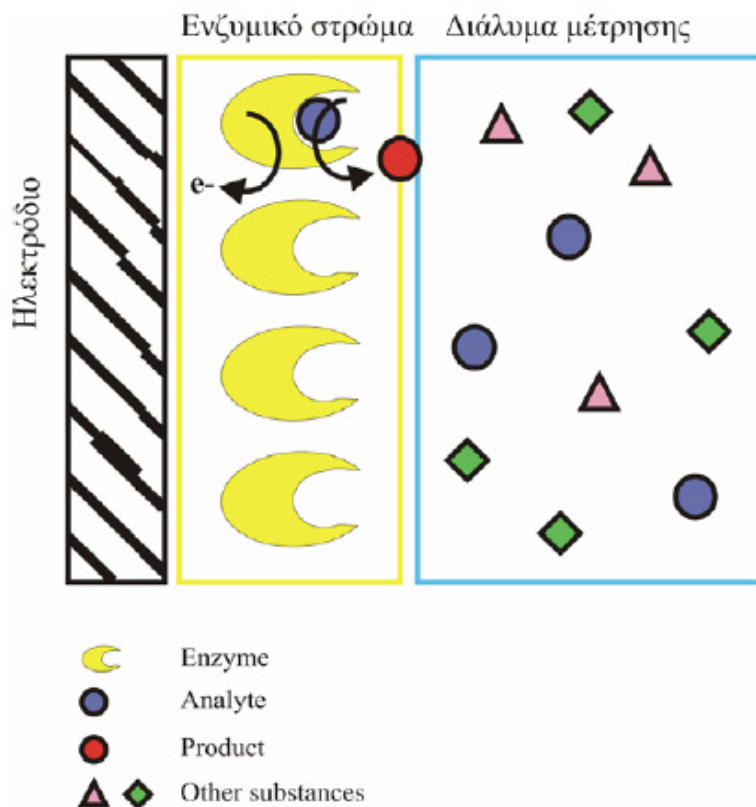
## **3.3 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ**

### **3.3.1 Αρχή λειτουργίας**

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών, που παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διαδικασία της βιολογικής αναγνώρισης. Οι ενώσεις αυτές οξειδώνονται ή ανάγονται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και το αναλυτικό σήμα προέρχεται από τη μέτρηση των παραγόμενων ηλεκτρονίων. Αποτελούν το πιο ευαίσθητο σύστημα μετάλλαξης της

βιολογικής αναγνώρισης σε αναλυτικό σήμα., καθώς η καταγραφή ρευμάτων της τάξης των  $10^{-9}$  A απαιτεί την αντίδραση μόλις  $10^{-14}$  mol/s (για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ενός ηλεκτρονίου) [108].

Για την κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων συνήθως χρησιμοποιούνται ένζυμα αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθούν επίσης κύτταρα και μικροοργανισμοί. Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα, στον οποίο το βιολογικό σύστημα είναι ένα ακινητοποιημένο ένζυμο. Η μεμβράνη με το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι σε στενή επαφή με το ηλεκτρόδιο εργασίας:



**Σχήμα 3.2.** Αρχή λειτουργίας αμπερομετρικών βιοαισθητήρων κατάλυσης.

Τα αντιδρώντα, ένα από τα οποία είναι συνήθως η προσδιοριζόμενη ουσία (αναλύτης), διαχέονται προς το ενζυμικό στρώμα, όπου καταλύεται η μετατροπή τους σε προϊόντα από τα ακινητοποιημένα ένζυμα. Η επίτευξη της μέτρησης απαιτεί ένα τουλάχιστον από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα να είναι ηλεκτροχημικά ενεργό. Η οξείδωση ή αναγωγή

στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παράγει το μετρούμενο σήμα (ένταση ρεύματος). Αν η ηλεκτροενεργή ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης, τότε κατά την προσθήκη του δείγματος καταγράφεται αύξηση στο ρεύμα ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Αν η ηλεκτροενεργός ουσία είναι συμπαράγοντας της ενζυμικής αντίδρασης, τότε η ποσότητα αυτής πρέπει να είναι σταθερή και σε σχετική αφθονία. Με τον τρόπο αυτό η ενζυμική αντίδραση επηρεάζεται μόνο από τον αναλύτη, και τυχόν μεταβολή του ρεύματος συσχετίζεται με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 3.2, η ενζυμική αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μια μεμβράνη που εκτείνεται σε μια στενή περιοχή στη διεπιφάνεια με τον κύριο όγκο του διαλύματος. Τα μόρια του υποστρώματος φθάνουν στη επιφάνεια της ενζυμικής μεμβράνης με διάχυση και ανάμιξη και ακολούθως διαχέονται στο εσωτερικό της ενζυμικής μεμβράνης, οπότε και λαμβάνει χώρα η αντίδραση, με ταχύτητα που καθορίζεται από την κινητική του ενζύμου [108].

Το προφίλ του ρεύματος, σε σχέση με το χρόνο μειώνεται εκθετικά και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας (όπου το ρεύμα έχει αποκτήσει σταθερή τιμή) η τιμή του δίνεται από την εξίσωση Cottrell [112]:

$$i = nFADC / \delta \quad (3.1)$$

όπου n: αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση  
F: η σταθερά Faraday, D: ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας, C: η συγκέντρωση της Ένωσης και  $\delta$  είναι μια σταθερά που σχετίζεται με το πάχος του στρώματος διάχυσης

### 3.3.2 Κατασκευή των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων

Τα βασικά στάδια στην ανάπτυξη και κατασκευή ενός βιοαισθητήρα αναλύονται παρακάτω [108,113]:

#### Ακίνητοποίηση Ενζύμου

Το πιο βασικό στάδιο στην κατασκευή ενός αξιόπιστου βιοαισθητήρα είναι η ακίνητοποίηση του βιολογικού μορίου στο αισθητήριο στοιχείο και η πρόσδεση αυτού στον μεταλλάκτη σήματος. Η ακίνητοποίηση του ενζύμου σε ένα υλικό επηρεάζει τα

χαρακτηριστικά του (διαμόρφωση, σταθερότητα και καταλυτική δράση) με αποτέλεσμα να επηρεάζονται κατ' επέκταση και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα [114]. Η μέθοδος ακινητοποίησης πρέπει να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή ενεργότητα του ενζύμου, τη δυνατότητα πρόσβασης του υποστρώματος στα ενεργά κέντρα και τη γρήγορη μεταφορά μάζας υποστρωμάτων και προϊόντων προς και διαμέσου του στρώματος ακινητοποίησης.[115].

Οι κυριότεροι μέθοδοι ακινητοποίησης περιγράφονται στο Σχήμα 3.3 [116,117]:

**Προσρόφηση.** Το ένζυμο ακινητοποιείται με απλή προσρόφηση είτε στην επιφάνεια ενός βοηθητικού υλικού, είτε απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η προσρόφηση διακρίνεται σε δύο τύπους : Τη φυσιορρόφηση, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω ασθενών van der Waals δεσμών, δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, και τη χημειορρόφηση που λαμβάνει χώρα μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Κατά την προσρόφηση δεν απαιτείται προηγούμενη ενεργοποίηση ή άλλη κατεργασία της επιφάνειας και η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται σε ένα μόνο στάδιο. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι συνήθως η δέσμευση είναι ασθενής, ενώ παράλληλα το ένζυμο είναι εκτεθειμένο σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος.

**Παγίδευση.** Ένα λεπτό φιλμ ενζύμου τοποθετείται στην επιφάνεια του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή και παγιδεύεται εκεί με τη βοήθεια μιας πολυμερικής μεμβράνης (συνήθως οξική κυτταρίνη, κολλαγόνο, Teflon και πολυουραιθάνη) διαπερατής στον αναλύτη. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζοταν στις αρχικές κατασκευές βιοαισθητήρων και έχει το πλεονέκτημα ότι περιορίζει την επιμόλυνση των ενζύμων από συστατικά του δείγματος, το οποίο ταυτόχρονα διατηρείται στη φυσιολογική του κατάσταση. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή σταθερότητα.

**Εγκλωβισμός.** Τα ένζυμα αναμιγνύονται με διαλύματα μονομερών, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες εγκλωβίζοντας το βιομόριο. Πολυμερικές μεμβράνες που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν το πολυακρυονιτρίλιο αλλά και πυριτικές πηκτές (sol-gel). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται, επίσης, και αγώγιμα πολυμερή, όπως το πολυπυρρόλιο, προκειμένου

να επιτευχθεί ταχύτερη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένζυμο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος απόκρισης, λόγω της αργής διάχυσης του υποστρώματος μέσα από το πολυμερές καθώς και ο μικρός χρόνος ζωής που καθορίζεται κυρίως από τη σταθερότητα του πολυμερικού πλέγματος.

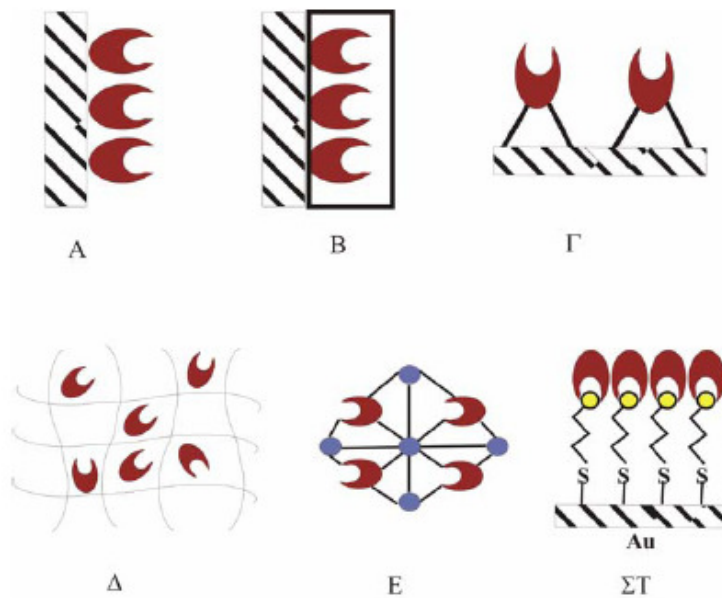
**Ομοιοπολική Δέσμευση.** Τα βιολογικά μόρια προσδένονται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ δραστικών ομάδων της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και δραστικών ομάδων καταλοίπων αμινοξέων της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου. Η μέθοδος ευνοεί την ακινητοποίηση των ενζύμων με ελεγχόμενο προσανατολισμό. Τα ένζυμα διατηρούνται σε στενή επαφή με το ηλεκτρόδιο ευνοώντας τη γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων, ενώ, επίσης, δεν υπάρχουν εμπόδια στη διάχυση του υποστρώματος. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή οδηγεί σε βιοασθητήρες με μικρή μηχανική σταθερότητα, ενώ απαιτείται και προσοχή, ώστε η πρόσδεση να γίνεται μέσω αμινοξέων που δεν είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση.

**Διαμοριακή Σύνδεση.** Τα ένζυμα προσδένονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή του υλικού στήριξης με τη βοήθεια διδραστικών αντιδραστηρίων, όπως είναι η γλουταραλδεϋδη και το καρβαδιμίδιο. Τα ένζυμα συνδέονται είτε μεταξύ τους, είτε με άλλες μη δραστικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας διαμοριακούς δεσμούς. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας, λόγω της χρήσης χημικών αντιδραστηρίων και οργανικών διαλυτών.

**Δημιουργία Αυτοσυγκροτούμενων Μονομοριακών Στρωμάτων (Self –Assembled Monolayers).** Τα τελευταία χρόνια μια μέθοδος ακινητοποίησης που έχει αναπτυχθεί βασίζεται στη δημιουργία αυτοσυγκροτούμενων δομών [118,119]. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αυθόρμητη οργάνωση μικρότερων μορίων σε μακρομοριακές δομές. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή οργανική σύνθεση, όπου τα διάφορα συνθετικά στάδια περιλαμβάνουν τη λύση και τη δημιουργία δεσμών και πραγματοποιούνται κατώ από κινητικό έλεγχο, η δημιουργία των SAMs βασίζεται στην ανάπτυξη ασθενών δεσμών

(van der Waals, δεσμών υδρογόνου κ.τ.λ.) και η διαδικασία γίνεται υπό θερμοδυναμικό έλεγχο.

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί κάποια μέθοδος ακινητοποίησης, που να βρίσκει γενική εφαρμογή σε όλα τα βιολογικά μόρια και σε όλα τα υλικά στήριξης. Τα κυριότερα προβλήματα που αντιμετωπίζονται αφορούν στη σταθερότητα και στην επαναληψιμότητα των συστημάτων. Για κάθε βιολογικό μόριο βελτιστοποιείται ανάλογα και η μέθοδος ακινητοποίησης.



**Σχήμα 3.3.** Μέθοδοι ακινητοποίησης βιολογικών μορίων στους βιοαισθητήρες. A )Προσρόφηση, B) Παγίδευση, Γ) Ομοιοπολική Δέσμευση, Δ) Εγκλωβισμός, E) Διαμοριακή Σύνδεση και ΣΤ) Δημιουργία SAMs.



### 3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 3.4.1 Γενικά

Στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες DNA, το DNA ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και μελετάται η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του σε σχέση με ενώσεις που εμφανίζουν αγχιστεία με αυτό.

Στο DNA μόνο τα νουκλεϊκά οξέα και συγκεκριμένα οι βάσεις είναι ηλεκτρενεργές και παράγουν ηλεκτροχημικά σήματα.

Με βάση το είδος της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο DNA και στις ενώσεις ή φάρμακα μπορούν να διακριθούν δύο κατηγορίες ηλεκτροχημικών DNA-βιοαισθητήρων:

- Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βλαβών στο DNA ή βιοαισθητήρες δομής.
- Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση υβριδισμού στο DNA ή βιοαισθητήρες υβριδισμού.

Οι **βιοαισθητήρες δομής** αξιοποιούν τα παρακάτω φαινόμενα :

❖ Η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA και ιδιαίτερα της γουανίνης αποτελεί ένδειξη βλάβης στο DNA.

❖ Πολλές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA παράγουν το δικό τους ηλεκτροχημικό σήμα και αυτό αποτελεί ένδειξη της δέσμευσης τους στο DNA.

❖ Με το ηλεκτρόδιο υδραργύρου είναι δυνατή η ανίχνευση του «σπασίματος» της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και των διαφόρων ενώσεων πραγματοποιείται με τους τρόπους που προαναφέρθηκαν.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ανίχνευση των βλαβών στο DNA είναι η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Τα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής αφορούν τον μεγάλο συνολικό χρόνο ανάλυσης και τη μικρή ευαισθησία, καθώς αδυνατεί να ανιχνεύσει μικρές βλάβες, λόγω ιονίζουσας ακτινοβολίας, έκθεσης σε χημικά κ.τ.λ.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα όπως σχετικά φτηνή οργανολογία, ταχύτητα, εκλεκτικότητα, αναλυτική ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προκαταρκτικές μεθόδους ανάλυσης (screening methods) ενώσεων, που παρουσιάζουν αγχιστεία με το DNA ή που προκαλούν βλάβες στο DNA (αντικαρκινικά φάρμακα, τοξικές ενώσεις).

Επίσης, οι βιοαισθητήρες δομής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμόν ιχνών DNA ή RNA (επίπεδα ng), για τον ηλεκτροχημικό χαρακτηρισμό του ssDNA, του dsDNA, του scDNA και για την ταυτοποίηση των διαφόρων μορφών του DNA.

Στους **βιοαισθητήρες υβριδισμού** μια συγκεκριμένη αλληλουχία ακινητοποιείται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια (DNA probe) που μπορεί να έχει μήκος 15 έως 20 νουκλεοτιδίων, και έπειτα το DNA-μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει το DNA-στόχο (target DNA), το οποίο αναγνωρίζει, εάν έχει συμπληρωματική αλληλουχία. Αν η αλληλουχία βάσεων του DNA-στόχου είναι ακριβώς η συμπληρωματική της ακινητοποιημένης στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τότε σχηματίζεται ένα προϊόν υβριδισμού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε περίπτωση μη συμπληρωματικότητας, δε δημιουργείται υβρίδιο [120,121]. Δύο είναι τα πολύ σημαντικά στάδια στην όλη διαδικασία: (α) ο σχηματισμός του υβριδίου και (β) η μετατροπή του παραπάνω φαινομένου σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Έκθεση του αισθητήρα σε διάλυμα, το οποίο περιέχει έναν ηλεκτροχημικό δείκτη (π.χ. ένα οξειδοαναγωγικό κατιονικό μεταλλικό σύμπλοκο) αντιδρά ισχυρά και αντιστρεπτά με το υβριδισμένο DNA. Αύξηση του ηλεκτροχημικού σήματος λόγω της οξειδοαναγωγής του ηλεκτροχημικού δείκτη, ο οποίος συνδέεται με τη νεοσχηματισθείσα διπλή έλικα, χρησιμεύει ως αναλυτικό σήμα για την παρακολούθηση του υβριδισμού [123].

Οι βιοαισθητήρες υβριδισμού χρησιμοποιούνται, κυρίως, για την ταυτοποίηση γονιδίων.

## 4. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών, καθεμία από τις οποίες βασίζεται σε ένα ιδιαίτερο φαινόμενο, που πραγματοποιείται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το πειραματικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελείται από τον ηλεκτρολύτη, που άγει το ρεύμα, τα ηλεκτρόδια και από το κύκλωμα μέτρησης ή το εξωτερικό κύκλωμα, που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή και μέτρηση ηλεκτρικών σημάτων. Μετρούνται διάφορα ηλεκτρικά μεγέθη, όπως π.χ. ένταση ρεύματος, δυναμικό, αντίσταση (αγωγιμότητα), μόνα ή σε συνδυασμούς, και με βάση τις μετρούμενες τιμές επιτελείται ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση. Σε μια ηλεκτροχημική ανάλυση, είτε καθορίζεται η σχέση μεταξύ μεγέθους ηλεκτρικού σήματος και ενεργότητας (συγκεντρώσεως), είτε το ηλεκτρικό σήμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του τελικού σημείου μιας τιτλομέτρησης ή το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπει την προσδιοριζόμενη χημική οντότητα σε μια καθορισμένη μορφή που προσδιορίζεται είτε σταθμικά είτε από την ποσότητα του ηλεκτρικού φορτίου που καταναλώθηκε [122].

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από ευρύτατη περιοχή ευαισθησίας (mg–ng) και ακρίβειας (0,1-10%) καθώς και από μικρό σχετικά κόστος των χρησιμοποιούμενων οργάνων.

**Ταξινόμηση ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης.** Οι κυριότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης παρέχονται στον Πίνακα 4.1. Κάθε τεχνική απαιτεί τον άμεσο έλεγχο τουλάχιστον μιας από τις τρεις βασικές παραμέτρους – ένταση ρεύματος  $I$ , δυναμικό  $E$ , χρόνος  $t$ - και τη μέτρηση μιας άλλης παραμέτρου.

**Πίνακας 4.1.** Ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης

<b>Τεχνική</b>	<b>Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος</b>	<b>Μετρούμενη φυσική ιδιότητα</b>
Ποτενσιομετρία	$i=0$	E
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση	$i=0$	E συναρτήσει V
Χρονοποτενσιομετρία	I	E συναρτήσει t
Βολταμμετρία	E	i συναρτήσει E
Αναδιαλυτική Βολταμμετρία	E	i συναρτήσει E
Πολαρογραφία	E	i συναρτήσει E
Αμπερομετρική ογκομέτρηση	E	i συναρτήσει V
Κουλομετρία	E ή I	Ποσότητα ηλεκτρισμού
Κουλομετρική ογκομέτρηση	I	t
Ηλεκτροσταθμική ανάλυση	E ή I	Βάρος αποτιθέμενης ουσίας
Αγωγιγομετρία	E (AC)	1/R
Αγωγιμετρική ογκομέτρηση	E (AC)	1/R συναρτήσει V

$i$  = ένταση ρεύματος, E =τάση, V = όγκος τιτλοδότη, t = χρόνος, AC = εναλλασσόμενο ρεύμα, 1/R = αγωγιμότητα

## Ορισμοί

Τα ηλεκτρόδια του ηλεκτροχημικού στοιχείου αποτελούν την **άνοδο** και την **κάθοδο** του στοιχείου. Ανεξάρτητα από το είδος του στοιχείου, στην κάθοδο πραγματοποιούνται πάντοτε αντιδράσεις αναγωγής και στην άνοδο αντιδράσεις οξειδώσης. **Ενδεικτικό ηλεκτρόδιο** (indicator electrode) είναι το ηλεκτρόδιο , που εμφανίζει δυναμικό εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του διαλύματος, **ηλεκτρόδιο αναφοράς** (reference electrode) είναι το ηλεκτρόδιο , που εμφανίζει σταθερό και επαναλήψιμο δυναμικό, ανεξάρτητο από τη σύσταση του διαλύματος και τις μεταβολές στην ένταση του ρεύματος, **ηλεκτρόδιο εργασίας** (working electrode) είναι το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται η ελεγχόμενη η παρακολουθούμενη ηλεκτροδιακή αντίδραση και **βοηθητικό ή αντίθετο ηλεκτρόδιο** (counter electrode), το οποίο αποτελείται από ένα αδρανές μέταλλο, μέσα από το οποίο διέρχεται το ρεύμα, αποφεύγοντας έτσι τη διέλευση ρεύματος από το ηλεκτρόδιο αναφοράς [122].

## Ηλεκτροδιακές διεργασίες

Στα ηλεκτρόδια πραγματοποιούνται δύο τύποι διεργασιών, **φαρανταϊκές** (faradaic processes) και **μη φαρανταϊκές** (non faradaic processes). Στις φαρανταϊκές διεργασίες, που διέπονται από το νόμο του Faraday (δηλαδή ότι η ποσότητα της ουσίας που οξειδώνεται ή ανάγεται, είναι ανάλογη της ποσότητας του ηλεκτρισμού, που διέρχεται από το διάλυμα) γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας (μεσόφαση) ηλεκτροδίου – διαλύματος και επομένως λαμβάνει χώρα οξείδωση ή αναγωγή, γιατί δεν είναι δυνατόν να επιβιώσει ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια στις φαρανταϊκές διεργασίες ονομάζονται ηλεκτρόδια μεταφοράς φορτίου και το παρατηρούμενο ρεύμα ονομάζεται **φαρανταϊκό ρεύμα (faradaic current),  $i_F$** . Στις μη φαρανταϊκές διεργασίες δε γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου – διαλύματος, γιατί δεν ευνοείται κινητικά ή θερμοδυναμικά. Τέτοιες διεργασίες είναι η προσρόφηση και η εκρόφηση ουσιών στο ηλεκτρόδιο και η αλλαγή ιδιοτήτων της διεπιφάνειας κατά τις αλλαγές του δυναμικού του ηλεκτροδίου ή της σύστασης του διαλύματος. Παρόλο, όμως, που δε διακινούνται ηλεκτρόνια στις μη φαρανταϊκές διεργασίες, εντούτοις μπορεί να παρατηρηθεί διέλευση ρεύματος, έστω και

παροδικά, όταν αλλάζει το δυναμικό ή η επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή η σύσταση του διαλύματος. Το ρεύμα αυτό ονομάζεται **χωρητικό ρεύμα (capacitive current),  $i_c$** . Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα μη φαρανταϊκής διεργασίας είναι η φόρτιση ενός ηλεκτροδίου, κατά την οποία το χωρητικό ρεύμα φορτίζει την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα που υπάρχει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην τιμή ισορροπίας που αντιστοιχεί στο δυναμικό του ηλεκτροδίου.

Ένα ηλεκτρόδιο, στο οποίο δε λαμβάνει χώρα μεταφορά φορτίου διαμέσου της διεπιφάνειας μετάλλου-διαλύματος για οποιαδήποτε τιμή εφαρμοζόμενου δυναμικού από μια εξωτερική πηγή τάσης, ονομάζεται ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο. Μόνο μη φαρανταϊκές διεργασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα τέτοιο ηλεκτρόδιο. Εάν όμως προστεθεί στο διάλυμα ένας αποπολωτής, δηλαδή μια ηλεκτρενεργός ουσία, που μπορεί να αναχθεί ή να οξειδωθεί, τότε διέρχεται φαρανταϊκό ρεύμα και το ηλεκτρόδιο αποπολώνεται.

Όταν αρχίσει η ροή φαρανταϊκού ρεύματος, η ισορροπία μεταξύ οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής διαταράσσεται, μπορεί όμως να επαναποκαθίσταται συνεχώς, αρκεί οι ηλεκτροδιακές αντιδράσεις να είναι αντιστρεπτές και όλα τα στάδια της ηλεκτροδιακής αντίδρασης, χημικές αντιδράσεις που προηγούνται ή έπονται της μεταφοράς των ηλεκτρονίων να είναι γρήγορα. Εάν όμως υπάρχει καθυστέρηση, τότε το πραγματικό δυναμικό  $E$  του ηλεκτροδίου είναι διαφορετικό από το δυναμικό  $E_{eq}$  στην κατάσταση ισορροπίας. Η διαφορά  $n=E-E_{eq}$  αποτελεί το **υπερδυναμικό (υπέρταση)** του ηλεκτροδίου (καθοδικό ή ανοδικό). Όταν το υπερδυναμικό (υπέρταση) οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση του αποπολωτή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωσή του στο κυρίως διάλυμα, λόγω βραδείας μετακίνησης του αποπολωτή προς το ηλεκτρόδιο, τότε μιλάμε για πόλωση συγκέντρωσης (concentration polarization). Όταν το υπερδυναμικό (υπέρταση) οφείλεται στη βραδεία μετακίνηση ηλεκτρονίων λόγω αδράνειας του χημικού συστήματος, ομιλούμε για πόλωση ενεργοποίησης (activation polarization). Τα δυο είδη πόλωσης είναι δυνατόν να συνυπάρχουν :

Εάν η ηλεκτροδιακή διεργασία γινόταν με άπειρη ταχύτητα, θα ήταν δυνατόν να τραβήξουμε ρεύμα, χωρίς αυτό να προκαλέσει την εμφάνιση υπερδυναμικού (υπέρτασης) στο ηλεκτρόδιο. Ένα τέτοιο ηλεκτρόδιο θα αποτελούσε ένα ιδανικά μη

πολώσιμο ηλεκτρόδιο. Στην πράξη, υπάρχουν ηλεκτρόδια με αμελητέα υπερδυναμικά που επιτρέπουν τη διέλευση σημαντικών ρευμάτων. Τέτοια μη πολώσιμα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρόδια αναφοράς [122].

### **Τρόποι μεταφοράς μάζας**

Προϋπόθεση για τη διατήρηση ενός φαρανταϊκού ρεύματος είναι η μεταφορά ηλεκτρενεργού ουσίας από την κύρια μάζα του διαλύματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου που μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

- 1) Την ταχύτητα με την οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις μεταφέρονται από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η διαδικασία αυτή καλείται **μεταφορά μάζας**.
- 2) Την ταχύτητα με την οποία τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ενώσεις του διαλύματος στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα. Η διαδικασία αυτή καλείται **μεταφορά φορτίου**.

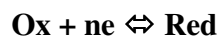
Στις περισσότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές η μεταφορά μάζας με όδευση δεν εξυπηρετεί κανένα αναλυτικό σκοπό, γι' αυτό και πρακτικά εξαλείφεται με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών. Ειδικότερα στη βολταμμετρία (πολαρογραφία), η μεταφορά της ηλεκτρενεργού ουσίας γίνεται πρακτικά μόνο με διάχυση, γιατί η φυσική ροή ελαχιστοποιείται με πλήρη αταραξία του διαλύματος (απουσία ανάδευσης), ενώ η μεταφορά με ηλεκτροστατικές έλξεις καθίσταται αμελητέα με προσθήκες μεγάλης ποσότητας φέροντος ηλεκτρολύτη, σε συγκέντρωση τουλάχιστον 100 πλάσια της συγκέντρωσης της ηλεκτρενεργού ουσίας. Με αυτό τον τρόπο, ο φέρων ηλεκτρολύτης γίνεται ο κύριος μεταφορέας φορτίου μέχρι το ηλεκτρόδιο, όπου η μεταφορά φορτίου γίνεται μόνο από την ηλεκτρενεργό ουσία, γιατί αυτή είναι ηλεκτρικά ανενεργή στη χρησιμοποιούμενη περιοχή τάσεων. Σε αυτές τις συνθήκες, υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ έντασης ρεύματος διάχυσης και συγκέντρωσης της ηλεκτρενεργού ουσίας [122].

## 4.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

### 4.2.1 Γενικά

Η βολταμμετρία είναι μια ηλεκτροανλυτική τεχνική, η οποία βασίζεται στην παρατήρηση της σχέσης που συνδέει την ένταση του ρεύματος, στο ηλεκτρόδιο εργασίας, και την εφαρμοζόμενη σε αυτό τάση. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας αποτελεί την ελεγχόμενη παράμετρο, η οποία αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα να αναχθούν ή να οξειδωθούν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι επιμέρους βολταμμετρικές τεχνικές διαφέρουν ως προς τον τρόπο, με τον οποίο μεταβάλλεται το δυναμικό με το χρόνο.

Η ηλεκτροδιακή δράση ακολουθεί το γενικό σχήμα:



Η εξίσωση του Nernst δίνει τη σχέση μεταξύ του δυναμικού του ηλεκτροδίου και της συγκέντρωσης της οξειδωμένης ή της ανηγμένης μορφής στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (στους 25°C):

$$E = E^{\circ} + (0.059/n) \log(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) \quad (4.1)$$

Στη Σχέση 4.1,  $C_{\text{ox}}$  και  $C_{\text{red}}$  είναι οι συγκεντρώσεις της οξειδωμένης και της ανηγμένης μορφής.

Το φαρανταϊκό ρεύμα εξαρτάται από:

- (α) Φαινόμενα μεταφοράς μάζας, δηλαδή την ταχύτητα, με την οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις μεταφέρονται από το διάλυμα επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.
- (β) Φαινόμενα μεταφοράς φορτίου, δηλαδή την ταχύτητα με την οποία τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ενώσεις του διαλύματος επάνω στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα.

Στην οξειδοαναγωγή είναι δυνατόν να συμβούν επιφανειακές ή άλλες χημικές αντιδράσεις. Το βραδύτερο στάδιο καθορίζει το μέγεθος του ρεύματος. Για τη διαδικασία που ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας, στην οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις είναι



δυνατόν να φτάσουν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με διάχυση, το ρεύμα που προκύπτει περιγράφεται από την εξίσωση Cottrell:

$$i = nFA(D/\pi t)^{1/2} C \quad (4.2)$$

Όπου  $i$  = ρεύμα διάχυσης (ampere) που διαρρέει το σύστημα σε χρόνο  $t$  (sec) από την έναρξη του πειράματος

$n$  = πλήθος ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης

$F$  = σταθερά Faraday

$A$  = επιφάνεια ( $\text{cm}^2$ ) του ηλεκτροδίου

$D$  = συντελεστής διάχυσης ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

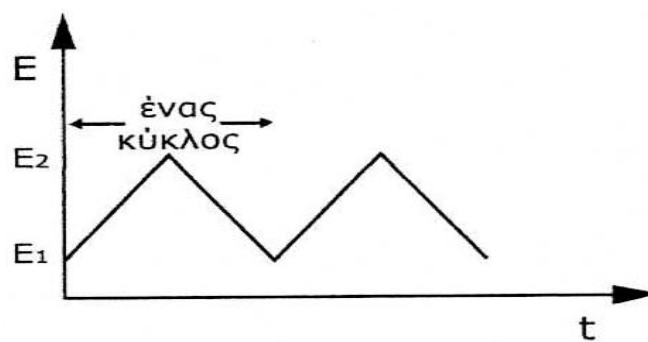
$C$  = συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (M)

Επιπλέον από το φαρανταϊκό ρεύμα, το ρεύμα υποβάθρου (υπολειμματικό), το οποίο διαρρέει το σύστημα με την απουσία των ηλεκτροδραστικών ενώσεων που ενδιαφέρουν, είναι σύνθετο και προέρχεται από τη συνεισφορά του ρεύματος φόρτισης της διπλοστιβάδας, της αντίδρασης οξειδοαναγωγής των προσμίξεων, καθώς και του διαλύτη, του ηλεκτρολύτη ή του ηλεκτροδίου. Το ρεύμα φόρτισης είναι το κύριο συστατικό του υπολειμματικού ρεύματος. Το διάγραμμα ρεύματος-δυναμικού καλείται βολταμμογράφημα. Από το βολταμμογράφημα, το δυναμικό στο ανερχόμενο τμήμα του κύματος ή της κορυφής αποδίδεται στο  $E^0$  για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος και παρέχει ποιοτικές πληροφορίες, ενώ το φαρανταϊκό ρεύμα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων και μπορεί να αξιοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται από το σχετικό μέγεθος του φαρανταϊκού ρεύματος συγκρινόμενο με το υπολειμματικό ρεύμα. [123].

#### 4.2.2 Κυκλική Βολταμμετρία

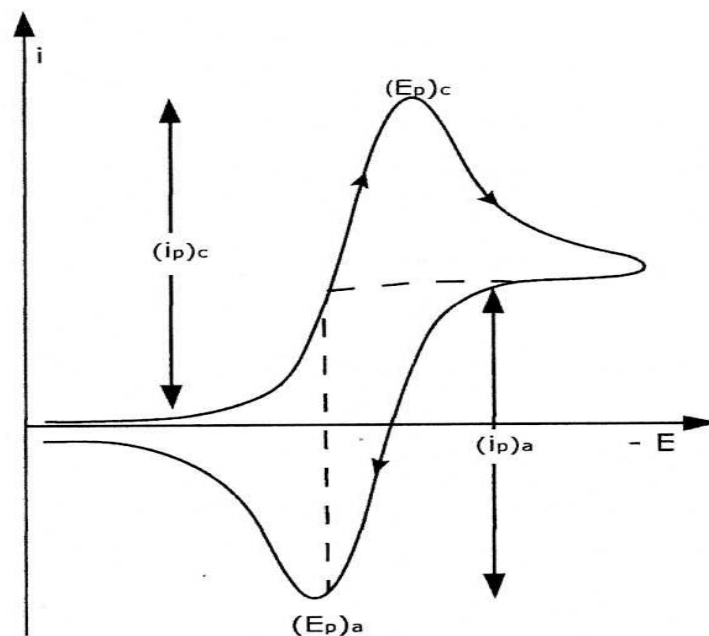
Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη του μηχανισμού οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και το χαρακτηρισμό των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των διαφόρων ενώσεων. Συχνά αποτελεί το πρώτο πείραμα, το οποίο εκτελείται σε μια ηλεκτροχημική μελέτη.

Στην κυκλική βολταμμετρία εφαρμόζεται επί του ηλεκτροδίου εργασίας τριγωνικό κύμα δυναμικού, πρώτα προς μια κατεύθυνση και ύστερα συμμετρικά στην αντίθετη κατεύθυνση που επαναλαμβάνεται ταχέως [122]. Το δυναμικό σαρώνεται στην καθοδική κατεύθυνση στη διαδικασία αναγωγής και στη συνέχεια αντίστροφα στην ανοδική κατεύθυνση μετά τον τερματισμό του κύματος αναγωγής. Το δυναμικό είναι δυνατό να σαρώνεται ως απλός ή ως πολλαπλός κύκλος και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού μπορεί να φτάσει και τα  $100 \text{ Vs}^{-1}$  [124].



**Σχήμα 4.1.** Εφαρμογή της κυματομορφής του δυναμικού στην κυκλική βολταμμετρία σε συνάρτηση με το χρόνο.

Το τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για ένα αντιστρεπτό σύστημα αναγωγής φαίνεται στο Σχήμα 4.2.



**Σχήμα 4.2.** Τυπικό αντιστρεπτό κυκλικό βολταμμογράφημα.

Οι μετρούμενες παραμέτροι σε ένα κυκλικό βολταμμογράφημα είναι ο λόγος των ρευμάτων των κορυφών  $i_{pa}/i_{pc}$ , καθώς και η διαφορά  $E_{pa} - E_{pc}$  όπου  $E_{pa}$  και  $E_{pc}$  είναι το ανοδικό και καθοδικό δυναμικό, αντίστοιχα. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές, που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς είναι η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού καθώς και η περιοχή σάρωσης του δυναμικού. Η μορφή του βολταμμετρικού κύματος κατά την αναστροφή εξαρτάται από το δυναμικό αναστροφής,  $E_{λ}$ , ή από το πόσο πέρα από την καθοδική κορυφή συνεχίζεται η σάρωση πριν την αναστροφή.

Οι θεωρητικές σχέσεις για την κυκλική βολταμμετρία αναπτύχθηκαν από τους Nicholson και Shain [125]. Για ένα απλό αντιστρεπτό σύστημα ο λόγος των ρευμάτων  $i_{pa}/i_{pc}$  είναι ίσος με τη μονάδα, ενώ η τιμή του ρεύματος του δυναμικού δίνεται από την εξίσωση:

$$i_p = 2,67105 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (4.3)$$

όπου:  $i_p$  =ρεύμα κορυφής (Ampere)

$n$  =πλήθος ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης

$F$  =σταθερά Faraday

$A$  = επιφάνεια του ηλεκτροδίου ( $\text{cm}^2$ )

$D$  = συντελεστής διάχυσης ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

$C$  = συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (M)

$v$  = ρυθμός σάρωσης του δυναμικού ( $\text{Vs}^{-1}$ )

Η απόκλιση του λόγου  $i_{pa}/i_{pc}$  από την μονάδα είναι ενδεικτική κινητικών ή άλλων περιπλοκών στην ηλεκτροδιακή διαδικασία.

### 4.3 ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΑ

Η πολαρογραφία αποτελεί περίπτωση της βολταμετρίας, όπου το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Dropping Mercury Electrode). Το πλεονέκτημα αυτού του ηλεκτροδίου έναντι άλλων είναι η υψηλή υπέρταση υδρογόνου, που επεκτείνει την περιοχή σάρωσης του καθοδικού δυναμικού και η συνεχώς ανανεούμενη επιφάνειά του. Μειονέκτημα αποτελεί ότι ο υδράργυρος οξειδώνεται εύκολα και συνεπώς περιορίζεται η περιοχή σάρωσης του ανοδικού δυναμικού [123].

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτροδραστικών ουσιών το ρεύμα φόρτισης γίνεται μεγαλύτερο από το φαρανταιϊκό και είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες τεχνικές, όπως είναι οι παλμικές τεχνικές.

## 1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ

### 4.4.1 Βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης του δυναμικού

Στην τεχνική αυτή το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο. Η κορυφή του ρεύματος μπορεί να αυξηθεί με ταχύτερη σάρωση του δυναμικού. Το χωρητικό ρεύμα, όμως, που φορτίζει το ηλεκτρόδιο στο εφαρμοζόμενο δυναμικό, είναι επίσης ανάλογο της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. Έτσι αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρεύματος φόρτισης. Δηλαδή το χωρητικό ρεύμα περιορίζει το όριο ανίχνευσης.

### 4.4.2 Βολταμμετρία διαφορικού παλμού

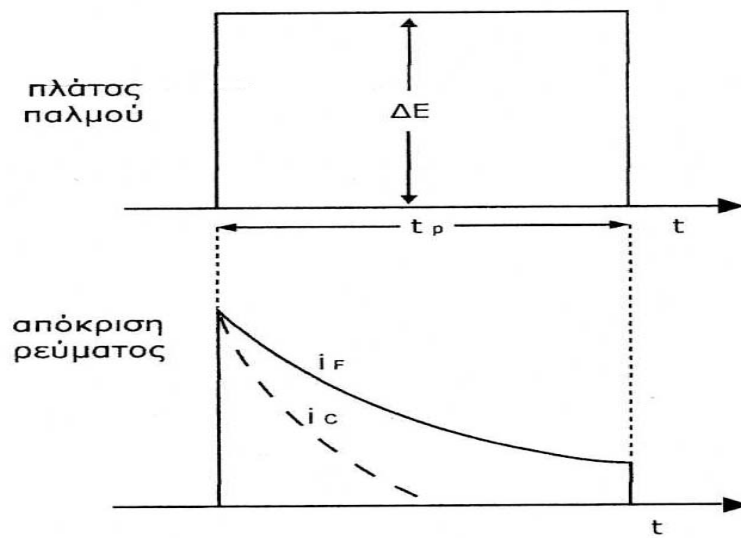
Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προκαλείται σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος και βελτίωση της ευαισθησίας των προσδιορισμών. Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή παλμού σε σταθερό ή αυξανόμενο δυναμικό επάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και διακρίνεται σε βολταμμετρία διαφορικού και κανονικού παλμού[126]. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταιϊκό βραδύτερα. Εξετάζοντας το ρεύμα στα τελευταία χιλιοστοδευτερόλεπτα της διάρκειας του παλμού, το ρεύμα είναι σχεδόν φαρανταιϊκό. Η ευαισθησία αυξάνεται 5 έως 7 φορές συγκρινόμενη με αυτή της κλασσικής πολαρογραφίας.

### 4.4.3 Βολταμμετρία κανονικού παλμού

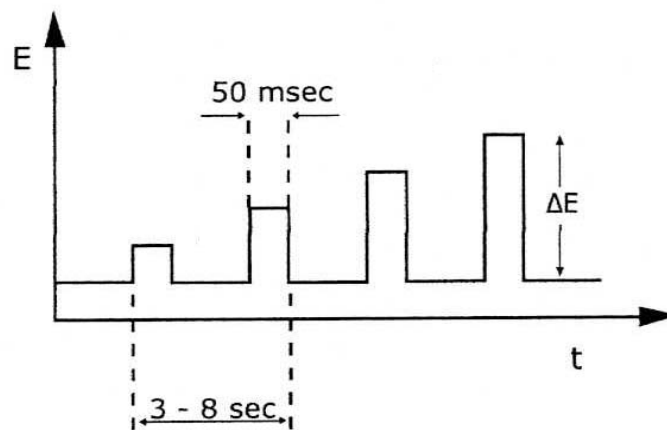
Σε αυτή την τεχνική το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας μεταβάλλεται με τη βοήθεια παλμών αυξανόμενου πλάτους, που υπερτίθεται σε ένα αρχικά σταθερό δυναμικό (Σχήμα 4.4). Η εφαρμογή των παλμών γίνεται προς το τέλος ζωής της σταγόνας του σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται προς το τέλος της εφαρμογής του παλμού, αφού τότε το χωρητικό ρεύμα έχει ελαττωθεί σημαντικά. Το ολικό ρεύμα που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο δίνεται από την εξίσωση:

$$i = nFA(D/\pi t_p)^{1/2} C \quad (4.4)$$

όπου  $t_p$  είναι η διάρκεια του παλμού σε sec



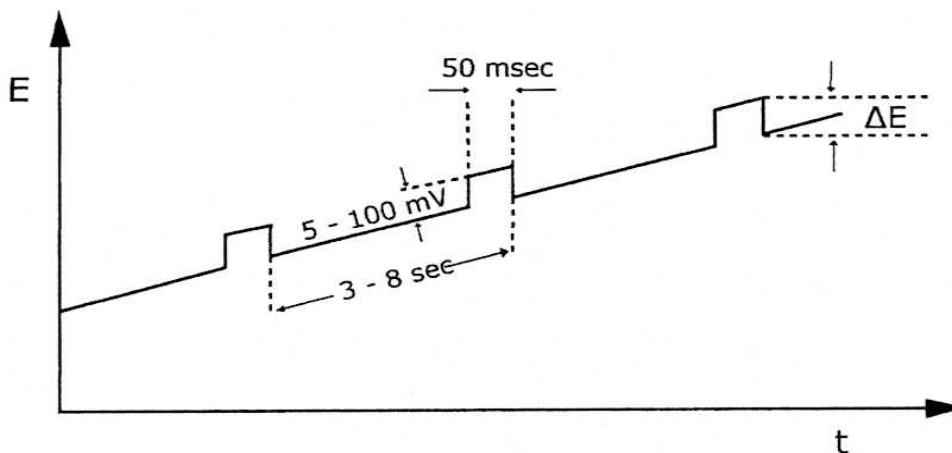
Σχήμα 4.3. Δυναμικό και ρεύμα κατά τη διάρκεια του παλμού.



Σχήμα 4.4. Συμπεριφορά δυναμικού-χρόνου στην κανονική παλμική βολταμετρία

#### 4.4.4 Βολταμμετρία διαφορικού παλμού

Σε αυτή την τεχνική οι παλμοί είναι σταθερού πλάτους και υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό [127]. Οι παλμοί εφαρμόζονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας τη χρονική στιγμή αμέσως πριν το τέλος του χρόνου ζωής της σταγόνας. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού. Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρείται αυτόματα από το μέγεθος του δευτέρου και αυτή η διαφορά του ρεύματος παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.



Η ηλεκτροδιακή δράση δίνεται από την εξίσωση:

$$i_p = nFAc(D/t_p)^{1/2} (\sigma-1)/(\sigma+1) \quad (4.5)$$

όπου:  $t_p$  = το εύρος του παλμού

$$\sigma = \exp(nF\Delta E/2RT)$$

$\Delta E$  = το πλάτος του παλμού

Αν  $\Delta E$  είναι μικρότερο από τον παράγοντα  $RT/nF$ , το  $(\sigma-1)/(\sigma+1)$  γίνεται  $nF\Delta E/4RT$  και η εξίσωση απλοποιείται στην:

$$i_p = (n^2 F^2 / 4RT) AC \Delta E (d/\pi t_p)^{1/2} \quad (4.6)$$

Το ρεύμα της κορυφής είναι ευθέως ανάλογο με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης χημικής οντότητας, ενώ το δυναμικό στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή του αφού συνδέεται με το δυναμικό μισού κύματος με τη σχέση:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E / 2 \quad (4.7)$$

Τυπικά η διαφορική παλμική τεχνική είναι πιο ευαίσθητη από την κανονική παλμική κατά μια τάξη μεγέθους και το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι  $10^{-7} - 10^{-8} M$ , ενώ στην κανονική παλμική είναι  $10^{-6} - 10^{-7} M$  και στην κλασσική συνεχούς ρεύματος περίπου  $10^{-4} - 10^{-5} M$ .

#### **4.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗΣ**

Οι τεχνικές αναδιάλυσης είναι συνδυαστικές πολυσταδιακές τεχνικές, με το χαρακτηριστικό, ότι ο προσδιορισμός στηρίζεται αρχικά στην προσυγκέντρωση της αναλύμενης χημικής οντότητας επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με ηλεκτρόλυση. Ακολουθεί ηλεκτροχημική αναδιάλυση της ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα είναι ανάλογο της ηλεκτροχημικά δραστικής ουσίας [127]. Η αναδιάλυση των προσυγκεντρωμένων συστατικών πραγματοποιείται με εφαρμογή βολταμετρίας συνεχούς ή εναλλασσόμενου ρεύματος, καθώς και με διαφορική παλμική βολταμετρία. Έχουν επιτευχθεί όρια ανίχνευσης μέχρι και  $10^{-9} M$ .

##### **4.5.1 Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμετρία**

Σημαντική αύξηση της ευαισθησίας των πολαρογραφικών και βολταμετρικών μεθόδων μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών, οι οποίες πρόκειται να προσδιοριστούν. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί πριν τον προσδιορισμό, συνήθως με ηλεκτρόλυση σε ένα στατικό ηλεκτρόδιο εργασίας.

Κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης, η οποία μπορεί να παρομοιαστεί με ηλεκτρολυτική εκχύλιση, η οποία συμβαίνει κάτω από κατάλληλες συνθήκες, το



αμάλγαμα περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση του στοιχείου το οποίο μελετάται από τη συγκέντρωση την οποία έχει όταν βρίσκεται στο υδατικό διάλυμα. Η συγκέντρωση του μετάλλου στο αμάλγαμα εξαρτάται από τις συνθήκες της ηλεκτρόλυσης (όπως π.χ. ο χρόνος). Ο βολταμμετρικός προσδιορισμός γίνεται στη συνέχεια στο 'ηλεκτρόδιο αμάλγαμα'. Εάν υποθεθεί, ότι σχεδιάζεται το διάγραμμα ρεύματος/ δυναμικού ανοδικά (από αρνητικά σε θετικότερα δυναμικά), το ύψος της κορυφής του ρεύματος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στο αμάλγαμα και με δεδομένες συνθήκες ηλεκτρόλυσης, με τη συγκέντρωση του μετάλλου στο διάλυμα.

Η διαδικασία του προσδιορισμού χαρακτηρίζεται ως αντίστροφη γιατί γενικά λαμβάνει χώρα προς την αντίθετη κατεύθυνση από αυτή, η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά τον 'ηλεκτροχημικό εμπλουτισμό' ή ηλεκτρολυτική απόθεση. Στην απλούστερη περίπτωση, η ηλεκτρολυτική απόθεση αποτελείται από την αναγωγή του κατιόντος στην μεταλλική μορφή, η οποία για παράδειγμα είναι δυνατόν να είναι διαλυτή σε ένα στατικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου εξαιτίας σχηματισμού αμαλγάματος. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της αναδιάλυσης, όπου το διαλυμένο στον υδράργυρο μέταλλο αναδιαλύεται με οξειδωση, κατά τη σάρωση του δυναμικού προς θετική (ανοδική) κατεύθυνση.

Παράδειγμα:  $\text{Cd}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cd}^0(\text{Hg})$  **στάδιο προσυγκέντρωσης**

$\text{Cd}^0 \rightarrow \text{Cd}^{2+} + 2\text{e}^-$  **στάδιο αναδιάλυσης**

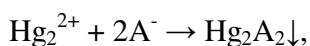
Η αναδιαλυτική βολταμμετρία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος. Είναι δυνατός ο προσδιορισμός της τάξης των ppb, είναι επίσης αποτελεσματική, καθώς και σχετικά μη δαπανηρή. Μετά το διαχωρισμό είναι δυνατόν να προσδιοριστούν τα παρακάτω μέταλλα ως αμάλγαμα με τον υδράργυρο όπως: Pb, Bi, Cu, Zn, Cd.

#### **4.5.2 Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία**

Η καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό οργανικών καθώς και ανόργανων ενώσεων οι οποίες σχηματίζουν δυσδιάλυτα άλατα με το ηλεκτροδιακό υλικό. Συνήθως, ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο

υδραργύρου καθώς, επίσης, και το ηλεκτρόδιο αργύρου το οποίο χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό αλογονούχων καθώς και θειούχων ιόντων.

Οι σχετικές αντιδράσεις στο ηλεκτρόδιο του υδραργύρου είναι:



όπου  $\text{A}^-$  είναι το προσδιοριζόμενο ανιόν το οποίο για λόγους απλούστευσης θεωρούμε ότι είναι μονοσθενές και  $\text{Hg}_2\text{A}_2$  είναι η δυσδιάλυτη ένωση, η οποία σχηματίστηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Η ευαισθησία του προσδιορισμού εξαρτάται από την ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού, το οποίο είναι δυνατόν να αποθεθεί ηλεκτρολυτικά σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Αυτή η ποσότητα είναι συνάρτηση της κινητικής του σχηματισμού, καθώς και της διαλυτοποίησης της ένωσης, η οποία αποτέθηκε, του συντελεστή διάχυσης του αντιδρώντος ιόντος στη λεπτή στοιβάδα που σχηματίστηκε καθώς και της πυκνότητας της λεπτής στοιβάδας. Η ευαισθησία εξαρτάται επίσης από την ταχύτητα διάστασης της δυσδιάλυτης ένωσης κατά τη διάρκεια της αναδιάλυσης.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό ανιόντων, όπως αλογονούχων ιόντων, ιόντων σεληνίου, θειούχων ιόντων, οξυανιόντων, καθώς και οργανικών ενώσεων, οι οποίες περιέχουν θειούχες ομάδες (π.χ. θειόλες).

#### **4.5.3 Προσροφητική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία**

Η ανάπτυξη της προσροφητικής βολταμμετρίας είναι αποτέλεσμα της εκμετάλλευσης της αυθόρμητης τάσης των αντιδρώντων να προσροφώνται, για την αύξηση της ευαισθησίας των βολταμμετρικών προσδιορισμών. Το φαινόμενο της προσρόφησης θεωρήθηκε πρόβλημα και αποδόθηκαν σ' αυτό πολλά ανεξήγητα αποτελέσματα. Εξάλλου η αύξηση λόγω προσρόφησης του ρεύματος, η οποία παρατηρήθηκε κατά τις πολαρογραφικές μελέτες πολλών οργανικών και ανόργανων μορίων ή ιόντων προσέφερε πολλά αναλυτικά πλεονεκτήματα.

Η διαφορά της προσροφητικής βολταμετρίας από την ανοδική και την καθοδική αναδιαλυτική βολταμετρία βρίσκεται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης. Το σύμπλοκο μετάλλου-(κυρίως ιόντα μεταβατικών στοιχείων)-συμπλεκτικού (ligand) προσυγκεντρώνεται στη διαφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου –διαλύματος [123]. Η αυξημένη κατά 5 και 10 φορές ευαισθησία αποδόθηκε στην παρουσία ηλεκτροενεργών συστατικών στην επιφάνεια του σταγονικού ηλεκτροδίου. Η χρήση αυτού του τύπου του ηλεκτροδίου, δεν επιτρέπει την πλήρη εκμετάλλευση της ευαισθησίας με τη διαφασική συσσώρευση, γι' αυτό το λόγο προτιμήθηκαν στατικά ηλεκτρόδια. Έτσι η προσυγκέντρωση βασίζεται στη διαφασική συσσώρευση και δεν περιλαμβάνει καμιά φαρανταϊκή δράση. Η προσροφητική βολταμετρία εκτός από την αυξανόμενη σπουδαιότητα της ως αναλυτική τεχνική, χρησιμεύει και για τη διευκρίνιση των διαφασικών και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των τασενεργών ουσιών.

Στην ηλεκτροχημεία προσρόφηση σημαίνει συγκράτηση των μορίων ή των μοριακών ιόντων ή των ιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η διεπιφάνεια μεταξύ ηλεκτροδίου και διαλύματος εμφανίζει ιδιότητες, οι οποίες διαφέρουν απ' αυτές του διαλύματος ή του ηλεκτροδίου. Η τάση της διεπιφάνειας να έλξει και να συγκρατήσει τα αντιδρώντα συστατικά είναι από τις πιο σημαντικές ιδιότητές της.

Η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας είναι μια διαδικασία αντικατάστασης, κατά την οποία τα μόρια του διαλύτη αντικαθίστανται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από μόρια ή ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Η τελευταία δεν αντικαθιστά πάντα εξ ολοκλήρου τα μόρια του διαλύτη, το μέγεθος της προσρόφησης εξαρτάται από το Μοριακό Βάρος, καθώς και από τη διαλυτότητα του αντιδρώντος σε δεδομένο διαλύτη, αφού μικρότερη διαλυτότητα οδηγεί σε ισχυρότερη προσρόφηση. Επίσης και άλλες δυνάμεις οδηγούν σε προσρόφηση, όπως ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος και του φορτισμένου ηλεκτροδίου, δυνάμεις διπόλου-πεδίου, δράση μεταξύ της ηλεκτροδιακής διπλοστιβάδας και των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών αντιδρώντων ουσιών, καθώς και χημειορόφηση συγκεκριμένων ομάδων στις επιφάνειες των μεταλλικών ηλεκτροδίων.

Το ρεύμα είναι ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης της προσροφημένης ουσίας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αυτή με τη σειρά της ανάλογη της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας. Η κατανόηση αυτής της σχέσης είναι δυνατή από την ισόθερμη προσρόφησης. Οι ισόθερμες είναι σχέσεις ισορροπίας μεταξύ της συγκέντρωσης της

ουσίας στην επιφάνεια που έχει προσροφηθεί και της συγκεντρώσεώς της στο διάλυμα. Η πιο γνωστή είναι η ισόθερμη του Langmuir:

$$\Gamma = \Gamma_m[BC/(1+BC)] \quad (4.7)$$

Όπου  $\Gamma$  είναι η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας,  $\Gamma_m$  η επιφανειακή συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα,  $C$  η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα,  $B$  ο συντελεστής προσρόφησης (ο οποίος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της προσροφημένης ουσίας και της επιφάνειας, που με τον τρόπο αυτό σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια προσροφήσης).

Η ισόθερμη του Langmuir επίσης μπορεί να γραφεί ως:

$$BC = \theta/(1-\theta) \quad (4.8)$$

Όπου  $\theta = \Gamma/\Gamma_m$  είναι η κλασική επιφανειακή κάλυψη.

Όταν  $1 \gg BC$  η εξίσωση παίρνει τη μορφή:

$$\Gamma = \Gamma_m BC \quad (4.9)$$

Για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας στην επιφάνεια η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα. Η ισόθερμη του Langmuir ανταποκρίνεται σε φυσικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο η μέγιστη κάλυψη επιφάνειας αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα, εκτίμηση η οποία σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εφαρμόσιμη, κι αυτό γιατί έτσι λανθασμένα συμπεραίνεται, ότι δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε τέτοιες περιπτώσεις εφαρμόζεται η ισόθερμη του Frumkin:

$$BC = [\theta/(\theta-1)] \exp(-2g\theta) \quad (4.10)$$

Όπου  $g$  είναι η παράμετρος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων των προσροφημένων ουσιών (και είναι θετική όταν η αλληλεπίδραση οφείλεται σε έλξη και

αρνητική όταν οφείλεται σε άπωση), όταν το  $g$  είναι ίσο με μηδέν τότε έχουμε την ισόθερμη του Langmuir.

Οι εφαρμογές της προσροφητικής βολταμετρίας στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων, βαρέων μετάλλων και ανιόντων την καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική, η υψηλή της ευαισθησία, η οποία επιτυγχάνεται με το στάδιο της προσυγκέντρωσης, χωρίς να είναι απαραίτητη προηγουμένως κάποια διαδικασία απομόνωσης του συστατικού, το οποίο πρόκειται να προσδιοριστεί (π.χ. με εκχύλιση) είναι γεγονός, που ελαττώνει τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης και την πιθανότητα επιβάρυνσης του δείγματος, ενώ επιτρέπει και την αυτοματοποίησή της.

#### **4.5.4 Προσροφητική βολταμετρία αλλαγής μέσου**

Η βολταμετρία αλλαγής μέσου ενδείκνυται σε περιπτώσεις, όπου είναι απαραίτητη η αποφυγή παρεμποδίσεων. Έτσι είναι δυνατή η παρακολούθηση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μόνο πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στην περίπτωση ανάπτυξης των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι απαραίτητη η αλλαγή μέσου, καθώς ενδιαφέρει η διαμόρφωση βιομορίων πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια χωρίς την ύπαρξη παρεμποδιζόντων συστατικών.

### **4.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

#### **4.6.1 Ο φέρων ηλεκτρολύτης**

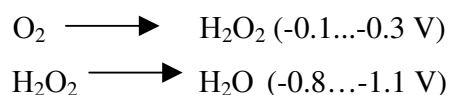
Η επιλογή του φέροντα ηλεκτρολύτη γίνεται με βάση τα πολαρογραφικά δεδομένα των ουσιών, οι οποίες μελετώνται. Η θέση του δυναμικού μισού κύματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της ηλεκτρόλυσης και επιτρέπει να γίνουν προβλέψεις σχετικά με τη διευκρινιστική ικανότητα των ανοδικών κορυφών. Τα δυναμικά των ανοδικών κορυφών, στην περίπτωση της βολταμετρίας δίνονται από την εξίσωση:

$$E_p = E_{1/2} + 0.029/n \quad (4.11)$$

και πρέπει οπωσδήποτε να υπολογίζονται με βάση τα πολαρογραφικά δεδομένα, όταν οι συνθήκες αντιστρεπτότητας της ηλεκτροδιακής δράσης είναι γνωστές. Με αυξανόμενη τη μη αντιστρεπτότητα τα ανοδικά δυναμικά τείνουν να μετακινηθούν σε θετικότερη κατεύθυνση.

Ο φέρων ηλεκτρολύτης στην ιχνοανάλυση πρέπει να έχει τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα, ενώ η συγκέντρωσή του πρέπει να είναι η κατάλληλη για την επίτευξη συγκεκριμένου βαθμού αγωγιμότητας.

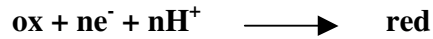
Απαραίτητη είναι η απαρέωση του διαλύματος που επιτυγχάνεται με τη διέλευση ρεύματος αναλυτικώς καθαρού αζώτου. Το διαλελυμένο οξυγόνο ανάγεται σε δυο στάδια:



Όταν η απομάκρυνση του οξυγόνου είναι ανεπαρκής, τότε σύμφωνα με τις δυο παραπάνω αντιδράσεις παράγονται ρεύματα, τα οποία αυξάνουν τη βασική γραμμή. Ακόμη ταυτόχρονα με την ηλεκτροκαταλυτική οξείδωση του αμαλγάματος είναι δυνατή η απευθείας αντίδραση μεταξύ του αμαλγάματος και του διαλελυμένου οξυγόνου, η οποία τείνει να ελαττώσει τα ανοδικά ρεύματα. Τελικά ο σχηματισμός των υδροξυλιόντων σε ουδέτερα διαλύματα, είτε σε διαλύματα, στα οποία δεν υπάρχει ρυθμιστικό σύστημα οδηγεί σε καταβύθιση υδροξειδίων, και στην ελάττωση του ρεύματος αναδιάλυσης, καθώς και στην παραμόρφωση των βολταμμογραφημάτων κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.

#### 4.6.2 Επίδραση pH

Τα υδρογονοκατιόντα υπεισέρχονται στην αναγωγή των περισσότερων οργανικών ενώσεων [123]. Η αναγωγή προϋποθέτει προσθήκη ηλεκτρονίων σε ουδέτερο μόριο, έτσι ώστε να σχηματιστεί η ανηγμένη μορφή, οπότε και απαιτείται ίσος αριθμός υδρογονοκατιόντων προκειμένου να διατηρηθεί η ουδετερότητα.



Η συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων υπεισέρχεται στην εξίσωση του Nernst η οποία είναι για την παραπάνω αντίδραση:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{C^{\text{ox}} C_{\text{H}^+}^n}{C^{\text{red}}} \right] \quad (4.12)$$

Έτσι γίνεται φανερό ότι το δυναμικό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων, δηλαδή από το pH του διαλύματος.

Η εξίσωση του Nernst εφαρμόζεται σε όλα τα θερμοδυναμικώς αντιστρεπτά συστήματα, αλλά μια ισοδύναμη έκφραση η οποία περιλαμβάνει τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων εφαρμόζεται σε όλες τις οξειδώσεις και τις αναγωγές.

Το δυναμικό μισού κύματος εξαρτάται από το pH και δίνεται από τη σχέση:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} + \frac{RT}{nF} \ln C_{\text{H}^+} \quad (4.13)$$

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - (p) \frac{RT}{nF} \text{pH} \quad (4.14)$$

Για θερμοδυναμικά μη αντιστρεπτή διαδικασία η εξίσωση γίνεται:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - (p) \frac{RT}{\alpha nF} \text{pH} \quad (4.15)$$

Όπου  $0 < \alpha < 1$

Έτσι φαίνεται ότι το δυναμικό μισού κύματος για την αναγωγή ή την οξείδωση μιας ουσίας μετατοπίζεται σταθερά ανά μονάδα pH, και εξαρτάται από τον αριθμό των υδρογονοκατιόντων και των ηλεκτρονίων στο στάδιο που καθορίζει το δυναμικό. Για αναγωγή το δυναμικό μετατοπίζεται σε αρνητικότερα δυναμικά με αύξηση του pH, οπότε η αναγωγή γίνεται δυσκολότερα, ενώ και στην οξείδωση συμβαίνει το ίδιο, οπότε αυτή γίνεται ευκολότερα.

Η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων συνήθως δεν προϋποθέτει υδρογονοκατιόντα αλλά η σταθερότητα πολλών συμπλόκων τα οποία σχηματίζονται μεταξύ κατιόντος και συμπλεκτικού μέσου (ligand) εξαρτάται από το pH, γι' αυτό απαιτείται η παρουσία ρυθμιστικών συστημάτων.

#### 4.6.3 Επίδραση συμπλεκτικών μέσων

Όταν σχηματίζεται σταθερότερη χημική οντότητα μεταξύ του μεταλλικού ιόντος και ενός συμπλεκτικού μέσου (ligand) στο διάλυμα, τότε εκλύεται ένα ποσό ενέργειας. Αυτό το επιπλέον ποσό ενέργειας πρέπει να επιστραφεί στο ιόν για την απομάκρυνση του συμπλεκτικού μέσου (ligand) [122]. Αυτή η επιπλέον ενεργειακή απαίτηση εκφράζεται με αύξηση (σε αρνητικότερα δυναμικά), τόσο του δυναμικού της αναγωγής, όσο και του δυναμικού μισού κύματος του πολαρογραφικού κύματος.

Αν το συμπλεκτικό μέσο είναι σε ικανοποιητική περίσσεια, έτσι ώστε το ιόν  $M^{n+}$  να είναι επαρκώς συμπλεγμένο ως  $MI_q$ , τότε η μετατόπιση του δυναμικού δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E_{1/2} = -(RT/nF)\ln K_q - qRT/nF \ln C_L \quad (4.16)$$

Σε μερικές περιπτώσεις το πολαρογραφικό κύμα είναι δυνατό να οφείλεται σε μεταβολή της βαθμίδας οξείδωσης του μεταλλικού ιόντος και όχι σε αναγωγή του στη στοιχειακή μεταλλική μορφή π.χ. αναγωγή του  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ . Αν η οξειδωμένη μορφή σχηματίζει σταθερότερη χημική οντότητα με τον υποκαταστάτη, τότε το δυναμικό μισού κύματος μετατοπίζεται σε αρνητικότερα δυναμικά. Το αντίθετο συμβαίνει αν η σταθερότερη χημική οντότητα σχηματίζεται με την ανηγμένη μορφή. Αν το προϊόν της ηλεκτρόλυσης σχηματίζει σταθερότερη χημική οντότητα, τότε η ηλεκτρόλυση διευκολύνεται, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η ηλεκτρόλυση δυσχεραίνεται.

#### 4.6.4 Επίδραση χρόνου και δυναμικού προσρόφησης

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της προσυγκέντρωσης το προσδιοριζόμενο συστατικό προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οπότε, όπως είναι προφανές, μεγάλοι χρόνοι προσυγκέντρωσης οδηγούν σε αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, δεν συνιστώνται, όμως, γιατί οδηγούν σε απώλεια της αναλογικότητας μεταξύ του τελικού σήματος και της προσυγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού [123]. Ο χρόνος



προσυγκέντρωσης είναι προτιμότερο να ρυθμίζεται, ώστε μόνο το 2% του συστατικού που προσδιορίζεται να προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

#### 4.6.5 Επίδραση αλάτων

Στο τελικό διάλυμα που πρόκειται να αναλυθεί είναι δυνατό να υπάρχουν μεγάλες ποσότητες αλάτων που προέρχονται είτε από το ίδιο το δείγμα, είτε από την προσθήκη οξέων, κατά το στάδιο της πέψης του δείγματος ή κατά το διαχωρισμό της ουσίας, που εξουδετερώνεται πλήρως ή μερικώς με προσθήκη κάποιου ηλεκτρολύτη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μεταβάλλουν το ιξώδες του διαλύματος οπότε σύμφωνα με το νόμο των Stokes-Einstein μεταβάλλεται ο συντελεστής διάχυσης:

$$D \cdot n = \text{σταθερό} \quad (4.17)$$

Όπου  $D$  =συντελεστής διάχυσης και  $n$  =ιξώδες.

Στην ιχνοανάλυση υπάρχει πάντα μια βέλτιστη συγκέντρωση αλάτων, η οποία, αν ξεπεραστεί, έχει ως αποτέλεσμα την έλαττωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού.

#### 4.6.6 Επίδραση τασενεργών ουσιών και οργανικών διαλυτών

Οι τασενεργές ουσίες, οι οποίες είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με το δείγμα, είτε ως ακαθαρσίες, είτε λόγω της φύσης του δείγματος, κατά τη διάρκεια της ηλεκτρόλυσης τείνουν να προσροφώνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, είναι δυνατόν επίσης να βρίσκονται παρούσες σε μεγάλες συγκεντρώσεις, οπότε εμποδίζουν μηχανικά τη διάχυση του προσδιοριζόμενου συστατικού προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου [122]. Πάντως, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό επηρεάζοντας τις ηλεκτροδιακές δράσεις κατά τη διάρκεια της αναδιάλυσης. Το μέγεθος καθώς και η φύση αυτών των επιδράσεων εξαρτάται από το είδος των τασενεργών ουσιών (ανιονικές, κατιονικές ή ουδέτερες) και από την ουσία που μελετάται.

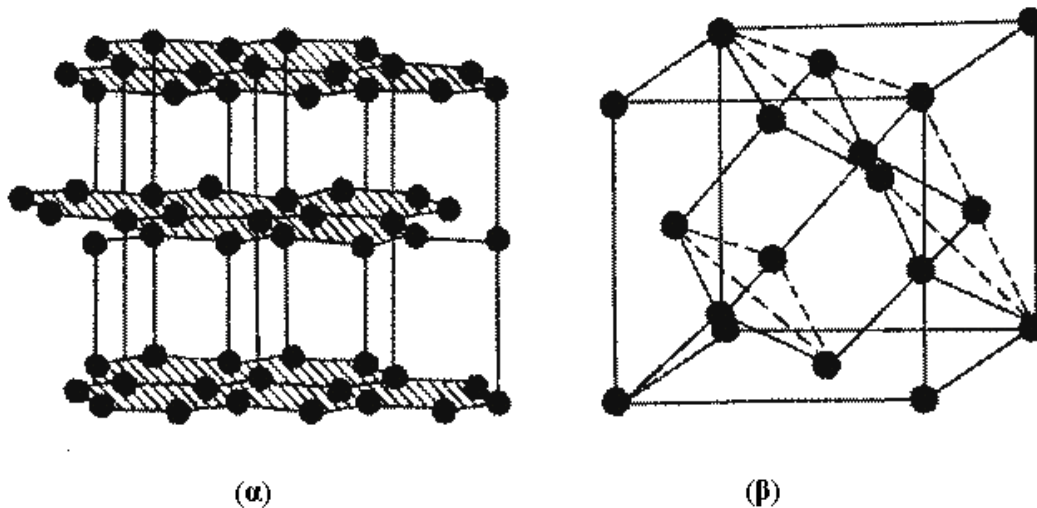
Το αποτέλεσμα είναι συνήθως ελάττωση του βολταμμετρικού σήματος, καθώς επίσης και μετατόπισή του σε θετική κατεύθυνση, είτε ακόμη παραμόρφωση του βολταμμογραφήματος και σχάση των κορυφών. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η ταυτοποίηση των κορυφών πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο των σταθερών προσθηκών.

Η επίδραση των οργανικών διαλυτών είναι ανάλογη μ' αυτή των αλάτων και των τασενεργών ουσιών, επιπλέον μεταβάλλουν το ιξώδες του συστήματος και επομένως το συντελεστή διάχυσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

## 5. NANOΪΛΙΚΑ

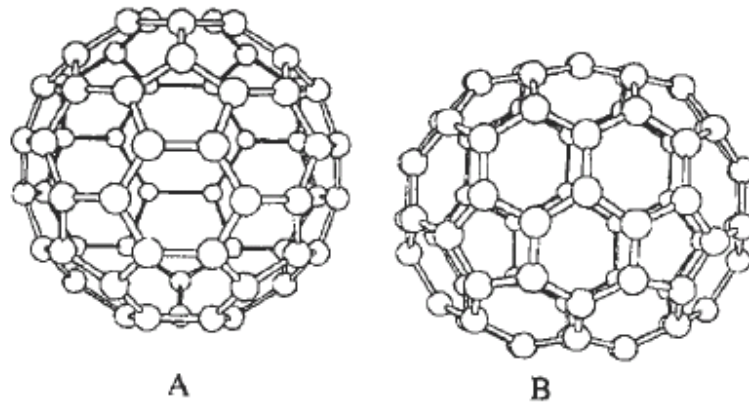
### 5.1 ΟΙ ΑΛΛΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ-NΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Ο άνθρακας υπάρχει στην φύση σε δύο αλλοτροπικές κρυσταλλικές μορφές (allotropic crystalline form), ως γραφίτης και ως διαμάντι. Ο γραφίτης αποτελείται από επίπεδα με άτομα από άνθρακα σε  $sp^2$  υβριδισμό σχηματίζοντας τη χαρακτηριστική δομή του Σχήματος 5.1α. Οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο είναι δυνατοί και άκαμπτοι, κάνοντας, έτσι, ένα υλικό που μπορεί να παραμείνει σε στερεά κατάσταση (απουσία οξυγόνου) μέχρι και τους  $3300^{\circ}\text{C}$ . Οι δεσμοί, αντίθετα, που ενώνουν άτομα άνθρακα μεταξύ δύο επιπέδων είναι ασθενείς τύπου van der Waals, με χαμηλή αντίσταση στη διάτμηση. Το διαμάντι αποτελείται από άτομα άνθρακα σε  $sp^3$  υβριδισμό δημιουργώντας δεσμούς ισοδύναμα άκαμπτους και με μεγάλη αντοχή (Σχήμα 5.1β). Είναι ικανό να αντέξει μέχρι τους  $1800^{\circ}\text{C}$  πέραν των οποίων μετατρέπεται σε γραφίτη, λόγω της μεγάλης ενεργειακής σταθερότητας του  $sp^2$  υβριδισμού πέρα από αυτή τη θερμοκρασία [128].



Σχήμα 5.1. : (α) Γραφίτης και (β) Διαμάντι.

Ο γραφίτης και το διαμάντι όμως δεν είναι οι μόνες αλλοτροπικές κρυσταλλικές μορφές του άνθρακα. Το 1985, κατά την εκπομπή μιας δέσμης laser σε γραφίτη κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, δημιουργήθηκε μια νέα αλλοτροπική μορφή του άνθρακα γνωστή ως φουλερένιο (fullerene). Τα μόρια των φουλερενίων απαρτίζονται από ένα δίκτυο ατόμων άνθρακα στην  $sp^2$  κατάσταση σε πεντάγωνα και εξάγωνα με αποτέλεσμα να σχηματίζουν ένα σφαιρικό μόριο. Το πιο κοινό μόριο φουλερενίων είναι αυτό που απαρτίζεται από 60 άτομα άνθρακα ( $C_{60}$ ) και φαίνεται στο Σχήμα (5.2)



**Σχήμα 5.2:** Φουλερένια A)  $C_{60}$  και B)  $C_{70}$ .

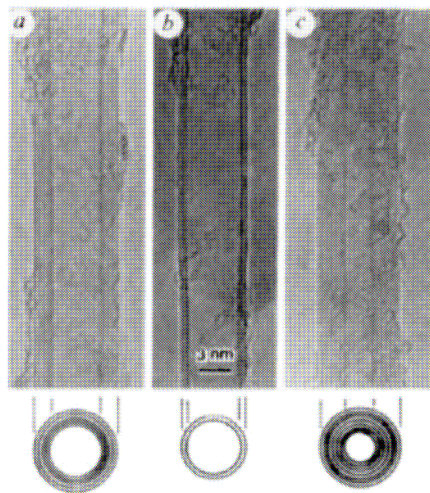
Το 1991 και κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής ερευνών για τα φουλερένια ανακαλύφθηκε και μια άλλη νέα αλλοτροπική μορφή του άνθρακα, οι νανοσωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes).

## 5.2 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ

Η ανακάλυψη ότι ο άνθρακας μπορεί να σχηματιστεί και σε άλλες σταθερές μορφές, εκτός του γραφίτη και του διαμαντιού παρακίνησε τους ερευνητές παγκοσμίως να

ψάξουν για νέες μορφές του άνθρακα. Η ανακάλυψη σωληνοειδών αλλοτροπικών μορφών του άνθρακα με μεγάλη αναλογία μήκους/διαμέτρου ονομάστηκε νανοσωλήνας. Η έρευνα αυτή έδωσε μια νέα ώθηση, όταν το 1990 έδειξε ότι το C<sub>60</sub> μπορούσε να παραχθεί από μια απλή συσκευή εξάτμισης, μέσω ηλεκτρικού τόξου και να είναι άμεσα διαθέσιμο σε όλα τα εργαστήρια. Χρησιμοποιώντας ένα τέτοιο εξάτμιστή, ο Ιάπωνας επιστήμονας Sumio Iijima, ανακάλυψε τους νανοσωλήνες άνθρακα το 1991.

Πρέπει να αναφερθεί ότι, πριν από τον Iijima, τουλάχιστον δύο άρθρα είχαν δημοσιευτεί, στα οποία γίνονταν αναφορά για την ύπαρξη μιας διαφορετικής δομής του. Το 1952 οι Radushkevich και Lukyanovich δημοσίευσαν στο περιοδικό *Journal of Physical Chemistry* καθαρές εικόνες νανοσωλήνων άνθρακα διαμέτρου 50 nm. Παρ' όλα αυτά η ανακάλυψη αγνοήθηκε καθώς το άρθρο δημοσιεύτηκε στη ρωσική γλώσσα και αυτές οι δομές του άνθρακα δε μελετήθηκαν περαιτέρω από τους συγκεκριμένους ερευνητές, καθώς η δημιουργία των νανοσωλήνων προήλθε τυχαία ύστερα από πειράματα που έκαναν με το μεθάνιο.



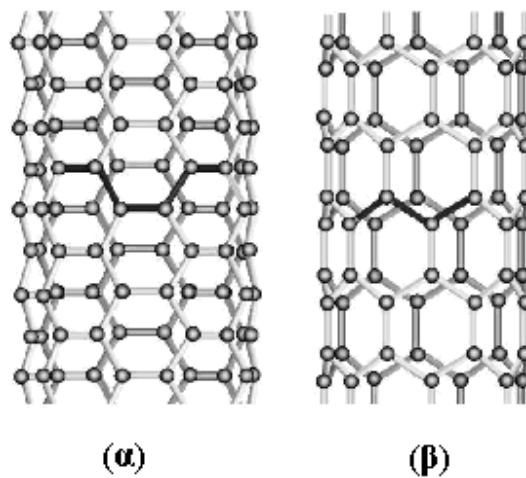
**Σχήμα 5.3.** Πρώτες εικόνες νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων από τον Sumio Iijima, που δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *Nature* το Νοέμβριο του 1991.

## 5.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ

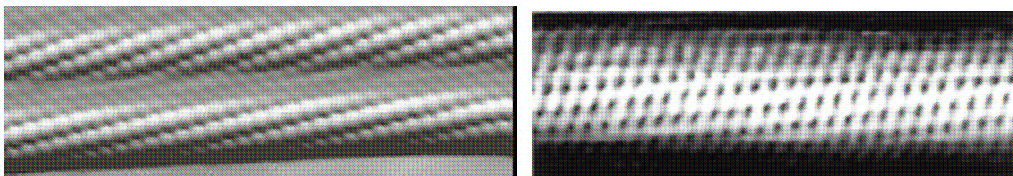
### 5.3.1 Δομή των νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs)

Κάθε νανοσωλήνας άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNT: single-wall nanotubes) μπορεί να απεικονιστεί σχηματικά από ένα φύλλο γραφενίου, το οποίο τυλίγεται προς σχηματισμό κυλίνδρου προσέχοντας, έτσι, ώστε οι εξαγωνικοί δακτύλιοι του γραφενίου κατά το κλείσιμο του κυλίνδρου να έρχονται σε συνεκτική επαφή μεταξύ τους. Το κλείσιμο των άκρων γίνεται με το ημισφαίριο μορίου φουλερενίου που φέρει την κατάλληλη διάμετρο.

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να τυλιχθεί ένα γραφένιο σε νανοσωλήνα μονού τοιχώματος. Μερικοί νανοσωλήνες παρουσιάζουν συμμετρία παράλληλα και κάθετα με τον άξονα του νανοσωλήνα, όπως είναι οι zig-zag και οι armchair, ενώ άλλοι όχι, όπως είναι οι ελικοειδείς νανοσωλήνες (helical ή Chiral).



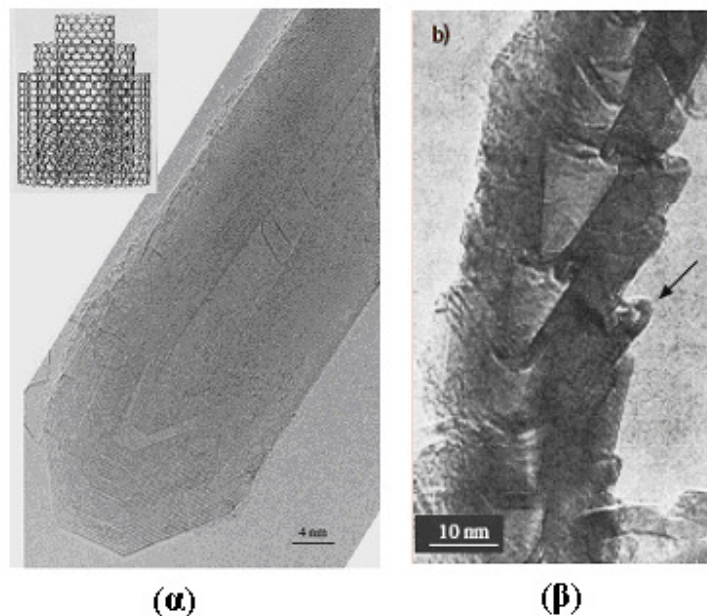
Σχήμα 5.4. α) νανοσωλήνας τύπου *armchair* β) νανοσωλήνας τύπου *zig-zag*.



Σχήμα 5.5. Εικόνες από STM που δείχνουν την δομή ελικοειδών νανοσωλήνων.

### 5.3.2 Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (MWNTs)

Η κατασκευή νανοσωλήνων πολλαπλού τοιχώματος είναι περισσότερο πολύπλοκη, καθώς έχει να κάνει με τους διάφορους τρόπους με τους οποίους το γραφένιο οργανώνεται και απεικονίζεται σε μια νηματοειδή μορφολογία. Ο ευκολότερος τρόπος απεικόνισης ενός MWNT (Multiwall Nanotube) είναι η ομόκεντρη απεικόνιση πολλών SWNT με διαφορετική διάμετρο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.6 (c-MWNT).



**Σχήμα 5.6.** α) TEM εικόνα νανοσωλήνα c-MWNT παρασκευασμένου με τη μέθοδο του ηλεκτρικού τόξου. β: TEM εικόνα νανοσωλήνα τύπου ψαροκόκκαλου.

Ο αριθμός των τοιχωμάτων μπορεί να είναι οποιοσδήποτε, ξεκινώντας από δύο. Η απόσταση μεταξύ των τοιχωμάτων είναι προσεγγιστικά ίδια με την απόσταση των στρωμάτων γραφενίου σε διαστρωματικά πολυαρωματικά στερεά και ισούται με 0,34 nm. (η απόσταση των στρωμάτων του γραφίτη είναι 0,35 nm), καθώς λόγω της καμπυλότητας των νανοσωλήνων, τα άτομα του άνθρακα δεν απεικονίζονται με τον ίδιο

τρόπο όπως στον γραφίτη. Κάθε τοίχωμα έχει την δική του ελίκωση, ενώ τα τοιχώματα συγκρατούνται μεταξύ τους με δυνάμεις van der Waals.

Ένας άλλος τύπος MWNT είναι του τύπου ψαροκόκκαλου (herringbone) (h-MWNT), στον οποίο τα γραφένια σχηματίζουν γωνία σε σχέση με τον άξονα του νανοσωλήνα, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.6. Η γωνία ποικίλλει και κυμαίνεται από  $0^\circ$  (όπου έχουμε τους c-MWNT) έως  $90^\circ$ , όπου πλέον ο σωλήνας χάνει τη σωληνοειδή μορφή του και μετασχηματίζεται σε νανο-ίνα.

## **5.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ**

### **5.4.1 Ηλεκτρικές ιδιότητες**

Οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να είναι μεταλλικοί ή ημιαγωγοί. Συγκεκριμένα για τους νανοσωλήνες μονού τοιχώματος ισχύει, ότι όλοι οι τύπου armchair εμφανίζουν μεταλλική συμπεριφορά, οι υπόλοιποι μπορούν να είναι είτε ημιαγωγοί με πολύ μικρό ενεργειακό χάσμα (ή ημιμέταλλα), είτε ημιαγωγοί. Η κατηγοριοποίηση αυτή προφανώς σχετίζεται άμεσα και με την αγωγιμότητα του υλικού.

Η αγωγιμότητα στα μέταλλα οφείλεται στο ελεύθερο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας, το οποίο έχει τη δυνατότητα κίνησης μέσα στο υλικό. Ωστόσο, λόγω των περιορισμών κίνησης που υπάρχουν μέσα στο υλικό, έχουμε τις σκεδάσεις, οι οποίες προκαλούν και την αύξηση της θερμοκρασίας του. Στην περίπτωση των νανοσωλήνων, ένα μόνο από τα τέσσερα άτομα της εξωτερικής στοιβάδας του ατόμου του άνθρακα κινείται στο πλέγμα. Λόγω της γεωμετρίας του σωλήνα περιορίζεται η δυνατότητα κίνησης του ηλεκτρονίου μόνο κατά την αξονική κατεύθυνση του σωλήνα, πράγμα που περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τις συγκρούσεις ηλεκτρονίων (σκέδαση), με αποτέλεσμα την αυξημένη αγωγιμότητα των νανοσωλήνων και παράλληλα τη μικρή αύξηση θερμοκρασίας τους, σε αντίθεση με τα μέταλλα [129].



#### **5.4.2 Θερμικές ιδιότητες**

Εξίσου ενδιαφέρουσες με τις ηλεκτρικές ιδιότητες είναι και οι θερμικές ιδιότητες και γενικά η θερμική συμπεριφορά των νανοσωλήνων. Έτσι και σ' αυτήν την περίπτωση τα φαινόμενα, λαμβάνουν χώρα κατά μήκος του άξονα των CNTs και συνεπώς, όπως είδαμε και στις ηλεκτρικές ιδιότητες, η θερμική αγωγιμότητα σε αυτήν την κατεύθυνση είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι προς οποιαδήποτε άλλη.

Η θερμική ενέργεια στους νανοσωλήνες μεταφέρεται ουσιαστικά σε κύματα. Στα υλικά που θεωρούνται καλοί αγωγοί της θερμότητας, τα κύματα αυτά κινούνται πολύ γρήγορα σε μια μονοδιάστατη κατεύθυνση. Διαπιστώθηκε ότι τα θερμικά κύματα, που φέρουν θερμική ενέργεια, κινούνται μέσα στους νανοσωλήνες με ταχύτητα της τάξης των 10000m/sec, πράγμα που συνάδει με πολύ υψηλή θερμική αγωγιμότητα [129].

#### **5.4.3 Μηχανικές ιδιότητες**

Στον γραφίτη και στους νανοσωλήνες άνθρακα , τρία είδη δυνάμεων μεταξύ των ατόμων άνθρακα είναι υπεύθυνα για τις ελαστικές τους ιδιότητες :οι  $\sigma$  και οι  $\pi$  δέσμοι που αναπτύσσονται μεταξύ των ενδομοριακών δεσμών C=C, καθώς και οι ασθενείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Από τη στιγμή που ο  $\sigma$  δεσμός είναι ο πιο ισχυρός χημικός δεσμός στη φύση, ένας νανοσωλήνας άνθρακα θεωρείται ως η πιο ισχυρή ίνα όσον αφορά στη δύναμη κατά μήκος του άξονά του. Πειραματικοί υπολογισμοί, που έρχονται σε συμφωνία με τους θεωρητικούς υπολογισμούς που έχουν προταθεί, δείχνουν ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι πιθανόν το πιο σκληρό υλικό στη φύση, ίσως πιο σκληρό και από το διαμάντι [130].

### **5.6 Η NANOTEXNOLOGIA ΣΤΟΥΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ DNA**

Η νανοεπιστήμη και η νανοτεχνολογία αφορούν στη σύνθεση, στο χαρακτηρισμό, στην εξερεύνηση, στο χειρισμό και στη χρησιμοποίηση των νανοδομημένων υλικών, τα οποία χαρακτηρίζονται ως νανοϋλικά, με το να είναι τουλάχιστον μια διάσταση τους μικρότερη από 100 nm. Μεμονωμένες νανοδομές περιλαμβάνουν συστάδες, νανοσωματίδια,

νανοκρυστάλλους, κβαντικές τελείες, νανοσύρματα και νανοσωλήνες, ενώ η ομαδοποίησή τους περιλαμβάνει συστοιχίες, και υπερπλέγματα των μεμονωμένων νανοδομών [102].

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά από άνθρακα, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοϊνες, τα φουλερένια και τα διαμάντια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή των DNA βιοαισθητήρων. Πράγματι, η σύζευξή τους με το DNA αποτέλεσε το αντικείμενο του ενδιαφέροντος πολλών ερευνητών, με αποτέλεσμα τα νανοσωματίδια να έχουν βρει εφαρμογές σε καινούριες ηλεκτρονικές συσκευές, σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων, σε βιοϋλικά και στη βιοϊατρική.

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας αποτελεί μια ισχυρή εναλλακτική λύση των κοινών στρατηγικών για τη δημιουργία μικρότερου μεγέθους, ταχύτερων και λιγότερο δαπανηρών ηλεκτροχημικών συσκευών για την ανίχνευση του DNA-στόχου. Με την εφαρμογή των διαφόρων νανοϋλικών που δρουν είτε ως νανοηλεκτρόδια είτε ως υποστρώματα ακινητοποίησης για την προσρόφιση αυξημένων ποσοτήτων DNA είτε ως ενισχυτές σήματος του ίδιου του φαινομένου της υβριδοποίησης, έχει επιτευχθεί η υψηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση του DNA-στόχου.

Ο κύριος στόχος της εφαρμογής των νανοϋλικών στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες DNA είναι η βελτίωση της ακινητοποίησης των μορίων του DNA, η ενίσχυση της μοριακής αναγνώρισης, αλλά και η ενίσχυση του σήματος μετάλλαξης. Αν και το κυριότερο πλεονέκτημα των νανοδομημένων υλικών είναι το μεγάλο εμβαδόν της επιφάνειάς τους, η χημική τροποποίηση των υλικών αυτών από διάφορα ένζυμα και ηλεκτροενεργά μόρια (μεσολαβητές, δείκτες), οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις στην ηλεκτροχημική ανίχνευση.

Συνήθως, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) καταδεικνύουν μια εξαιρετική βιοσυμβατότητα και προσφέρουν ένα περιβάλλον, το οποίο είναι κατάλληλο για την ακινητοποίηση βιολογικών συστατικών, ενώ επιπλέον ο υψηλός λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο συνεπάγεται και την αυξημένη συσσώρευση των βιομορίων. Γι' αυτό, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή αισθητήρων και βιοαισθητήρων.

Το κύριο πρόβλημα στο χειρισμό και την εφαρμογή των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) είναι η μη διαλυτότητά τους σε υδατικά και πολικά μέσα. Σε ένα τέτοιο

περιβάλλον, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) έχουν την τάση να συσσωματώνονται λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και των ισχυρών ελκτικών Van der Waals δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Ωστόσο, η διασπορά των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια ποικιλία μεθόδων :

- Επίδραση οξειδωτικών μέσων (αντίδραση επαναρροής με αραιωμένο νιτρικό οξύ ( $\text{HNO}_3$ ))
- Μη ομοιοπολική σταθεροποίηση σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες (π.χ., διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ή χρησιμοποιώντας τασενεργές ουσίες (δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), Nafion) και ζ-κυκλοδεξτρίνη
- Ομοιοπολική σταθεροποίηση (με γλυκόζη, DNA, ένζυμα)

Στους βιοαισθητήρες DNA με νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), το DNA είναι γενικά ακινητοποιημένο, πάνω στους νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) με δύο τρόπους : μη ομοιοπολική σύνδεση (φυσική προσρόφηση και παγίδευση) και ομοιοπολική σύνδεση.

Ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα και άλλων σύνθετων υλικών παρουσιάζουν ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων έναντι άλλων ηλεκτροδίων εργασίας, όπως το χαμηλό ρεύμα υποβάθρου και την εύκολη αναγέννησή τους. Για το λόγο αυτό σύνθετα υλικά που βασίζονται στη χρήση των νανοσωλήνων άνθρακα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Μια ποικιλία συνδετικών υλικών, όπως το ορυκτέλαιο ή το παραφινέλαιο, το Teflon και το βρωμοφόρμιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) ή και διάφορων άλλων σύνθετων υλικών.

Ο Pedano και οι συνεργάτες του [131] μελέτησαν την προσρόφηση και την ηλεκτροοξείδωση της ελεύθερης γουανίνης και αδενίνης, ολιγονουκλεοτιδίων και πολυνουκλεοτιδίων σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) και πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (carbon nanotubes paste electrode, CNTPE) χρησιμοποιώντας προσροφητική ποτενσιομετρία αλλαγής μέσου. Τα ηλεκτρόδια εργασίας παρασκευάστηκαν με ανάμιξη σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) και ορυκτού ελαίου. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι (1) η ελεύθερη γουανίνη μπορεί να προσροφηθεί σε ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTPE) σε συνθήκες που σε ένα συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα δε θα ήταν συμβατές. Στην περίπτωση της αδενίνης,

παρατηρείται προσρόφηση και στα δύο ηλεκτρόδια άνθρακα, ειδικά στο ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTPE) και ακόμη πιο έντονα σε αυτό που έχει υποστεί ηλεκτροχημική προκατεργασία (2). Ίχνη ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) των ολιγονουκλεοτιδίων και των πολυνουκλεοτιδίων μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν, έπειτα από πολύ μικρούς χρόνους ακινητοποίησης με όρια ανίχνευσης ( $c_L$ )  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  για ένα ολιγονουκλεοτίδιο 21 βάσεων και  $170 \mu\text{g L}^{-1}$  για δίκλωνο DNA από θύμο αδένα βοειδούς (dsDNA) (3). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων και του ηλεκτροδίου πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTPE) παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα και οι προσροφημένες στιβάδες των νουκλεϊκών οξέων αποδεικνύονται αρκετά σταθερές κατά την έκθεσή τους στον αέρα.

Ένα ηλεκτρόδιο πάστας με νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) αναπτύχθηκε από τους Qi et al [132]. Η αλληλουχία του DNA ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου διαμέσου του ηλεκτροπολυμερισμού της πολυπυρρόλης. Η ανίχνευση του υβριδισμού στηρίζεται στον εγκλωβισμό της αλληλουχίας του DNA μέσα στο υμένιο της πολυπυρρόλης που σχηματίζεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και στην παρακολούθηση των μεταβολών της έντασης της κορυφής, που οφείλονται στην οξειδωση του βρωμιούχου αιθιδίου (EB), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης, μετά τον υβριδισμό του DNA. Η κορυφή οξειδωσης του βρωμιούχου αιθιδίου (EB) αυξάνοταν γραμμικά με το λογάριθμο της συγκέντρωσης της συμπληρωματικής αλληλουχίας DNA από  $1,0 \times 10^{-10}$  έως  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Ένας ηλεκτροχημικός DNA βιοαισθητήρας για την ανίχνευση ενός γονιδίου διαγονιδιακών φυτών αναπτύχθηκε από τους Jiang et al [133]. Αρχικά η επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα (CPE) τροποποιήθηκε με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (SWNTs). Στη συνέχεια, υμένια πολυ-L-λυσίνης (pLys) σχηματίστηκαν στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου (SWNTs/CPE) με ηλεκτροπολυμερισμό της L-λυσίνης και με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας (CV), οπότε προέκυψε το τελικό ηλεκτρόδιο εργασίας (pLys/SWNTs/CPE). Η ακινητοποίηση της αλληλουχίας DNA στο υμένιο της πολυ-L-λυσίνης πραγματοποιήθηκε εύκολα λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής συγγένειας μεταξύ τους. Το φαινόμενο του υβριδισμού μελετήθηκε με ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) με τη χρήση του σιδηρικού ανιόντος

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ως δείκτη. Ο βιοαισθητήρας, ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του γονιδίου από ακετυλοτρανσφεράση φωσφινοθρισίνης (PAT) με όριο ανίχνευσης  $3,1 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ , χαρακτηρίζεται από απλότητα, καλή σταθερότητα, επιλεκτικότητα και υψηλή ευαισθησία

Ενσωμάτωση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με νανοΐνες πολυανιλίνης (PANI) σε ένα υμένιο χιτοζάνης (Chit) για την κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα με υψηλή ευαισθησία, για την ανίχνευση αλληλουχίων DNA πραγματοποιήθηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του [134]. Το σύνθετο αυτό υλικό που προέκυψε (PANI-MWNT/CHIT) χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση της επιφάνειας ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα (CPE). Η ακινητοποίηση του ανιχνευτή DNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ήταν βελτιωμένη λόγω του συνεργιστικού φαινομένου των νανοϊνών της πολυανιλίνης (PANI) και των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs). Λόγω της υψηλής ικανότητας μεταφοράς ηλεκτρονίων των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) και των εξαιρετικών αντιστρεπτών οξειδοαναγωγικών κέντρων των νανοϊνών της πολυανιλίνης (PANI), το ηλεκτρόδιο παρουσιάζει αυξημένη αγωγιμότητα. Ο βιοαισθητήρας εφαρμόστηκε στην ευαίσθητη ανίχνευση των ειδικών αλληλουχιών DNA των διαγονιδιακών γονιδίων σε γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες, όπως το γονίδιο της ακετυλοτρανσφεράσης της φωσφινοθρισίνης (PAT) και το γονίδιο της συνθάσης της νοπαλίνης (NOS). Ο υβριδισμός μελετήθηκε με ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) χωρίς δείκτη. Τα όρια ανίχνευσης ( $c_L$ ) για το γονίδιο της ακετυλοτρανσφεράσης της φωσφινοθρισίνης (PAT) ήταν  $2,7 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$ . Η ανίχνευση του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης (NOS) ήταν, επίσης, ικανοποιητική.

Ένα ηλεκτρόδιο πάστας αποτελούμενο από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και βισμούθιο (BCNE), αναπτύχθηκε από τον Ly και την ομάδα του [135] για τη βολταμμετρική ανίχνευση του *Helicobacter pylori* DNA. Με τη βοήθεια της αναδιαλυτικής κυκλικής βολταμμετρίας (CV), κατά την καθοδική σάρωση του δυναμικού, καταγράφηκε μια κορυφή στα 0,4 V, ενώ η βέλτιστη διαγνωστική περιοχή εργασίας συγκεντρώσεων, με τη χρήση της βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (SW) επιτεύχθηκε από 0,72 έως  $7,92 \mu\text{g mL}^{-1}$  *Helicobacter pylori* DNA. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες, το όριο ανίχνευσης ήταν  $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ο διαγνωστικός αυτός βιοαισθητήρας

εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανίχνευση των ιχνών *Helicobacter pylori* DNA σε ασθενείς που νοσούν από γαστρίτιδα και πεπτικό έλκος.

Νανοσωλήνες άνθρακα ενεργοποιημένοι με καρβοξυλικές ομάδες (c-CNT) χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση της επιφάνειας ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα (CPE) με σκοπό το σχηματισμό ενός πρόδρομου αγώγιμου υμενίου [136]. Στη συνέχεια, θετικά φορτισμένη πολυ-L-λυσίνη (pLys) και αρνητικά φορτισμένο δίκλωνο DNA (dsDNA) προσροφώνται εναλλάξ στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου (c-CNT/CPE), σχηματίζοντας διαδοχικά στρώματα πολυ-L-λυσίνης (pLys) και δίκλωνου DNA (pLys/dsDNA)<sub>n</sub>. Η φύση των αναπτυσσόμενων πολυστρωματικών υμενίων χαρακτηρίζεται από κυκλική βολταμμετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) του ηλεκτροενεργού δείκτη  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV), με το ιώδες του μεθυλενίου (MV) ως δείκτη, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA, που προκαλείται από ιόντα καδμίου ( $\text{Cd}^{2+}$ ).

Αξιοποιώντας τις εξαιρετικές ιδιότητες της φθαλοκυανίνης του κοβαλτίου (CoPc) και των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs), ο Balan και η ερευνητική του ομάδα [137] κατασκεύασαν ένα νέο ηλεκτρόδιο πάστας για τον προσδιορισμό της γουανίνης. Η τροποποίηση ενός ηλεκτροδίου πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (CNTPE) με την φθαλοκυανίνη του κοβαλτίου (CoPc) οδηγεί στην ενίσχυση της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης, συγκριτικά με το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο. Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά της γουανίνης στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (CoPc-CNTPE) είναι μια διεργασία ελεγχόμενη από φαινόμενα προσρόφησης, στην οποία συμμετέχουν δύο ηλεκτρόνια και δύο πρωτόνια. Όριο ανίχνευσης ίσο με  $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  επιτεύχθηκε για τη γουανίνη χρησιμοποιώντας το σήμα της ηλεκτροκαταλυτικής οξείδωσης που αντιστοιχεί στην Co(II)/Co(III) οξειδοαναγωγική δράση. Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εφαρμόστηκε, επίσης, για τον προσδιορισμό του μονόκλωνου DNA με βολταμμετρία διαφορικού παλμού με όριο ανίχνευσης ίσο με  $9,86 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Νανοϊνες πολυανιλίνης (PANI) χρησιμοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Zhou [138], ως ένα είδος υλικού εμπλουτισμού για την προετοιμασία ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα (PANnano / CPE) προσφέροντας μια εξαιρετική επιφάνεια συγγένειας για την ακόλουθη ακινητοποίηση του υβριδίου νανοσωλήνων άνθρακα και

νανοσωματιδίων χρυσού (Aunano-CNT). Η ακινητοποίηση και ο υβριδισμός του ανιχνευτή DNA για τα υμένα νανοσωματιδίων χρυσού, νανοσωλήνων άνθρακα και νανοϊνών πολυανιλίνης (Aunano-CNT/PANnano) ερευνήθηκαν με βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) και κυκλική βολταμμετρία (CV) με χρήση του κυανού του μεθυλενίου (MB) ως δείκτη και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS), χρησιμοποιώντας το σιδηρικούανυούχο ιόν  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ως οξειδοαναγωγικό δείκτη. Η ειδική αλληλουχία DNA των διαγονιδιακών γονιδίων σε γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες, όπως το γονίδιο της ακετυλοτρανσφεράσης της φωσφινθορικής (PAT) και το γονίδιο της συνθάσης της νοπαλίνης (NOS), έπειτα από πολλαπλασιασμό του με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), από ένα διαγονιδιακό-τροποποιημένο δείγμα φασιολίου ανιχνεύονται ικανοποιητικά με την προτεινόμενη μέθοδο ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) χωρίς τη χρήση δείκτη. Στις βέλτιστες συνθήκες, το όριο ανίχνευσης για το θραύσμα του γονιδίου PAT ήταν  $5.6 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ .

Η τροποποίηση ενός ηλεκτροδίου πάστας νανοσωλήνων άνθρακα αναμεμιγμένων με DNA και ορυκτό έλαιο (BIDCE) με βόεια ανοσοαιμοσφαιρίνη (IgG) έχει αναφερθεί από τον Ly και τους συνεργάτες του [139]. Η βόεια ανοσοαιμοσφαιρίνη IgG ακινητοποιήθηκε με κυκλική βολταμμετρία (CV), ενώ οι βέλτιστες αναλυτικές συνθήκες για τον ανοσοαισθητήρα (BIDCE) προσδιορίστηκαν μέσω της βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (SW) και της κυκλικής βολταμμετρίας (CV). Ο ανοσοαισθητήρας χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού προσδιορισμού του ανθρώπινου ιού της ηπατίτιδας B (HBV). Επιπλέον, διαγνωστική εφαρμογή πραγματοποιήθηκε μέσω της άμεσης ανίχνευσης του ιού της ηπατίτιδας B (HBV) σε μη-επεξεργασμένο ανθρώπινο αίμα.

Μια από τις πιο δημοφιλείς προσεγγίσεις στην κατασκευή ηλεκτροδίων νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) είναι η τροποποίηση ηλεκτροδίων υαλώδους άνθρακα (GCEs). Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) αυξάνουν αποτελεσματικά την επιφάνεια και προσφέρουν ένα καλό περιβάλλον για την ακινητοποίηση του DNA στα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα [18].

Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (MWNTs-COOH) χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση ενός

ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) με σκοπό την ανίχνευση του υβριδισμού DNA [140]. Η ακινητοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου πραγματοποιήθηκε με την ομοιοπολική σύνδεση των 5'-αμινο ομάδων τους με τις καρβοξυλομάδες των νανοσωλήνων άνθρακα. Ο υβριδισμός μελετήθηκε με βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) χρησιμοποιώντας την ηλεκτροενεργή ένωση δαουνομυκίνη, η οποία παρεμβάλλεται, ως δείκτης. Ο αυξημένος ρυθμός ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και της δαουνομυκίνης αύξησε δραματικά τα όρια της ανίχνευσης στα  $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  συμπληρωματικού ολιγονουκλεοτιδίου.

Για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs), σε συνδυασμό με νανοσωματίδια παλλαδίου (Pd-NPs) χρησιμοποιήθηκαν από την ομάδα του Chang [141], για την τροποποίηση ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE). Τα ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, μέσω της ομοιοπολικής τους σύνδεσης με τις καρβοξυλικές ομάδες των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs). Το φαινόμενο του υβριδισμού μελετήθηκε με βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) χρησιμοποιώντας το κυανό του μεθυλενίου (MB) ως δείκτη. Καθώς οι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη επιφάνειά τους, αλλά και από την ικανότητά τους να προωθούν τη μεταφορά των ηλεκτρονίων, ενώ παράλληλα τα νανοσωματίδια παλλαδίου (Pd-NPs) παρουσιάζουν μεγάλη καταλυτική ικανότητα, η ευαισθησία του ηλεκτροχημικού βιοασθητήρα παρουσιάζεται αυξημένη. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για το ολιγονουκλεοτίδιο στόχο ήταν  $1,2 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ .

Η θειονίνη (Th) χρησιμοποιήθηκε ως διαμεσολαβητής φορτίου για την ακινητοποίηση DNA σε νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) από την ομάδα του Gong [142]. Ηλεκτρόδιο υαλώδες άνθρακα (GCE) χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο εργασίας έπειτα από την τροποποίηση της επιφάνειάς του με μίγμα DNA, θειονίνης (Th) και νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs). Το τελικό ηλεκτρόδιο (DNA-Th-CNTs/GC) εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και του γνωστού οξειδοαναγωγικού δείκτη  $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$  με κυκλική βολταμμετρία (CV). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο επέδειξε καλή ηλεκτροχημική απόκριση



και σταθερότητα και σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο DNA-CNTs/GC παρουσίασε βελτιωμένη ευαισθησία και επαναληψιμότητα.

Η υψηλή ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων της πολυθειονίνης (PTH) και η καλή καταλυτική δραστηριότητα των νανοσωματιδίων χρυσού (NPAu) συνδυάστηκαν από τον Liu και τους συνεργάτες του [143], για την κατασκευή ενός τροποποιημένου ηλεκτροδίου εργασίας (PTH / NPAu / MWNTs). Η κατασκευή του τροποποιημένου ηλεκτροδίου περιελάμβανε δύο στάδια: αρχικά, τα νανοσωματίδια χρυσού αναμίχθηκαν με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (NPAu / MWNTs) και εναποτέθηκαν στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE). Στη συνέχεια, η θειονίνη ηλεκτροπολυμερίστηκε στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου (NPAu / MWNTs). Το προκύπτον ηλεκτρόδιο, το οποίο έδειξε ενισχυμένη ηλεκτροκαταλυτική συμπεριφορά και καλή σταθερότητα, χρησιμοποιήθηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της γουανίνης και της αδενίνης με τη χρήση της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV). Το όριο ανίχνευσης για τη γουανίνη και την αδενίνη ήταν  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  και  $8,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Βασιζόμενη στην εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα οξείδωσης της γουανίνης και αδενίνης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου, η ερευνητική ομάδα ανέπτυξε, επίσης, μια μέθοδο για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων της γουανίνης και αδενίνης σε δίκλωνο DNA (dsDNA) από θύμο αδένος βοειδούς με πολύ καλά αποτελέσματα.

Ο συνδυασμός νανοσωματιδίων μετάλλου με ένα υμένιο αποτελούμενο από νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) και ένα αγώγιμο πολυμερές επέτρεψε την κατασκευή ενός επιτυχούς αισθητήρα υβριδισμού DNA [144]. Κατασκευάστηκε ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (MWCNTs-COOH) στην επιφάνεια των οποίων δημιουργήθηκε μια μεμβράνη από το πολυμερές πολυ(τρανς-3-(3-πυριδυλο) ακρυλικό οξύ) (PPAA) έπειτα από ηλεκτροπολυμερισμό με κυκλική βολταμετρία (CV) και στη συνέχεια νανοσωματίδια αργύρου ( $\text{Ag}_{\text{nano}}$ ) ηλεκτροαποτέθηκαν πάνω στην επιφάνειά του σύνθετου υμενίου PPAA/MWCNTs-COOH. Η αλληλουχία του DNA ακινητοποιείται πάνω στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αργύρου ( $\text{Ag}_{\text{nano}}$ ), μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης. Η βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του υβριδισμού

χρησιμοποιώντας την ηλεκτροενεργή ένωση αδριαμυκίνη ως δείκτη. Στις βέλτιστες συνθήκες, η αύξηση της κορυφής αναγωγής της αδριαμυκίνης ήταν γραμμική με το λογάριθμο της συγκέντρωσης των συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων με όριο ανίχνευσης  $3,2 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ . Ο αισθητήρας DNA παρουσίασε εξαιρετική επαναληψιμότητα, σταθερότητα και πολύ καλή δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης.

Η τροποποίηση ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) με ένα σύνθετο υμένιο αποτελούμενο από 2,6-πυριδινοδικαρβονικό οξύ (PDC) και νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (SWNTs) δημοσιεύτηκε από την ομάδα του Yang. [145]. Οι ανιχνευτές DNA με την αρνητικώς φορτισμένη φωσφορική ομάδα ακινητοποιούνται στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (PDC-SWNTs/GCE) μέσω του πολυ(διαλλυλο διμεθυλο χλωριούχου αμμωνίου) (PDDA). Η βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του υβριδισμού χρησιμοποιώντας το κυανό του μεθυλενίου (MB) ως δείκτη. Ο βιοαισθητήρας, ο οποίος χαρακτηρίστηκε από καλή επιλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ικανοποιητική ικανότητα αναγέννησης, και εφαρμόστηκε στην ανίχνευση των αλληλουχιών του γονιδίου της ακετυλοτρανσφεράσης της φωσφινοθρικίνης (PAT) και το ενισχυμένο με την τεχνική PCR πραγματικό δείγμα του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης (NOS). Στις βέλτιστες συνθήκες, το όριο ανίχνευσης για το DNA στόχο ήταν  $2,6 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ .

Ένα σύνθετο υμένιο (MWCNTs-PNF) από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και πολυ-νεοφουξίνη (PNF) συντέθηκε στην επιφάνεια ηλεκτροδίου υαλοειδούς άνθρακα (GCE), χρυσού (Au) και οξειδίου ινδίου-κασσιτέρου (ITO) με ποτενσιοστατικές μεθόδους για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης, της γουανίνης και της θυμίνης [146]. Η παρουσία του σύνθετου υμενίου (MWCNTs-PNF) αυξάνει την ηλεκτροενεργή επιφάνεια, την ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων και εμφανίζει επίσης αυξημένη ηλεκτροκαταλυτική δράση έναντι του μίγματος των υπό ανάλυση βιοχημικών ενώσεων. Οι ηλεκτροκαταλυτικές αποκρίσεις των αναλυτών στο απλό υμένιο (MWCNTs) και στο σύνθετο υμένιο (MWCNTs-PNF) μελετήθηκαν με τη χρήση της κυκλικής βολταμμετρίας (CV) και της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (DPV). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, πολύ καλά διαχωρισμένες βολταμμετρικές κορυφές καταγράφηκαν κατά την χρήση του σύνθετου υμενίου (MWCNTs-PNF) για

την αδενίνη, τη γουανίνη και τη θυμίνη με το διαχωρισμό κορυφών να είναι ίσος με 320,3 mV μεταξύ γουανίνης-αδενίνης και με 132,7 mV μεταξύ αδενίνης-θυμίνης. Τα όρια ανίχνευσης του σύνθετου υμενίου (MWCNTs-PNF) για την αδενίνη, τη γουανίνη και τη θυμίνη με την τεχνική της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού (DPV) είναι 218,18, 12,62 και 78,22  $\text{mAM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ , αντίστοιχα.

Ένας νέος βιοαισθητήρας υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) τρίτης γενιάς, ο οποίος βασίζεται στην ακινητοποίηση της υπεροξειδάσης της αγριοραπανίδας ή χρένου (HRP) στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GC) τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNTs) αναμεμιγμένων με DNA, αναπτύχθηκε και χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα του Zeng [147]. Το ηλεκτρόδιο εργασίας (HRP-DNA-SWCNTs/GC) έδειξε μια καλή ηλεκτροχημική δραστηριότητα στην αναγωγή του  $\text{H}_2\text{O}_2$  χωρίς την παρουσία μεσολαβητή μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας παρουσίασε ταχεία αμπερομετρική απόκριση, ευρεία γραμμική περιοχή, υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα, καλή αναπαραγωγικότητα και χαμηλό όριο ανίχνευσης και επίσης καλή εκλεκτικότητα

Ένας καινούριος αμπερομετρικός ανοσοαισθητήρας, για τον προσδιορισμό της α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (α-φετοσφαιρίνη, AFP), κατασκευάστηκε από πολλαπλά στρώματα αποτελούμενα από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs), πολυ(χλωριούχο διαλλυλο διμεθυλοαμμώνιο) (PDDA), DNA, θειονίνη (Th) και νανοσωματίδια χρυσού (νανο-Au) που εναποτέθηκαν στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) [148]. Η διαδικασία τροποποίησης χαρακτηρίστηκε με κυκλική βολταμμετρία (CV) και με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Στις βέλτιστες συνθήκες, ο ανοσοαισθητήρας έχει ένα σχετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης ίσο με  $0,04 \text{ ng mL}^{-1}$ , ενώ η εκλεκτικότητα, η επαναληψιμότητα και η σταθερότητα της προτεινόμενης μεθόδου χαρακτηρίστηκαν ως αποδεκτές.

Ένας ευαίσθητος ηλεκτροχημικός DNA βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του DNA στόχου σχεδιάστηκε από τον Zhang και τους συνεργάτες του [149]. Αρχικά, αμινοβενζοϊκό οξύ (ABA) ηλεκτροπολυμερίστηκε στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων, ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (MWCNTs), με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας (CV). Έπειτα, νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) εναποτέθηκαν

στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (ABA-MWCNTs) με την τεχνική της ηλεκτροχημικής εναπόθεσης. Τέλος, ο ανιχνευτής DNA ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) μέσω του δεσμού χρυσού-θείου (Au-S). Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), κυκλική βολτομετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η διαδικασία κατασκευής του υμενίου. Ο υβριδισμός παρακολούθηθηκε με βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV) και με τη χρήση της αδριαμυκίνης ως δείκτη. Στις βέλτιστες συνθήκες, το όριο ανίχνευσης των συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων ήταν  $3.5 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ . Επιπλέον, ο βιοαισθητήρας DNA παρουσίασε καλή σταθερότητα και επαναληψιμότητα.

Βλάβη στο DNA από *in situ* παραγόμενες ρίζες δισφαινόλης Α (BPA) μέσω ηλεκτρο-οξειδωσης ερευνήθηκε από την ομάδα του Qiu [150] σε ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC). Το τελευταίο τροποποιήθηκε από ένα μίγμα νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων, χιτοζάνη (MWNTs-chit) και δίκλωνο DNA (dsDNA). Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (dsDNA/MWNTs-Chit/GCE) χαρακτηρίστηκε με κυκλική βολταμετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μίγμα νανοσωλήνων άνθρακα και χιτοζάνης (MWNTs-chit) αντιπροσωπεύει μια ιδανική επιφάνεια για την ακινητοποίηση του DNA, διότι προωθεί αποτελεσματικά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων μεταξύ του DNA και του ηλεκτροδίου. Ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και της δισφαινόλης Α (BPA) ερευνήθηκε με βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV) και φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους (UV-vis).

Ένα ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), το οποίο αρχικά τροποποιήθηκε με την ενσωμάτωση του DNA σε ένα μίγμα αποτελούμενο από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων, πολυ(αμιδοαμίνη) και χιτοζάνη (MWNT-PAMAM-Chit) και στη συνέχεια με την ακινητοποίηση του κυτοχρώματος c (Cyt c), κατασκευάστηκε για τον προσδιορισμό των νιτροδών από την ομάδα του Chen [151]. Ο βιοαισθητήρας νιτροδών, με βάση την βιοκαταλυτική οξείδωση του ακινητοποιημένου Cyt c, έδειξε μια ταχεία απόκριση στον προσδιορισμό των νιτροδών (λιγότερο από 5 s), με ένα όριο ανίχνευσης ίσο με  $0,03 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , καλή αναπαραγωγιμότητα και σταθερότητα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην ανίχνευση των νιτροδών σε διάφορα τρόφιμα.

Μια νέα μέθοδος για τη μίμηση της δράσης των βλαβών που προκαλούν τα μέταλλα στο DNA in vivo παρουσιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του Wang [152]. Ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με ενσωμάτωση του μίγματος των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MCNTs) και Fe@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> με τη μορφή χαντρών νανοπεριδεραίου (nanonecklace) σε μια μεμβράνη που περιέχει πολυ(χλωριούχο διμεθυλο διαλλυλο αμμώνιο) (PDDA) και DNA χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) ως ηλεκτρόδιο εργασίας. Χρησιμοποιώντας Co(phen)<sub>3</sub><sup>3+</sup> και Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, ως ηλεκτροχημικούς δείκτες, η εξέλιξη της βλάβης του DNA παρακολούθηθηκε με τη βοήθεια της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (DPV). Ο βιοαισθητήρας αυτός παρουσίασε όχι μόνο καλή σταθερότητα και υψηλή ευαισθησία, αλλά επίσης και τη δυνατότητα κατανόησης του μηχανισμού της βλάβης του DNA που προκαλείται από οξειδωτικά μέσα in vivo.

Η κατασκευή ενός ευαίσθητου ηλεκτροχημικού DNA βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της ειδικής αλληλουχίας στόχου DNA δημοσιεύθηκε από τον Wang και την ομάδα του [153]. Αρχικά, νανოსύρματα οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnONWs) ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GC). Στη συνέχεια, νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (MWCNTs) τοποθετήθηκαν επάνω στην επιφάνεια των νανοσυρμάτων οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnONWs) και τέλος, νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) εισήχθησαν στην επιφάνεια του υμενίου νανοσωλήνων άνθρακα – νανοσυρμάτων οξειδίου του ψευδαργύρου (MWNTs/ZnONWs) με ηλεκτροχημική εναπόθεση. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και κυκλική βολτομετρία (CV) χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η διαδικασία κατασκευής του σύνθετου υμενίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ενώ η βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση του υβριδισμού με μέτρηση των ηλεκτροχημικών σημάτων του [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>], που συνδέεται στη διπλή έλικα του DNA(dsDNA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτός ο αισθητήρας μπορεί να ανιχνεύσει το DNA-στόχο με όριο ανίχνευσης ίσο με 3,5 x 10<sup>-14</sup> mol L<sup>-1</sup> και επίσης εμφανίζει ταχεία απόκριση, καλή εκλεκτικότητα και ευρεία γραμμική περιοχή.

Η ερευνητική ομάδα του Gutierrez [154] παρουσίασε τον επιλεκτικό προσδιορισμό της 8-OHdG σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) τροποποιημένο με

νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) διαλυτοποιημένους σε πολυαιθυλενιμίνη (PEI), με την παρουσία του ασκορβικού οξέος και του ουρικού οξέος χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοδικής βολταμετρίας διαφορικού παλμού (DPASV). Δεδομένου ότι το όριο ανίχνευσης ήταν ίσο με  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να συγκριθεί με εκείνες που αναφέρθηκαν χρησιμοποιώντας άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως η τεχνική της μέτρησης ενζυμοσύνδετης ανοσοαπορρόφησης (ELISA) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (HPLC-ECD).

Ο Weber και οι συνεργάτες του [155] ανέφεραν την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella enterica Typhimurium* με τη χρήση νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs) χημικώς τροποποιημένων με μονόκλωνο DNA (ssDNA) σε ένα ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE). Η ανίχνευση του στόχου-DNA επιτεύχθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής στη συνολική εμπέδηση του συστήματος, καθώς και τη μέτρηση της εμπέδησης μεταφοράς φορτίου. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι μια γρήγορη και εύκολη προσέγγιση για την ανίχνευση του DNA.

Η κατασκευή του πολυ(2,6-πυριдиноδικαρβοξυλικό οξύ) (PPDA)/ νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) τροποποιημένου ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (PPDA / MWNTs / GCE) προτάθηκε από την ερευνητική ομάδα του Deng [156] και χρησιμοποιήθηκε για μεμονωμένο ή ταυτόχρονο προσδιορισμό της γουανίνης και της αδενίνης. Η απόδοση του μορφοποιημένου ηλεκτροδίου (PPDA/MWNTs/GCE) μελετήθηκε με κυκλική βολταμετρία (CV), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός της γουανίνης και της αδενίνης πραγματοποιήθηκε με βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV). Τα όρια ανίχνευσης για τη γουανίνη και την αδενίνη ήταν  $0,045 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  και  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , αντίστοιχα.

Έναν ηλεκτροχημικός αισθητήρας με βάση υμένια αποτελούμενα από νανοσωματίδια χρυσού (GNPs), νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και πολυ(1,5-ναφθυλο-διαμίνη) τροποποιημένα σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) κατασκευάστηκε από τον Zeng και τους συνεργάτες του [157]. Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του γονιδίου αφυδρογονάσης της κελλοβιόζης που εκχυλίζεται από το γονιδίωμα *Phanerochaete chrysosporii*. Τα χαρακτηριστικά του ηλεκτροδίου και ο υβριδισμός του DNA ερευνήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), ηλεκτροχημική

φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) και κυκλική βολταμμετρία (CV). Ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας παρουσίασε ικανοποιητική ευαισθησία και όριο ανίχνευσης ίσο με  $1, 2 \times 10^{-16} \text{ mol L}^{-1}$ .

Για τη μελέτη της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς της ρουτίνης (RU) και της αλληλεπίδρασής της με το DNA, νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες (MWNTs-COOH) σε συνδυασμό με οξείδιο του σιδήρου ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (MWNTs-COOH/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GCE) χρησιμοποιήθηκαν από την ομάδα του Bian [158], για την τροποποίηση ενός ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE). Το DNA ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (MWNTs-COOH/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GCE) με τη βοήθεια ενός ενεργοποιητή σύζευξης. Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά της ρουτίνης (RU) και η αλληλεπίδραση της με το DNA μελετήθηκαν με κυκλική βολταμμετρία (CV) και βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV).

Μια απλή προσέγγιση για την κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού DNA βιοαισθητήρα με τη χρήση νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs) προτάθηκε από την ερευνητική ομάδα του Yang [159]. Χρησιμοποιώντας βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SW) για τη μετάλλαξη του σήματος και κυανό του μεθυλενίου (MB), ως δείκτη, ο βιοαισθητήρας παρουσίασε βελτιωμένη ευαισθησία, εκλεκτικότητα και ευρεία γραμμική περιοχή.

Μεταξύ των διαφόρων τύπων μικροηλεκτροδίων, τα λιθογραφικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια (SPCEs) παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα όπως χαμηλό κόστος κατασκευής, ευκολία στη χρήση, καλές μηχανικές και ηλεκτρικές ιδιότητες και καλή αναπαραγωγιμότητα που σε συνδυασμό με τις εξαιρετικές ιδιότητες των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά στην κατασκευή βιοαισθητήρων DNA [160].

Μια μέθοδος για τη γρήγορη και ευαίσθητη ανίχνευση του DNA ή του RNA αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Ye [161], χρησιμοποιώντας ένα λιθογραφικά εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα (SPCE) τροποποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs). Η ανίχνευση βασίζεται στις κορυφές οξείδωσης των καταλοίπων της γουανίνης του ssDNA και των καταλοίπων της αδενίνης του RNA. Η ακινητοποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (SPCE) βελτιώνει την απόκριση, επιταχύνει

το ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων των καταλοίπων της γουανίνης ή της αδενίνης του ssDNA ή του RNA και οδηγεί σε έναν αισθητήρα απαλλαγμένο από τη χρήση δείκτη. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, χαμηλό κόστος, ταχύτητα και επιτρέπει την άμεση ανίχνευση του ssDNA σε ποσότητες κάτω από  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  και του RNA κάτω από  $8,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  με μια ευρεία περιοχή γραμμικότητας.

Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ή σε υδατικό διάλυμα δωδέκυλο θειικού νατρίου (SDS), κολλοειδή νανοσωματίδια χρυσού (GNP) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), και ένα μίγμα από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων και κολλοειδών νανοσωματιδίων χρυσού (GNP-MWNTs) σε υδατικό διάλυμα δωδεκυλο θειικού νατρίου (SDS) έχουν μελετηθεί από τον Ονάδεκονά και την ομάδα του [162], για τη χημική τροποποίηση ενός λιθογραφικά εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα (SPCE) που χρησιμοποιείται ως μετατροπέας σήματος ενός dsDNA βιοαισθητήρα. Η απόκριση του dsDNA παρακολουθήθηκε με τη χρήση βολταμετρίας διαφορικού παλμού (DVP) του δείκτη  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$  και την ανοδική κορυφή της γουανίνης, καθώς και με κυκλική βολταμετρία (CV) του  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ως δείκτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μη-ομοιοπολική ενεργοποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με το τασιενεργό δωδεκυλο θειικό νάτριο (SDS) οδηγεί σε υψηλή διαλυτοποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα (MWNTs) στο υδατικό μέσο. Συγκριτικά με την τροποποίηση με τους νανοσωλήνες άνθρακα (MWNTs) ή με τα κολλοειδή νανοσωματίδια χρυσού (GNP), η χρήση του μίγματος των δύο (GNP-MWNTs) για τροποποίηση του ηλεκτροδίου δεν οδηγεί σε σημαντική μεταβολή των ιδιοτήτων του βιοαισθητήρα. Ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της βλάβης του DNA από παράγωγα της βερβερίνης με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Ένας νέος ηλεκτροχημικός DNA βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της βλάβης του DNA σχεδιάστηκε από τον Galandona και τους συνεργάτες του [163]. Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα, ένα σύνθετο υμένιο αποτελούμενο από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) και χιτοζάνη (Chit) εναποτέθηκε στην επιφάνεια ενός λιθογραφικά εκτυπωμένου ηλεκτροδίου (SPCE). Το dsDNA ακινητοποιείται στη σύνθετη αυτή επιφάνεια με την τεχνική των αναπτυσσόμενων διαδοχικών στρωμάτων (layer by layer) σχηματίζοντας μια σταθερή μεμβράνη. Η



παρουσία του ακινητοποιημένου DNA χαρακτηρίζεται με τη βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV) και του δείκτη  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ , καθώς και με κυκλική βολταμετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) του  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ως δείκτη. Ο βιοαισθητήρας (DNA/MWNTs-Chit/SPCE) εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της βαθιάς αποδόμησης του DNA από παράγοντες διάσπασης, όπως οι διάφορες δραστικές μορφές του οξυγόνου που σχηματίζονται *in situ* και το πορτοκαλί της ακριδίνης.

Λιθογραφικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη (SPE) μορφοποιημένα με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNT) για την ηλεκτροχημική παρακολούθηση του υβριδισμού του DNA που σχετίζεται με συγκεκριμένες ακολουθίες του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) κατασκευάστηκαν από την ερευνητική ομάδα του Karadeniz [164]. Τα πλεονεκτήματα των ηλεκτροδίων αυτών εργασίας (MWCNTs-SPE) όπως, το γεγονός ότι είναι μιας χρήσης και φορητά, η μεγαλύτερη επιφάνεια λόγω της τροποποίησης με τους νανοσωλήνες άνθρακα, η υψηλή ευαισθησία και η καλή αναπαραγωγιμότητα, οδηγούν σε μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση του υβριδισμού του DNA χρησιμοποιώντας βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPV) με τη μέτρηση της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης στα 1,00 V, έπειτα από τον υβριδισμό του DNA μεταξύ της αλληλουχίας ανιχνευτή του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) και της συμπληρωματικής αλληλουχίας στόχου.

Ένας ηλεκτροχημικός DNA βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε από την ομάδα του Labuda [165], χρησιμοποιώντας λιθογραφικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα (SPCE) με και χωρίς νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και εφαρμόζεται για την ανίχνευση της επίδρασης συνθετικών παραγώγων της κινάζολίνης σε δίκλωνο DNA από θύμο αδένος βοειδούς ακινητοποιημένου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η αλληλεπίδραση της κινάζολίνης με το DNA ερευνήθηκε βολταμετρικά χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικούς δείκτες όπως  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , κυανό του μεθυλενίου (MB) και  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  καθώς και με ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS).

Ένας μη τοξικός βιοαισθητήρας με υμένιο δίκλωνο DNA σε ένα λιθογραφικά εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα (SPCE) τροποποιημένου με μίγμα νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και χιτοζάνης (Chit), που χρησιμοποιείται ως διεπαφή, κατασκευάστηκε από την ομάδα του Galandova [166]. Ο βολταμετρικός

χαρακτηρισμός του τροποποιημένου ηλεκτροδίου, με και χωρίς DNA στην επιφάνεια του, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οξειδοαναγωγικού δείκτη  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$  με κυκλική βολταμετρία και με βολταμετρία απογύμνωσης με γραμμική σάρωση (EVLS).

Η τροποποίηση ενός λιθογραφικά εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα με τη χρήση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNT) διεσπαρμένων σε πολυαιθυλενιμίνη (PEI), που ακολουθείται από την ακινητοποίηση στην επιφάνειά του ηλεκτροδίου, δίκλωνου DNA από θυμό αδένος βοειδούς (dsDNA) προτάθηκε από τον Galandona και την ομάδα του [167]. Η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) με τη χρήση του  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  ως δείκτη και μεσολαβητή, καθώς και η συζευγμένη κυκλική βολταμετρία (CV) με την ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) και τη χρήση του  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του βιοαισθητήρα και την αξιολόγηση των βλαβών που προκλήθηκαν στο DNA έπειτα από επίδραση κινάζολινών.

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τα ηλεκτρόδια γραφίτη. Η ερευνητική ομάδα του Wang [168] πρότεινε μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο για τον ταυτόχρονο ή μεμονωμένο προσδιορισμό της γουανίνης και της αδενίνης. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο γραφίτη τροποποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SCNTs) διαλυτοποιημένους σε υδατικό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD). Έπειτα από ακινητοποίηση σε ανοικτό κύκλωμα για 60 s, η γουανίνη και η αδενίνη παράγουν πολύ καλά σχηματισμένες κορυφές οξείδωσης σε δυναμικό ίσο με 0,79 και 1,09 V, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η άριστη ηλεκτροχημική συμπεριφορά των πουρινών οφείλεται στην επιλεκτική συσσώρευση της β-CD, που δρα όπως ένα φίλτρο στην σύνθετη επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επιπλέον, το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε επιτρέπει τον αποτελεσματικό προσδιορισμό του DNA με όρια ανίχνευσης 0,1 και 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για τη γουανίνη και την αδενίνη, αντίστοιχα.

Νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) αναπτύχθηκαν επίσης απευθείας σε ένα υπόστρωμα γραφίτη με χημική εναπόθεση ατμών (CVD) και η επιφάνεια αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο εργασίας [170]. Η περαιτέρω τροποποίηση του ηλεκτροδίου επιτεύχθηκε με ηλεκτρο-οξείδωση της αιθυλενο διαμίνης (ED) και το

dsDNA ακινητοποιήθηκε ηλεκτροχημικώς στην επιφάνεια. Παρατηρήθηκε μια πολύ καλά σχηματισμένη κορυφή οξείδωσης μεγάλης έντασης σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση του dsDNA ( $40 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του dsDNA και ενός παρεμβολέα της υδροχλωρικής προμεθαζίνης.

Ηλεκτροχημική παρακολούθηση των φαινομένων υβριδισμού DNA, που σχετίζονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), εκτελέστηκε επιτυχώς από τους Caliskan και τους συνεργάτες του [170] χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια γραφίτη μιας χρήσης (PEGs) τροποποιημένα με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος ενεργοποιημένους με καρβοξυλικές ομάδες (SWCNTs). Η απόδοση των ηλεκτροδίων (SWCNT-PGEs), ως προς τον υβριδισμό του DNA, μελετήθηκε με τη μέτρηση των αλλαγών της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης στις επιλεγόμενες βέλτιστες αναλυτικές συνθήκες, όπως η συγκέντρωση του ανιχνευτή και του στόχου, ο χρόνος υβριδοποίησης και η εκλεκτικότητα. Ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για το χαρακτηρισμό της επιτυχούς ή μη τροποποίησης των ηλεκτροδίων γραφίτη (PGEs) συμπληρώνοντας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη βολταμμετρία.

Βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV), σε συνδυασμό με τροποποιημένα και μη τροποποιημένα και ηλεκτρόδια γραφίτη από μολύβι (PGE) με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNT) χρησιμοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Karadeniz [171], προκειμένου να διερευνηθούν την αλληλεπίδραση της 4-εννεύλοφαινόλης (NP) με το DNA. Μελετήθηκαν πριν και μετά την αλληλεπίδραση της 4-εννεύλοφαινόλης (NP) με το DNA, οι αλλαγές στα δύο σήματα που προέρχονται από την οξείδωση της 4-εννεύλοφαινόλης (NP) και της βάσης του DNA, της γουανίνης. Επίσης, η επίδραση της συγκέντρωσης της 4-εννεύλοφαινόλης (NP) ερευνήθηκε με σκοπό να καθοριστούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Το όριο ανίχνευσης και η αναπαραγωγικότητα προσδιορίστηκαν με τη χρήση τροποποιημένων ηλεκτροδίων.

Μια ευαίσθητη βολταμμετρική μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Goyal και τους συνεργάτες του [172], με τη χρήση ηλεκτροδίου πυρολιτικού γραφίτη τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs / EPPGE). Ο προτεινόμενος αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της γουανίνης και της 8-

υδροξυγουανίνης σε DNA υδρολυμένο με οξύ με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το κύριο πλεονέκτημα του τροποποιημένου ηλεκτροδίου είναι η εκλεκτικότητά του, αφού μπορεί να ανιχνεύσει πολύ χαμηλή συγκέντρωση της 8-υδροξυγουανίνης χωρίς να επηρεάζει τα άλλα προϊόντα της βλάβης του DNA. Τα όρια ανίχνευσης της γουανίνης και της 8-υδροξυγουανίνης βρέθηκαν ίσα με  $0,05 \times 10^{-9}$  και  $0,01 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Τα όρια της ποσοτικοποίησης βρέθηκαν ίσα με  $0,17 \times 10^{-9}$  και  $0,34 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  για τη γουανίνη και την 8-υδροξυγουανίνη, αντίστοιχα.

Η ίδια ερευνητική ομάδα [173] χρησιμοποίησε το ίδιο ηλεκτρόδιο εργασίας (SWNTs/EPPGE) για την παρακολούθηση της βλάβης σε DNA υδρολυμένο με οξύ. Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της βλάβης του DNA η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό της 2,8-διυδροξυαδενίνης (2,8-DHA). Επειδή ο αισθητήρας εμφανίζει μια ισχυρή συμπεριφορά διαμεσολαβητή ηλεκτρονίων, το δυναμικό της κορυφής οξείδωσης της 2,8-διυδροξυαδενίνης (2,8-DHA) μετατοπίστηκε σε αρνητικότερα δυναμικά ενώ η ένταση του ρεύματος κορυφής αυξήθηκε σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο πυρολυτικού γραφίτη (EPPGE). Στις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, το όριο ανίχνευσης ήταν ίσο με  $3,8 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  και το όριο της ποσοτικοποίησης ήταν ίσο με  $1,27 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ . Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο επέδειξε υψηλή σταθερότητα και αναπαραγωγικότητα

Οι βιομοριακές αλληλεπιδράσεις των παραγώγων λευκοχρύσου χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντικαρκινικά φάρμακα, έτσι η αλληλεπίδραση του δίκλωνου DNA (dsDNA) με την *cis*-διαμινο-δίγλωρο-πλατίνη (II) και την οξαλιπλατίνη μελετήθηκε από την ομάδα του Yaraslan [174], χρησιμοποιώντας βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) σε συνδυασμό με ηλεκτρόδιο γραφίτη τροποποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNTs-GE) και μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφίτη (GE). Τα χαρακτηριστικά αυτών των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων διερευνήθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με την παρακολούθηση των αλλαγών της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης, στους επιλεγμένους βέλτιστους χρόνους αλληλεπίδρασης, πραγματοποιώντας σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων που προέκυψαν και με τα δύο ηλεκτρόδια εργασίας.

Συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα της νανοτεχνολογίας και της τεχνολογία των πολυμερών, ο Canavar και οι συνεργάτες του [175] χρησιμοποίησαν ένα ηλεκτρόδιο γραφίτη από μολύβι (PGE) μορφοποιημένο αρχικά με πολυ(βινυλοφεροκένιο) (PVF<sup>+</sup>) και έπειτα με νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNT), για την ηλεκτροχημική μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του αντινεοπλασματικού φαρμάκου μιτομυκίνη C (MC) και του DNA. Οι αλλαγές στην κορυφή οξείδωσης της γουανίνης παρακολούθηθηκαν με τη χρήση της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (DPV) κατά την απουσία αλλά και την παρουσία της μιτομυκίνης C (MC). Κυκλική βολταμμετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS) χρησιμοποιήθηκαν επίσης για το χαρακτηρισμό του SWCNTs/PVF<sup>+</sup>/PGE και του PVF<sup>+</sup>/PGE. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε ίσο με 625 ng mL<sup>-1</sup> για την μιτομυκίνη C (MC) χρησιμοποιώντας δίκλωνο DNA από θυμό αδένα βοειδούς ακινητοποιημένο στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας (SWCNTs / PVF<sup>+</sup>/PGE).



## 6.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

Η δομή τους εμφανίζει την ιδιαιτερότητα να περιλαμβάνει ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα συνήθως μικρό ανόργανο ανιόν, ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις το μικρό ανιόν είναι επίσης οργανικό. Έτσι, η τελική δομή που προκύπτει είναι μη κρυσταλλική, αφού δεν υπάρχει δυνατότητα συμμετρικής διάταξης, οπότε σε αντίθεση με τα συνηθισμένα άλατα που είναι στερεά, είναι υγρά ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος [177].

Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών προκύπτουν από το συνδυασμό των ιδιοτήτων του κατιόντος και του ανιόντος. Συνήθως, το ανιόν επηρεάζει τη διαλυτότητα στο νερό, αλλά και το είδος του κατιόντος έχει επίδραση στην υδροφοβικότητα ή στη δυνατότητα να σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου [178].

- Ανιόν

Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών επηρεάζονται σημαντικά από το είδος του ανιόντος. Η εισαγωγή διαφορετικών ειδών ανιόντος οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού των ιοντικών υγρών, τα οποία παρουσιάζουν ποικίλες ιδιότητες. Δυο είναι οι διαφορετικοί τύποι ανιόντων τα οποία χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των ιοντικών υγρών: εκείνα τα οποία διαθέτουν άτομα φθορίου (π.χ.  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_2^-$ ,  $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ ) και εκείνα τα οποία δεν περιλαμβάνουν άτομα φθορίου (π.χ.  $\text{AlCl}_4^-$ ).

- Κατιόν

Το κατιόν είναι συνήθως οργανικής φύσεως με χαμηλή συμμετρία. Τα περισσότερα ιοντικά υγρά βασίζονται σε αμμωνιακά, σουλφονικά, φωσφονικά, ιμιδαζολικά, πυριδινικά, πικολινικά, πυρολιδινικά, θειαζολικά, οξαζολικά κατιόντα. Τα σημεία τήξεως των ιοντικών υγρών δεν μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια. Για το λόγο αυτό, από τη μελέτη μιας σειράς ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών, προκύπτει το συμπέρασμα ότι, όσο αυξάνει το μέγεθος και η ασυμμετρία του κατιόντος, μειώνεται το σημείο τήξεως. Επιπλέον, όσο αυξάνει η διακλάδωση των αλκυλικών αλυσίδων, το σημείο τήξεως αυξάνεται. Το σημείο τήξεως είναι σημαντική ιδιότητα, γιατί καθορίζει το κατώτατο θερμοκρασιακό όριο που το ιοντικό υγρό βρίσκεται στην υγρή κατάσταση και που με τη

θερμοκρασία διάσπασης καθορίζει το θερμοκρασιακό εύρος που ένα ιοντικό υγρό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης [178].

### 6.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

Το γεγονός ότι τα ιοντικά υγρά παραμένουν υγρά στη θερμοκρασία δωματίου έχει αποδοθεί στο ότι τα ιόντα δεν 'πακετάρονται' καλά [179]. Ο συνδυασμός μεγάλων και ασύμμετρων κατιόντων και ανιόντων οδηγούν σε κανονικές δομές και τα χαμηλά σημεία τήξεως των ιοντικών υγρών είναι αποτέλεσμα της χημικής τους σύστασης. Ο συνδυασμός μεγάλων ασύμμετρων οργανικών κατιόντων και μικρότερων ανόργανων ανιόντων μειώνει την ενέργεια πλέγματος και συνεπώς το σημείο τήξεως του προκύπτοντος ιοντικού μέσου. Σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και το ανιόν είναι μεγάλου μεγέθους γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση του σημείου τήξεως [180].

Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά οι βασικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών.

- Σημείο Τήξεως

Τα δεδομένα σχετικά με τα σημεία τήξεως των ΙΥ πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με μεγάλη προσοχή, καθώς είναι πιθανό να υφίστανται υπέρψυξη (supercooling) καθώς και εξαιτίας της πιθανής ύπαρξης προσμίξεων και ακαθαρσιών, οι οποίες επηρεάζουν το προσδιορισμό του.

- Πτητικότητα

Ο ιοντικός τους χαρακτήρας μπορεί να δικαιολογήσει ως ένα βαθμό την αμελητέα τάση ατμών στην υγρή κατάσταση, χαρακτηριστικό που τα διαφοροποιεί από τους μοριακούς διαλύτες.

- Μη αναφλεξιμότητα

Το μεγάλο ενδιαφέρον το οποίο έχουν συγκεντρώσει τα ιοντικά υγρά οφείλεται κυρίως στην πιθανή χρήση τους ως αντικαταστάτες των πτητικών οργανικών διαλυτών, κυρίως γιατί θεωρούνται μη πτητικές και κατά συνέπεια μη αναφλέξιμες ενώσεις.

- Θερμική και χημική σταθερότητα

Τα ιοντικά υγρά είναι θερμικά σταθερά σε θερμοκρασίες ακόμα και μεγαλύτερες των 350°C. Από την άλλη μεριά, από πειράματα σταθερότητας μεγάλης διάρκειας έχει βρεθεί ότι διασπώνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες γεγονός που θα πρέπει να λαμβάνεται



υπόψη. Τα ιοντικά υγρά με φωσφόριο ως κατιόν και  $\text{NTf}_2^-$  ή  $\text{N}(\text{CN})_2^-$  ως ανιόν υφίστανται θερμική διάσπαση σε ένα στάδιο, παράγοντας πτητικές ενώσεις. Αντίθετα, ιοντικά υγρά με κατιόντα που περιέχουν άζωτο δεν αποσυντίθενται εντελώς, αλλά σχηματίζουν παραπροϊόντα άνθρακα (οι κυανομάδες έχουν τη τάση να πολυμερίζονται) [181].

- Αγωγιμότητα και ηλεκτροχημικό παράθυρο

Η αγωγιμότητα που παρουσιάζουν τα ιοντικά υγρά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς δρουν τόσο ως διαλύτες αλλά και ως ηλεκτρολύτες στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Τα ιοντικά υγρά παρουσιάζουν αγωγιμότητες που κυμαίνονται από 0.1 έως 20  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Σε γενικές γραμμές τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά παρουσιάζουν υψηλότερη αγωγιμότητα σε σύγκριση με εκείνα που περιέχουν το αμμωνιακό κατιόν. Η αγωγιμότητα των ιοντικών υγρών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το ιξώδες, η πυκνότητα, η ιοντική ακτίνα, ο απεντοπισμός του ανιονικού φορτίου, η συσσωμάτωση και η ιοντική κίνηση [182]. Το ηλεκτροχημικό τους παράθυρο είναι της τάξης των περίπου 4,5 με 5 V, συγκρίσιμο με εκείνο των οργανικών διαλυτών, αλλά αρκετά πιο ευρύ των υδατικών ηλεκτρολυτών. Τα τεταρτοταγή αμμωνιακά ιοντικά υγρά είναι γενικά πιο σταθερά στην αναγωγή από τα ιμιδαζολικά τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό ετεροκυκλικών καρβενίων.

- Πυκνότητα

Τα ιοντικά υγρά είναι σε γενικές γραμμές πιο πυκνά σε σύγκριση με το νερό ή άλλους οργανικούς διαλύτες, με τιμές που κυμαίνονται από 1-1.6  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  ανάλογα με τη θερμοκρασία [183].

- Επιφανειακή τάση

Γενικά, οι τιμές επιφανειακής τάσης υγρού / αέρα των ιοντικών υγρών είναι κάπως υψηλότερες απ' ό,τι για τους συμβατικούς διαλύτες (εξάνιο: 18  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), αλλά όχι τόσο υψηλές όσο του νερού (73  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος έχει μεγαλύτερη επίδραση στην επιφανειακή τάση, καθώς αύξηση του μήκους της αλυσίδας οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές [177].

- Ιξώδες

Το ιξώδες των ιοντικών υγρών είναι υψηλότερο κατά περίπου 1-3 τάξεις μεγέθους συγκρινόμενο με εκείνο των συμβατικών διαλυτών. Η τιμή του ιξώδους κυμαίνεται από 66 έως 1110 cPa στους 20-25 °C.

- Πολικότητα

Η πολικότητα των ιοντικών υγρών έχει μελετηθεί και συγκριθεί με εκείνη των κοινών οργανικών διαλυτών. Έτσι η ερευνητική ομάδα του Charmichael [184] έδειξε ότι τα IY με κατιόν της ομάδας 1-άλκυλο-3-μεθυλιμιδάζολο και τα [PF<sub>6</sub>], [BF<sub>4</sub>], [(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N] και [NO<sub>3</sub>] για ανιόν παρουσιάζουν πολικότητες παρόμοιες με την 2-αμινοαιθανόλη και χαμηλότερη εκείνης των μεθανόλη, αιθανόλη και βουτανόλη. Η ομάδα του Aki [185] αναφέρουν ότι τα [bmim][PF<sub>6</sub>], [C<sub>8</sub>mim][PF<sub>6</sub>], [bmim][NO<sub>3</sub>] και [N-bury][BF<sub>4</sub>] είναι πιο πολικά από το ακετονιτρίλιο και λιγότερο πολικά από τη μεθανόλη και ότι τα ιοντικά υγρά αυτά αναμένεται να είναι τουλάχιστον μερικώς αναμίξιμα με το νερό. Τα ιοντικά υγρά με το [PF<sub>6</sub>] ως ανιόν προτιμώνται σε διεργασίες εκχύλισης εξαιτίας του ότι σχηματίζουν δύο φάσεις καθώς δεν αναμιγνύονται με το νερό.

- Τοξικότητα και βιοδιασπασιμότητα

Ο πράσινος χαρακτήρας των ιοντικών υγρών βασίζεται κυρίως στο ότι παρουσιάζουν αμελητέα τάση ατμών αλλά δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη τοξικότητα τους. Παρόλο που τα ιοντικά υγρά δεν εξατμίζονται και συνεπώς δε μπορούν να συμβάλλουν στην ατμοσφαιρική ρύπανση, τα περισσότερα από αυτά είναι διαλυτά στο νερό και κατά συνέπεια μπορούν να εισέλθουν στον υδροφόρο ορίζοντα. Τα [bmim][PF<sub>6</sub>] και [bmim][BF<sub>4</sub>] που είναι από τα πλέον γνωστά ιοντικά υγρά, όταν έρχονται σε επαφή με το νερό διασπώνται σχηματίζοντας υδροφθόριο και φωσφορικό οξύ [186].

- Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση είναι μια ιδιότητα που δεν έχει μελετηθεί επισταμένως. Σε γενικές γραμμές οι τιμές επιφανειακής τάσης είναι ενδιάμεσες εκείνων που χαρακτηρίζουν τους οργανικούς διαλύτες [187].

Τα παραπάνω ισχύουν για μεγάλο αριθμό ιοντικών υγρών, αλλά δεν πρέπει να ξεχνάει κανείς ότι εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας των κατιόντων και ανιόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή των διαφόρων ιοντικών υγρών, οι ιδιότητες μπορεί να ποικίλουν ανάλογα.

## 6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

### 6.4.1 Γενικά

Τα ιοντικά υγρά παρασκευάζονται συνήθως από ανόργανα ανιόντα και αζωτούχα οργανικά κατιόντα. Οι φυσικές και χημικές τους ιδιότητες μπορούν να τροποποιούνται και να προσαρμόζονται σε πλήθος εφαρμογών, συνδυάζοντας ποικιλοτρόπως κατιόντα και ανιόντα [176].

Οι μοναδικές λοιπόν, φυσικοχημικές ιδιότητες τους καθιστούν δυνατή τη χρήση τους σε πολλές εφαρμογές.

Έτσι, οι τομείς που τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται είναι:

- ως διαλύτες στην οργανική και οργανομεταλλική σύνθεση και στη κατάλυση,
- ως ηλεκτρολύτες στην ηλεκτροχημεία, στα κελιά καυσίμου και στα
- φωτοβολταϊκά
- ως λιπαντικά
- ως σταθερές φάσεις στη χρωματογραφία
- ως υποστρώματα για σταθεροποίηση ενζύμων
- ως πρόδρομες ενώσεις για σύνθεση νανο-υλικών
- στη σύνθεση υλικών με υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- στη χημική ανάλυση [178]

### 6.4.2 Εφαρμογές στην ηλεκτροανάλυση

Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, όπως το μεγάλο ηλεκτροχημικό παράθυρο, η ικανότητα να προάγουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων, η υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα, η σχετικά υψηλή αγωγιμότητα η αμελητέα τάση ατμών [188], η ικανότητα να διαλύουν ένα μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ενώσεων και η πολύ καλή βιοσυμβατότητα [189], τα ιοντικά υγρά παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες εφαρμογών

στην ηλεκτροχημεία και στους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως ηλεκτρολύτες, είτε ως υλικό τροποποίησης ηλεκτροδίων όπου η ανάμιξή τους με σκόνη άνθρακα (συνήθως γραφίτη) οδηγεί σε ένα νέο είδος χημικώς τροποποιημένων ηλεκτροδίων πάστας άνθρακα που ονομάζονται ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (carbon paste ionic liquid, CILE) και τα οποία παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση από ότι τα συμβατικά ηλεκτρόδια εργασίας [190].

Τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILEs) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση διαφόρων ηλεκτροενεργών [191-198] και μη ενώσεων είτε αυτούσια είτε ως βάση για περαιτέρω μορφοποίηση [199-213].

Πρόσφατα, τα ηλεκτρόδια πάστας ιοντικού υγρού CILEs, άρχισαν να χρησιμοποιούνται με επιτυχία στο πεδίο της ηλεκτροχημικής μελέτης νουκλεϊκών οξέων (NAς).

Ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) κατασκευάστηκε με την ανάμιξη του N-βουτυλοπυριδινικού εξαφθοροφωσφορικού (BPPF<sub>6</sub>) ιοντικού υγρού και σκόνης γραφίτη άνθρακα από τον Sun και τους συνεργάτες του [214] και χρησιμοποιήθηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης (A) και της γουανίνης (G). Παρατηρήθηκε αύξηση των κορυφών οξειδωσης και των δύο βάσεων, όπως και μετατόπιση των δυναμικών οξειδωσης σε πιο αρνητικά δυναμικά συγκριτικά με το συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE). Η απόδοση του ηλεκτροδίου άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) στην ταυτόχρονη ανίχνευση της αδενίνης (A) και γουανίνης (G) ήταν πολύ καλή με το δυναμικό διαχωρισμού να εμφανίζεται ίσο με 0,304 V.

Η ίδια ερευνητική ομάδα [215] μελέτησε την ηλεκτροχημική οξείδωση του θερμικά μετουσιωμένου μονόκλωνου DNA (ssDNA) στο ίδιο ηλεκτρόδιο εργασίας και με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας (CV). Μια κορυφή οξειδωσης εμφανίστηκε σε δυναμικό 0,772 V (έναντι του SCE) έπειτα από προσυγκέντρωση του ssDNA με εφαρμογή δυναμικού 0,35 V για 160 s σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7,0, η οποία αποδίδεται στην οξείδωση της γουανίνης (G). Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική μετατόπιση του δυναμικού κορυφής οξειδωσης της γουανίνης (G) και αύξηση της κορυφής οξειδωσης συγκριτικά με το συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE). Στις επιλεγμένες συνθήκες ανάλυσης, η γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορισμού του

μονόκλωνου DNA (ssDNA) επιτεύχθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 10,0 έως 110,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ενώ το όριο ανίχνευσης βρέθηκε ίσο με 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (3 $\sigma$ ).

Καθώς το ηλεκτρόδιο πάστας ιοντικού υγρού (CILE) με βάση την πυριδίνη που περιγράφηκε προηγουμένως, παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα και πολύ καλή ηλεκτροδραστικότητα, η ερευνητική ομάδα του Sun [216] το χρησιμοποίησε ως ηλεκτρόδιο εργασίας, με σκοπό τη διερεύνηση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς της γουανοσίνης. Σε σύγκριση με το συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE), παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της ηλεκτροχημικής απόκρισης της γουανοσίνης. Η παρουσία του ιοντικού υγρού (IL) ενίσχυσε την προσροφητική ικανότητα του ηλεκτροδίου. Στις επιλεγμένες συνθήκες, μια νέα μέθοδος για την ηλεκτροχημική ανίχνευση γουανοσίνης αναπτύχθηκε με όριο ανίχνευσης στα  $2,61 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (3 $\sigma$ ) με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας (CV).

Η ερευνητική ομάδα του Sun [217], με σκοπό να μελετήσει το ίδιο βιομόριο, κατασκεύασε ένα ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs). Το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη του υδρόφιλου 1-αιθυλο-3-μεθυλιμιδαζολικού τετραφθοροβορικού (EMIMBF<sub>4</sub>) ιοντικού υγρού, σκόνης γραφίτη και παραφίνης. Το ηλεκτρόδιο MWCNTs / CILE έδειξε μεγάλη ηλεκτροκαταλυτική ικανότητα κατά την οξείδωση της γουανοσίνης και ενισχυμένο ρεύμα κορυφής. Με τη χρήση της τεχνικής του διαφορικού παλμού βολταμετρία (DPV), βρέθηκε μια γραμμική σχέση μεταξύ της κορυφής οξείδωσης και της συγκέντρωσης της γουανοσίνης, στην περιοχή από  $1,0 \times 10^{-7}$  έως  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , με όριο ανίχνευσης  $7,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (3 $\sigma$ ).

Μια νέα ηλεκτροχημική μέθοδος προσδιορισμού της θυμίνης, προτάθηκε από την ομάδα του Sun [218]. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση της θυμίνης σε ένα ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE), το οποίο κατασκευάστηκε με χρήση του 1-(3-χλωρο-2-υδροξυ-προπυλο)-3 μεθυλιμιδαζολικού αιθυλεστέρα ιοντικού υγρού ως συνδετικού. Η ηλεκτροχημική οξείδωση της θυμίνης στο ηλεκτρόδιο είναι μη αντιστρεπτή δράση, ελέγχεται από το φαινόμενο της προσρόφησης και περιλαμβάνει τη συμμετοχή ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου. Η παρουσία του ιοντικού υγρού, λόγω της υψηλής αγωγιμότητας του, είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της απόκρισης του ηλεκτροδίου. Στις επιλεγμένες συνθήκες, η ένταση του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης

ήταν γραμμικά εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της θυμίνης σε ένα εύρος από  $3,0 \times 10^{-6}$  έως  $3000,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ενώ το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ίσο με  $0,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (3σ) με χρήση της τεχνική της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού (DVP).

Μίγμα από ιοντικό υγρό (1-καρβοξυλομέθυλ-3-μεθυλιμιδαζολικό εξαφθοροφωσφορικό, CMIMPF<sub>6</sub>) και δίκλωνο DNA (dsDNA) χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα του Zhu [219], με σκοπό τη διερεύνηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων της μυοσφαιρίνης (Mb) σε ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE). Για την κατασκευή του ηλεκτροδίου (CILE) αναμίχθηκε 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζολικό τετραθοβορικό (BMIMBF<sub>4</sub>) ιοντικό υγρό και ορυκτό έλαιο (mineral oil). Η παρουσία του υμενίου CMIMPF<sub>6</sub>- και dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων από τη μυοσφαιρίνη (Mb) στο ηλεκτρόδιο (CILE), η οποία αποδίδεται στη συνεργιστική συνεισφορά του δίκλωνου DNA (dsDNA), του 1-καρβοξυλομέθυλ-3-μεθυλιμιδαζολικού εξαφθοροφωσφορικού ιοντικού υγρού (CMIMPF<sub>6</sub>) και στην αλληλεπίδραση τους. Διάφοροι ηλεκτροχημικοί παράμετροι της μυοσφαιρίνης (Mb) στο τροποποιημένο αυτό ηλεκτρόδιο μελετήθηκαν. Ο συντελεστής μεταφοράς φορτίου ( $\alpha$ ) και η σταθερά ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων ( $k_s$ ) υπολογίστηκαν ως 0.42 και  $0.84 \text{ s}^{-1}$  αντίστοιχα. Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (Mb/CMIMPF<sub>6</sub>-dsDNA)/ CILE παρουσίασε καλή ηλεκτροκαταλυτική ικανότητα στην αναγωγή του τριχλωροξικού οξέος (TCA) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Το 1-(3-χλωρο-2-υδροξυ-προπυλο)-3-μεθυλιμιδαζολικό τετραθοβορικό (PMIMBF<sub>4</sub>) ιοντικό υγρό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ενός τροποποιημένου ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (IL-CPE) από τον Guo και τους συνεργάτες του [220] για τον προσδιορισμό της 5'-διφωσφορικής αδενοσίνης (5'-ADP). Το ηλεκτρόδιο κατασκευάστηκε με την ανάμιξη σκόνης γραφίτη άνθρακα με το ιοντικό υγρό και με παραφίνη. Μια μη αντιστρεπτή κορυφή οξείδωσης, ελεγχόμενη από φαινόμενα πρόσροφησης και με βελτιωμένη απόκριση εμφανίστηκε. Με τη χρήση της τεχνικής της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού (DPV), η ένταση του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης ήταν γραμμικά εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της 5'-ADP σε ένα εύρος από 10,0 έως 1000,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  με το όριο ανίχνευσης στα 3,23  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (3σ).

Για τον προσδιορισμό της 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνης (5'-AMP), χρησιμοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Gao [221] ένα νέο ιοντικό υγρό, ο 1-(3-

χλωρο-2-υδροξυ-προπυλο)-πυριδινικός αιθυλεστέρας. Αξιοσημείωτη αύξηση του ρεύματος κορυφής παρατηρήθηκε και με τη βοήθεια της τεχνικής της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού (DVP), αναπτύχθηκε μια ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού της (5'-AMP), με όριο ανίχνευσης ίσο με  $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$  (3σ).

Ένα ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (SWNT- RTIL PE) κατασκευάστηκε με την ανάμιξη νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs) ενεργοποιημένων με καρβοξυλικές ομάδες με το 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζολικό εξαφθοροφωσφορικό ιοντικό υγρό (BMIMPF<sub>6</sub>) [222]. Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ερευνήθηκε με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας (CV) και της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) σε σύγκριση με το συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το νέο αυτό ηλεκτρόδιο (SWNT-RTIL PE) παρουσιάζει όχι μόνο υψηλότερη αγωγιμότητα, αλλά επίσης χαμηλότερο δυναμικό διαχωρισμού (DEP), υψηλότερη κορυφή ρεύματος (ip) και καλύτερη αντιστρεπτότητα στην περίπτωση της ντοπαμίνης (DA), το κυανό του μεθυλενίου (MB) και του σιδηρικού ανυδρού καλίου (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]). Το ηλεκτρόδιο (SWN -RTIL PE) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του αριθμού των περιεχομένων βάσεων γουανίνης και αδενίνης ανά mol ολιγονουκλεοτιδίων ακολουθώντας τις κορυφές οξειδωσης των δύο αυτών βάσεων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (ολιγονουκλεοτιδίων) από 0,05 έως 2,0 nM. Επίσης, με βάση την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης (G), ως αναλυτικό σήμα, το όριο ανίχνευσης των ολιγονουκλεοτιδίων είναι 9,9 pM.

Τα πλεονεκτήματα της συνεργασίας νανοσωματιδίων ZnO και ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) με στόχο την ανίχνευση ενός γονιδίου της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας παρουσιάστηκαν από την ομάδα του Zhang [223]. Το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILE) παρασκευάστηκε με ανάμιξη του 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζολικού εξαφθοροφωσφορικού ιοντικού υγρού (BMIMPF<sub>6</sub>) με σκόνη γραφίτη. Αξιοσημείωτη αλλαγή παρατηρήθηκε στα φάσματα εμπέδησης, πριν και μετά τον υβριδισμό του ανιχνευτή DNA με το DNA-στόχο, στις βέλτιστες συνθήκες, με το όριο ανίχνευσης να καθορίζεται ίσο με  $2,5 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$

## 7. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

### 7.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Το μόριο της ομάδας των χημικών ενώσεων, γνωστών ως επιφανειοδραστικές ουσίες ή ως επιφανειακά ενεργές ενώσεις ή ως τασενεργά (surfactants, surface active agents, tensides), στην πιο κοινή του μορφή αποτελείται από ένα λυόφοβο τμήμα το οποίο έχει πολύ μικρή έλξη προς το διαλύτη και από ένα τμήμα το οποίο έχει ισχυρή έλξη προς το διαλύτη, το οποίο ονομάζεται λυόφιλο. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το νερό, το λυόφοβο τμήμα (συνήθως υδρογονοανθρακική αλυσίδα) ονομάζεται υδρόφοβο ενώ το άλλο τμήμα είναι το υδρόφιλο (πολικό). Χαρακτηριστικές υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1

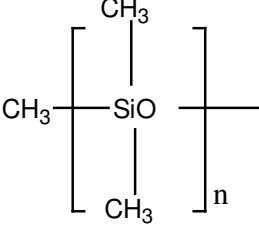
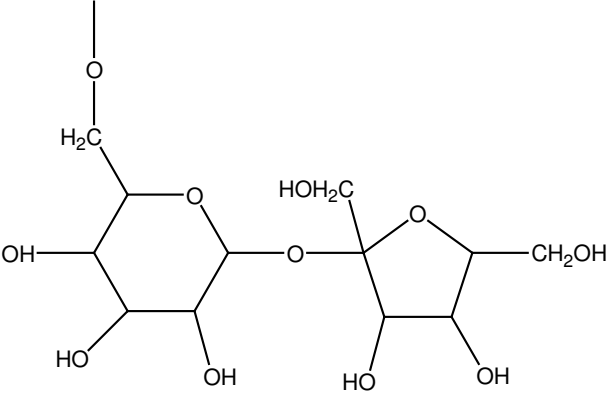
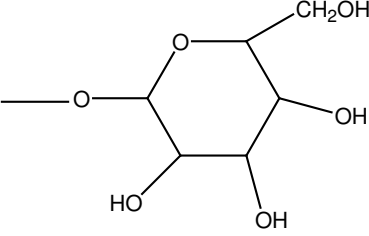
Οι γενικές ιδιότητες και η συμπεριφορά αυτών των ουσιών οφείλονται στη δυική φύση του μορίου τους. Ο ανταγωνισμός των δύο αυτών τμημάτων του μορίου και η ισορροπία μεταξύ τους προσδίδει στις ενώσεις αυτές τις επιφανειοδραστικές τους ιδιότητες. Η υδρόφιλη ομάδα ασκεί επίδραση διαλυτοποίησης και τείνει να έλκει ολόκληρο το μόριο προς το διάλυμα. Η υδρόφοβη ομάδα από την άλλη πλευρά, λόγω της μη διαλυτότητάς της, αντιτίθεται σε αυτή την τάση.

Λόγω του ανταγωνισμού ανάμεσα στις δύο ομάδες, η ουσία ούτε διαλύεται απόλυτα ούτε παραμένει αδιάλυτη εντελώς, αλλά συγκεντρώνεται στην επιφάνεια υγρού-υγρού, όπου συνήθως το μόριο της είναι προσανατολισμένο με τις υδρόφιλες ομάδες προς την υδατική φάση και τις υδρόφοβες προς τη μη υδατική.

Η χρησιμότητα των τασιενεργών πηγάζει από τις επιδράσεις που επιφέρουν στις επιφανειακές, διεπιφανειακές και κύριες ιδιότητες των διαλυμάτων τους (bulk) και στα υλικά με τα οποία τα διαλύματα τους έρχονται σε επαφή [224].



**Πίνακας 7.1** Χαρακτηριστικές υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες τασιενεργών.

<b>Υδρόφοβες ομάδες</b>	
$C_nH_{2n-1}^-$	
$C_nH_{2n+1}^-$	$C_nH_{2n+1}-C_6H_{41}^-$
$C_nF_{2n+1}^-$	
<b>Υδρόφιλες ομάδες</b>	
$-COO^-K^+$	$-(OCH_2CH_2)_n-OH$
$-SO_3^-Na^+$	$-CON[(OCH_2CH_2O)_nOH]_2$
$-PO_3^{-2}Na^+$	$-OPO_3^{-2}2Na^+$
$-(OCH_2CH_2)_nOSO_3^-NH_4^+$	
	
$-NR_3^+Cl^-$	$-SR_2^+Cl^-$
$-PR_3^+Cl^-$	$-N(CH_3)_2CH_2COO^-$

## 7.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΑΣΙΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι τασενεργές ουσίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες : α) τις ιοντικές και β) τις μη ιοντικές.

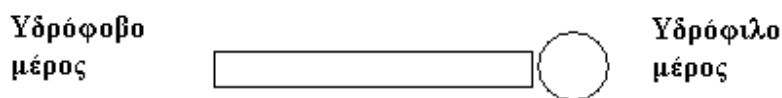
Με τη σειρά τους οι ιοντικές μπορούν να χωριστούν σε ανιονικές, κατιονικές και αμφολυτικές ή επαμφοτερίζουσες, ανάλογα με το φορτίο που φέρει το επιφανειοδραστικό τμήμα του μορίου τους. Έτσι:

- στις ανιονικές, το υδρόφιλο τμήμα του μορίου φέρει αρνητικό φορτίο π.χ. Σάπωνες  $\text{RCOONa}$ ,  $\text{ROSO}_3\text{Na}$
- στις κατιονικές, το υδρόφιλο τμήμα του μορίου φέρει θετικό φορτίο π.χ. κατιόντα αμινών ή ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου  $\text{RN}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$
- στις επαμφοτερίζουσες, το φορτίο είναι αρνητικό ή θετικό ανάλογα με το pH. Στις ενώσεις αυτές υπάρχει συνήθως τεταρτοταγές άτομο αζώτου και καρβοξυλική ή σουλφονική ομάδα.

Στις μη ιονικές τασενεργές ουσίες το μόριο δεν έχει εντοπισμένο φορτίο, αλλά διασκορπισμένο σε διάφορες ομάδες του μορίου που αποτελούν το υδρόφιλο τμήμα του. Τέτοιες ομάδες μπορεί να είναι οξυαιθυλενικές  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_3$  κ.τ.λ.

Η δομή των ομάδων, που είναι κατάλληλες ως λυόφοβα τμήματα του τασενεργού μορίου, ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του διαλύτη και τις συνθήκες χρησιμοποίησης τους.

Το μόριο ενός τασενεργού, προσροφάται στην διεπιφάνεια γιατί ακριβώς υπάρχουν στο μόριο, το υδρόφοβο και το υδρόφιλο τμήμα. Ένα μόριο τασενεργού μπορεί να παρουσιαστεί ως εξής [225]:



**Σχήμα 7.1** Βασική δομή ενός τασενεργού.

### 7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χημεία και ιδιαίτερα στην ηλεκτροχημεία. Παρουσιάζουν πολλές δυνατότητες εφαρμογών την ηλεκτροχημεία, όπως για παράδειγμα στην ηλεκτρόλυση, στη διάβρωση, στις κυψέλες καυσίμου και στην ηλεκτροανάλυση [226]. Ιδιαίτερα, η χρήση τους στον τομέα της τροποποίησης των ηλεκτροδίων έχει μεγάλο ενδιαφέρον, λόγω της εφαρμογής τους στην κατασκευή βιοαισθητήρων [227-237].

Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και των διαφόρων επιφανειοδραστικών ουσιών έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Πρόσφατα ένας μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων μελετών, σχετικά με το θέμα της σύνδεσης του DNA με τις επιφανειοδραστικές ουσίες [238-255], αναφέρουν ότι το DNA μπορεί να σχηματίσει σταθερά σύμπλοκα με τις τασενεργές ουσίες, μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [256]. Έτσι, πολλοί ερευνητές, αξιοποιώντας την ισχυρή αυτή αλληλεπίδραση, προσπαθούν να βρουν την εφαρμογή της στην κατασκευή νέων τροποποιημένων ηλεκτροδίων με πολλαπλές εφαρμογές.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δίκλωνου DNA (dsDNA) και τριών διαφορετικών ειδών τασιενεργών: κατιονικών, ανιονικών και μη ιονικών, μελετήθηκαν με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας (CV), της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) και της φασματοσκοπίας ορατού -υπεριώδους (UV-vis) [241]. Πολυστρωματικές μεμβράνες, αποτελούμενες από το DNA και τις τασενεργές ουσίες, δημιουργήθηκαν σε ηλεκτρόδιο χρυσού (Au) διαμέσου ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Διαπιστώθηκε ότι το κατιονικό τασιενεργό, βρωμιούχο δεκαεξαλυκικό τριμεθυλαμμώνιο (CTAB), μπορεί να συνδεθεί με το DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενώ η αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων του σχηματιζόμενου συμπλόκου CTAB-DNA, υπό τη μορφή υμενίου, αυξάνει αρχικά και έπειτα μειώνεται με την συγκέντρωση του CTAB. Ως ανιονικά τασιενεργά χρησιμοποιήθηκαν γραμμικά σουλφονικά άλατα, (LAS), τα οποία επίσης συνδέονται με το NA, αλλά μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Στην περίπτωση, αυτή, η αντίσταση μεταφοράς των ηλεκτρονίων του σχηματιζόμενου συμπλόκου μειώνεται με τη συγκέντρωση των LAS. Τα μη-ιονικά τασιενεργά μπορούν επίσης να συνδέονται με το

DNA διαμέσου υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η χημική δομή του DNA παραμένει αμετάβλητη κατά την αλληλεπίδρασή του με αυτές τις τασιενεργές ουσίες.

Η αλληλεπίδραση του DNA με τις νέες gemini τασιενεργές ουσίες, R- $\alpha,\omega$ -( $C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_2Br^-$ )<sub>2</sub>, όπου (R =  $C_6H_{12}$ ,  $C_{12}H_{24}$ ,  $CH_2CHOHC_2H_4$  και  $CH_2C_6H_4CH_2$ ), και η κατασκευή υμενίων DNA-gemini επί της επιφανείας ενός ηλεκτροδίου χρυσού (Au) ερευνήθηκε με ηλεκτροχημικές τεχνικές όπως κυκλική βολταμετρία (CV) και ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης [257]. Διαπιστώθηκε ότι τα τασιενεργά αυτά συνδέονται με το DNA, διαμέσου ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ανάμεσα σε αυτά τα gemini επιφανειοδραστικά, τα  $C_6H_{12}$ -1 και 12 -( $C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_2Br^-$ )<sub>2</sub> συνδέονται με το DNA, κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αποδίδονται στην ισχυρή υδροφοβικότητα και ευελιξία των διαχωριστικών ομάδων τους, ενώ τα υπόλοιπα συνδέονται με το DNA, κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αποδίδονται στην σχετικά κακή υδροφοβικότητα και ευελιξία των διαχωριστικών ομάδων τους. Με βάση, λοιπόν, τις αλληλεπιδράσεις αυτές κατασκευάστηκαν τροποποιημένα ηλεκτρόδια χρυσού (Au). Σε γενικές γραμμές, η ακινητοποίηση του πρώτου στρώματος  $C_{16}$ -R- $C_{16}$  αλλάζει το φορτίο του υμενίου, ενώ το δεύτερο στρώμα  $C_{16}$ -R- $C_{16}$  αυξάνει την πυκνότητα του.

Μια απλή μέθοδος παρασκευής αισθητήρων αγγιστείας προτάθηκε από την ομάδα του Vagin [253]. Η ακινητοποίηση του ολιγονουκλεοτιδίου βασίζεται στην δέσμευσή του, μέσω της υδρογονανθρακικής αλυσίδας, στην υδρόφοβη περιοχή της διπλοστοιβάδας του τασιενεργού. Οι αποκρίσεις ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης (EIS). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ειδική DNA-αλληλουχία σύζευξης προκάλεσε τη μείωση της αντίστασης, η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου προκάλεσε την αύξηση της αντίστασης. Τα ληφθέντα αποτελέσματα δίνουν την ευκαιρία για την ανάπτυξη αισθητήρων συγγένειας εμπέδησης κατάλληλων για την κλινική ανάλυση ή για την ανίχνευση διαφόρων περιβαλλοντικών ρύπων.

Η ερευνητική ομάδα του Chang-Yin [228] μελέτησε ηλεκτροχημικά την αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και των μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών κυστών (niosomes) με μια απλή και νέα μέθοδο σχηματισμού niosomes επί της επιφάνειας ενός ηλεκτροδίου χρυσού (Au). Κάθε βήμα της τροποποίησης του ηλεκτροδίου ελέγχεται με τη βοήθεια

της κυκλικής βολταμετρίας (CV) και της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας σύνθετης αντίστασης (EIS). Η παρουσία της στοιβάδας της δεκαοκτυλικής θειόλης (ODT) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εισάγει ένα φραγμό στη διεπιφανειακή μεταβίβαση των ηλεκτρονίων (Ret) και η επακόλουθη ακινητοποίηση πiosomes επί της μονοστιβάδας αυτής (SAM) έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της αντίστασης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ret), λόγω της διπλής στιβάδας που σχηματίζεται, οπότε σχεδόν μπλοκάρεται οποιαδήποτε οξειδοαναγωγική δράση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Κατά την προσθήκη του DNA, η αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ret) μειώθηκε, υποδηλώνοντας ότι η φραγή της οξειδοαναγωγικής δράσης στην επιφάνεια του διαταράχθηκε. Μια καλή γραμμική σχέση μεταξύ της αντίστασης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ret) και της συγκέντρωσης του DNA βρέθηκε στην περιοχή 0 - 0,05 mg mL<sup>-1</sup>.

---

## 8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προκαταρκτικές μεθόδους ανάλυσης (screening methods) ενώσεων που παρουσιάζουν αγκιστεία με το DNA ή που προκαλούν βλάβες στο DNA (αντινεοπλασματικά φάρμακα, τοξικές ενώσεις). Χρησιμοποιούνται, επίσης, για την ταυτοποίηση διαφόρων μορφών του DNA, γονιδίων και για την αναγνώριση διαφόρων τροποποιήσεων του DNA, καθώς και στερεοχημικών αλλαγών που προκύπτουν από την επίδραση φαρμάκων πολλά από τα οποία χρησιμοποιούνται ως αντινεοπλασματικά.

Τα προτερήματα που καθιστούν ελκυστικούς τους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες είναι η ταχύτητα, η αμεσότητα, η εκλεκτικότητα, καθώς και η φθηνή και απλή οργάνολογία. Αντίθετα, το βασικότερο μειονέκτημα που συναντάται είναι η σχετικά υψηλή συγκέντρωση DNA που απαιτείται για έναν προσδιορισμό.

Η παρούσα διατριβή, λοιπόν, αποτελεί συμβολή στη μελέτη των ιδιοτήτων του DNA, καθώς πραγματεύεται την ανάπτυξη νέων ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων DNA με τη χρήση νανοϋλικών και συγκεκριμένα νανοσωλήνων άνθρακα με σκοπό την ελάττωση της απαιτούμενης συγκέντρωσης των βιομορίων και κατ' επέκταση τη βελτίωση των προοπτικών χρήσης της βολταμμετρίας στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (NAς).

Αρχικά, κατασκευάστηκαν τρία ηλεκτρόδια πάστας νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTPEs) χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς τύπους νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs), αντίστοιχα, οι οποίοι διέφεραν ως προς τις διαστάσεις τους. Ως συνδετικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ορυκτό έλαιο. Αφού βελτιστοποιήθηκε η αναλογία σκόνης νανοσωλήνων και ορυκτού ελαίου, πραγματοποιήθηκε τόσο ο ηλεκτροχημικός, όσο και ο οπτικός χαρακτηρισμός τους. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες προκατεργασίας των ηλεκτροδίων, αλλά και οι συνθήκες ακινητοποίησης του dsDNA στην επιφάνειά τους. Η αναλυτική συμπεριφορά των ηλεκτροδίων, στις επιλεγόμενες συνθήκες, διερευνήθηκε και οι μέθοδοι, που αναπτύχθηκαν, εφαρμόστηκαν σε δύο δείγματα DNA προερχόμενου από ήπαρ αρουραίου.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα ηλεκτρόδιο με εναπόθεση υμενίου υδραργύρου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MF / MWNTs / GCE). Ύστερα από μια προκαταρκτική μελέτη, η οποία αφορούσε στις συνθήκες εναπόθεσης του υδραργύρου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα, το οποίο είχε προηγουμένως μορφοποιηθεί με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs / GCE), το τελικό ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μονόκλωνου (ss) και δίκλωνου (ds) DNA, καθώς και για την ανάλυση ενζυμικά μεθυλιωμένου Jurkat DNA σε διαφορετικούς βαθμούς.

Κατόπιν, κατασκευάστηκε ένα ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων με τη χρήση του 1-βουτυλο-4-μεθυλοπυριδινικού εξαφθοροφωσφορικού ιοντικού υγρού ως συνδετικού μέσου (IL-CNTPE). Η αναλογία σκόνης νανοσωλήνων και ιοντικού υγρού βελτιστοποιήθηκε και ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός του ηλεκτροδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας (CV). Η επίδραση διάφορων παραγόντων στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά του dsDNA, όπως το pH και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού, αξιολογήθηκε και ακολούθως μελετήθηκαν και οι συνθήκες που επηρεάζουν την ακινητοποίησή του στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η αναλυτική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου, στις επιλεγόμενες συνθήκες, διερευνήθηκε και η μέθοδος, που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε σε δείγμα απομονωμένου DNA από υγιή εθελοντή.

Τέλος, ένα ηλεκτρόδιο πάστας γραφίτη άνθρακα μορφοποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/CPE) χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την περαιτέρω μορφοποίηση με κατιονικές τασενεργές ουσίες, όπως το βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (DTAB) και το βρωμιούχο τετραδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (TTAB). Η συγκέντρωση των διαλυμάτων των κατιονικών τασιενεργών ουσιών από τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσρόφηση τους διερευνήθηκε και επιλέχθηκε η βέλτιστη για το καθένα. Πραγματοποιήθηκε ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και των τριών ηλεκτροδίων (MWNTs/CPE, DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE) και ακολούθησε η αξιολόγηση διάφορων ηλεκτροχημικών παραμέτρων (pH και ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού) στην βολταμετρική συμπεριφορά του dsDNA. Μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες προκατεργασίας των ηλεκτροδίων, αλλά και οι

συνθήκες ακινητοποίησης του dsDNA στην επιφάνειά τους. Προσδιορίστηκαν, ακόμη, στις επιλεγόμενες συνθήκες, τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροδίων.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν παρατίθενται εκτενώς τα πειραματικά αποτελέσματα και η αξιολόγηση αυτών.



## II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 9. ΟΡΓΑΝΑ –ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ -ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

#### 9.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν :

- Ποτενσιοστάτης PalmSens με το αντίστοιχο λογισμικό για τον ηλεκτρονικό υπολογιστή (IVIUM Technologies, The Netherlands, [www.ivium.nl](http://www.ivium.nl)), για τις βολταμμετρικές μετρήσεις.
- Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) με εσωτερική διάμετρο του πλαστικού σωλήνα ίση με 3 mm και εξωτερική ίση με 6 ή 9 mm (Metrohm, Switzerland, [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)), ως ηλεκτρόδιο εργασίας.
- Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE), με διάμετρο ίση με 3 mm (Metrohm, Switzerland, [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)), ως ηλεκτρόδιο εργασίας.
- Ηλεκτρόδιο Ag / AgCl με κορεσμένο διάλυμα 3 mol/L KCl (Metrohm, Switzerland), ως ηλεκτρόδιο αναφοράς.
- Ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου (Metrohm, Switzerland), ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο.
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Metrohm, Switzerland), για ανάδευση των διαλυμάτων.
- Πεχάμετρο (Consort C830, Belgium, [www.consort.be](http://www.consort.be)), για μέτρηση του pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων.
- Vortex (Velp Scientifica, Italy, [www.velp.com](http://www.velp.com)), για την ανάδευση των διαλυμάτων των ολιγονουκλεοτιδίων.
- Φυγόκεντρος (Eppendorf 5417, Italy, [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)), για την κατεργασία των διαλυμάτων των ολιγονουκλεοτιδίων.

## 9.2 ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν :

-Σκόνη γραφίτη (Fluka, Buchs, Germany, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)), για τη σύνθεση της πάστας άνθρακα, καθαρότητας 99,9% και μέγεθος σωματιδίων < 0,1 mm.

-Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) από την εταιρεία Sigma-Aldrich, Seize, Germany:

α) MWNTs<sub>1</sub>: εξωτερικής διαμέτρου: 10-15 nm, εσωτερικής διαμέτρου 2-6 nm, μήκους 0,1-10μm, καθαρότητας >90%, β) MWNTs<sub>2</sub>: διαμέτρου: 110-170 nm, μήκους 5-9 μm, καθαρότητας >90%, γ) MWNTs<sub>3</sub>: εσωτερικής διαμέτρου: 6-13 nm, μήκους 2,5-20μm, καθαρότητας >99%.

- Ορυκτό έλαιο (mineral oil) (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)), για τη σύνθεση της πάστας άνθρακα.

- Διπλά απιονισμένο νερό ως διαλύτης.

-Οξέα, βάσεις και άλατα καθαρότητας pro analysi, για την παρασκευή διαλυμάτων:

- Χλωριούχο νάτριο (Merck, Darmstadt, Germany).
- Καυστικό νάτριο (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
- Νιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (Merck, Darmstadt, Germany).
- Μονόξινο φωσφορικό κάλιο (Merck, Darmstadt, Germany).
- Οξικό οξύ (Merck, Darmstadt, Germany).
- Φωσφορικό οξύ (Merck, Darmstadt, Germany).
- Χλωριούχο κάλιο (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ [EDTA] (Merck, Darmstadt, Germany).
- Τρι-υδροξυμεθυλο-αμινο-μεθάνιο [Tris] (Merck, Darmstadt, Germany).

- Ρυθμιστικό διάλυμα (κιτρικού οξέος-καυστικού νατρίου-υδροχλωρίου) με pH (20°C) = 4.01 (Merck, Darmstadt, Germany), για ρύθμιση του πεχαμέτρου.

-Ρυθμιστικό διάλυμα (μονόξινου φωσφορικού νατρίου-δισόξινου φωσφορικού νατρίου) με pH (20°C) = 7.01 (Merck, Darmstadt, Germany), για ρύθμιση του πεχαμέτρου.

-Απομονωμένο DNA από ιστούς και αίμα ανθρώπων, δωρεά του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας.

-Δίκλωνο DNA (deoxyribonucleic acid sodium salt) από θύμο αδένα βοοειδούς (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), για ανάλυση.

-Ενζυμικά μεθυλιωμένο DNA (CpG-methylated Jurkat Genomic DNA) το οποίο παράγεται από Jurkat κύτταρα αρρένων, μετά από ενζυμική μεθυλίωση με CpG μεθυλάση (M, SssI).

- Απομεθυλιωμένο DNA (5-Azadc treated Jurkat Genomic DNA) το οποίο παράγεται επίσης από Jurkat κύτταρα αρρένων, μετά από επεξεργασία με 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-Azadc). Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία, αυτή η επεξεργασία μπορεί να προκαλέσει μέχρι 70% απομεθυλίωση του DNA.

-Χλωριούχος υδράργυρος -HgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), για ανάλυση.

-1-βουτυλο-4-μεθυλοπυριδινικού εξαφθοροφωσφορικό ιοντικό υγρό (Aldrich, ≥97%).

-Βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (Fluka, ≥99%).

-Βρωμιούχο τετραδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (Fluka, ≥99%).

### **9.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA**

Το διάλυμα του μονόκλωνου ssDNA παρασκευάστηκε με βρασμό διαλύματος δίκλωνου dsDNA σε Eppendorf για 10 min και πολύ γρήγορη ψύξη για 20 min τουλάχιστον.

### **9.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ JURKAT DNA**

Για την παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν και μίγματα του ενζυμικά μεθυλιωμένου και απομεθυλιωμένου DNA. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα δείγματα: 0% μεθυλιωμένου και 100% απομεθυλιωμένου DNA, 10% μεθυλιωμένου και 90% απομεθυλιωμένου DNA, 20% μεθυλιωμένου και 80% απομεθυλιωμένου DNA, 30%

μεθυλιωμένου και 70% απομεθυλιωμένου DNA, 50% μεθυλιωμένου και 50% απομεθυλιωμένου DNA, 70% μεθυλιωμένου και 30% απομεθυλιωμένου DNA, 80% μεθυλιωμένου και 20% απομεθυλιωμένου DNA, 90% μεθυλιωμένου και 10% απομεθυλιωμένου DNA και 100% μεθυλιωμένου και 0% απομεθυλιωμένου DNA.

## 10. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ

### 10.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ηλεκτρόδια εργασίας κατασκευάστηκαν με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) τριών διαφορετικών τύπων με τα εξής χαρακτηριστικά :

α) MWNTs <sub>1</sub>: εξωτερικής διαμέτρου: 10-15 nm, εσωτερικής διαμέτρου 2-6 nm, μήκους 0,1-10μm, καθαρότητας >90%,

β) MWNTs <sub>2</sub>: διαμέτρου: 110-170 nm, μήκους 5-9 μm, καθαρότητας >90% και

γ) MWNTs <sub>3</sub>: εσωτερικής διαμέτρου: 6-13 nm, μήκους 2,5-20μm, καθαρότητας >99%

Τα ηλεκτρόδια πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (MWNTPEs) κατασκευάστηκαν με ανάμιξη, σε μια κάψα σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα και ορυκτού ελαίου μέχρι να σχηματιστεί ομογενοποιημένη πάστα.

Το περιεχόμενο των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) στα ηλεκτρόδια μεταβάλλοταν από 20% έως 60%. Η καλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε σε τελική αναλογία 55 % για τους νανοσωλήνες άνθρακα. Επομένως, η αναλογία σκόνης νανοσωλήνων και ορυκτού ελαίου επιλέχθηκε να είναι 55:45 (w/w) για τα περαιτέρω πειράματα και όλους τους τύπους των νανοσωλήνων.

Το συμβατικό ηλεκτρόδιο πάστας σκόνης γραφίτη άνθρακα (CPE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη, σε μια κάψα, σκόνης γραφίτη άνθρακα και ορυκτού ελαίου σε αναλογία 75:25 (w/w) μέχρι να σχηματιστεί μια ομογενοποιημένη πάστα.

Στη συνέχεια οι ομογενοποιημένες πάστες μεταφέρονταν μέσα στο ηλεκτρόδιο και η επιφάνεια του ηλεκτροδίου γυαλιζόταν με ειδικό χαρτί, για να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία

## 10.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- **Προκατεργασία των ηλεκτροδίων εργασίας**

Στις περισσότερες περιπτώσεις η προκατεργασία των ηλεκτροδίων περιλάμβανε την εφαρμογή σταθερού δυναμικού για ορισμένο χρόνο, χωρίς ανάδευση, σε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}+20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\text{NaCl}$ , (pH 5,00).

- **Ακίνητοποίηση του DNA**

Μετά την προκατεργασία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, το ηλεκτρόδιο εργασίας μεταφερόταν σε κυψελίδα που περιείχε το διάλυμα του dsDNA. Η ακίνητοποίησή του γινόταν με εφαρμογή σταθερού δυναμικού για ορισμένο χρόνο, υπό συνεχή ανάδευση.

- **Μετάλλαξη σήματος – Μέτρηση**

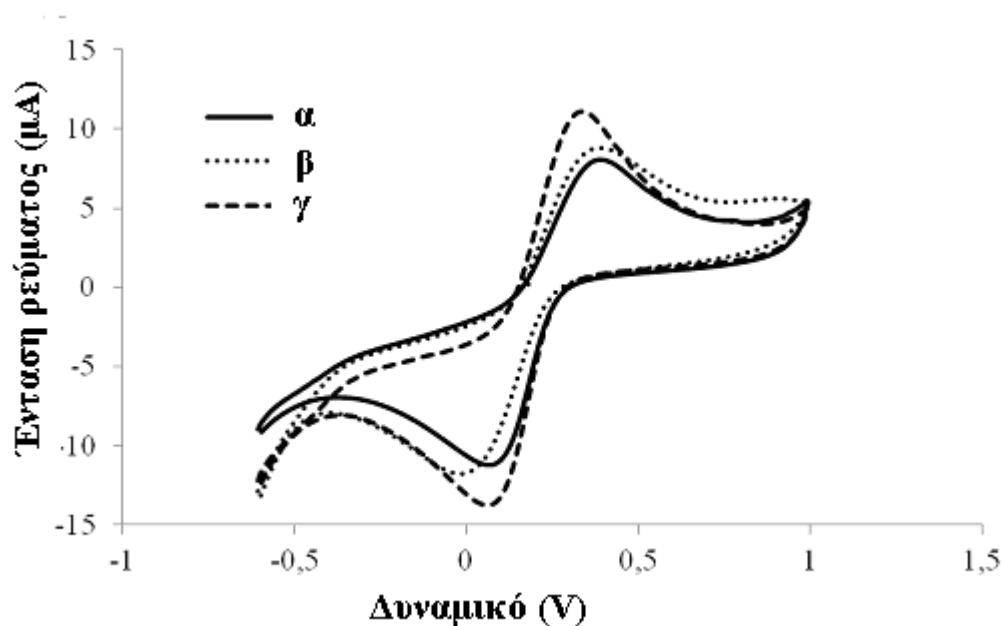
Μετά την ακίνητοποίηση του dsDNA, το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εκπλύθηκε με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα για 10 sec και μεταφέρθηκε σε κυψελίδα που περιείχε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα. Εφαρμόστηκε βολταμμετρία διαφορικού παλμού με σάρωση του δυναμικού από 0 V έως +1,4 V, ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού  $0,050 \text{ V s}^{-1}$ , δυναμικό παλμού 0,025 V, βήμα δυναμικού 0,005 V.

Στο συγκεκριμένο εύρος δυναμικού γίνεται οξείδωση των καταλοίπων γουανίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με +1,009V [258]. Η κορυφή οξείδωσης της γουανίνης χρησιμοποιήθηκε ως το υπό παρακολούθηση αναλυτικό σήμα.

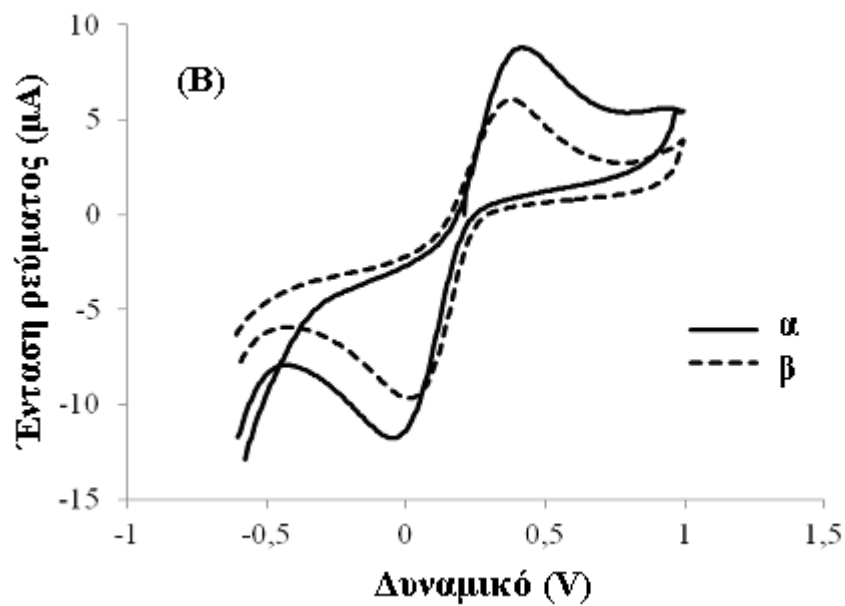
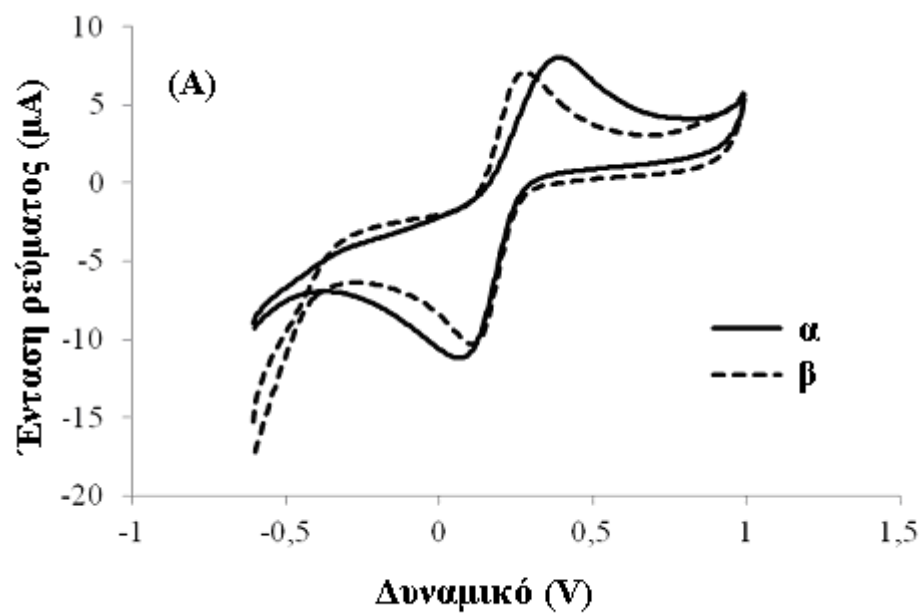
Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με αναγέννηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με κοπή και λείανσή της σε ένα ειδικό χαρτί. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν πριν από κάθε μέτρηση. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

### 10.3 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ (CNTPEs)

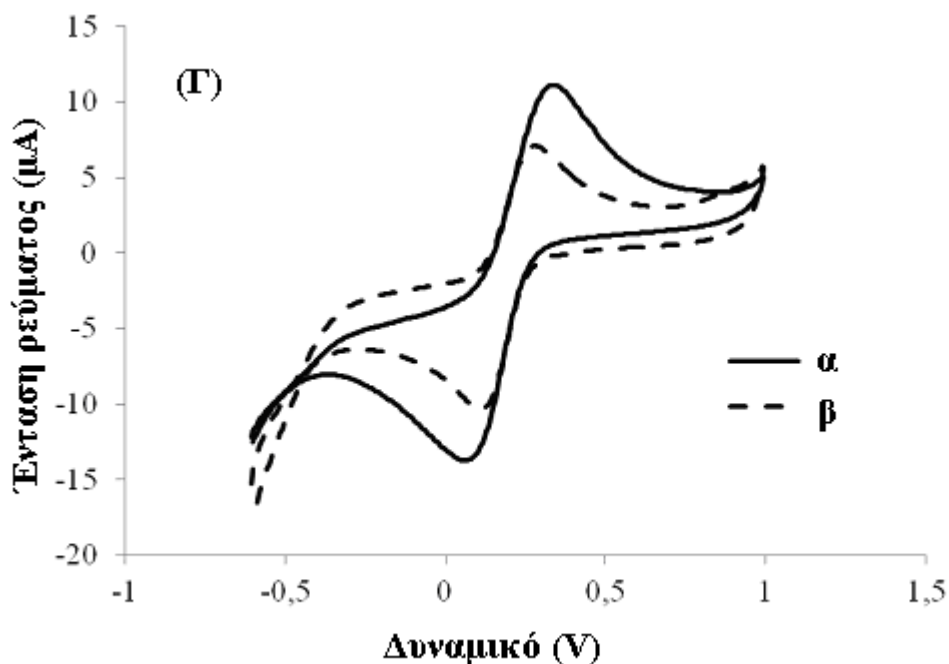
Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του οξειδοαναγωγικού συστήματος  $K_3[Fe(CN)_6]$  στους τρεις τύπους ηλεκτροδίων MWNTPEs ερευνήθηκε με κυκλική βολταμμετρία (Σχήμα 10.1). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 10.1, ένα καλά καθορισμένο ζεύγος οξειδοαναγωγικών κορυφών του  $K_3 [Fe(CN)_6]$  λαμβάνεται σε όλους τους τύπους των ηλεκτροδίων MWNTPEs, όπως υποδεικνύεται από τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της ανοδικής και της καθοδικής κορυφής ( $\Delta E_p$ ), η οποία είναι 275, 270 και 270 mV για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub> και MWNTPE<sub>3</sub>, αντίστοιχα.. Όταν το dsDNA ακινητοποιείται επί της επιφάνειας των ηλεκτροδίων MWNTPEs (Σχήμα 10.2 (Α, β), (Β, β), και (Γ, β)), οι κορυφές μειώνονται δραματικά, διότι η προσρόφηση του dsDNA στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων αναστέλλει την οξειδοαναγωγική διαδικασία του  $K_3 [Fe (CN)_6]$ .



**Σχήμα 10.1.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα των ηλεκτροδίων: α) MWNTPE<sub>1</sub>, β) MWNTPE<sub>2</sub>, και γ) MWNTPE<sub>3</sub> διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} KCl$ . Ταχύτητα σάρωσης δυναμικού :  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ .







**Σχήμα 10.2.** Κυκλικά βολταμογραφήματα (Aα, Βα, Γα) των ηλεκτροδίων: A) MWNTPE<sub>1</sub>, B) MWNTPE<sub>2</sub>, και Γ) MWNTPE<sub>3</sub> διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$  και κυκλικά βολταμογραφήματα (Aβ, Ββ, Γβ) έπειτα από ακινητοποίηση dsDNA. Το dsDNA ακινητοποιήθηκε επί των ηλεκτροδίων με εφαρμογή ενός δυναμικού  $0,5 \text{ V}$  επί  $300\text{s}$ , σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) που περιείχε  $140 \text{ mg L}^{-1} \text{ dsDNA}$ , υπό συνεχή ανάδευση. Ταχύτητα σάρωσης δυναμικού:  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ .

Με τη βοήθεια της εξίσωσης **Randles-Sevcik** :

$$I_p = 2.69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} \nu^{1/2} C \quad (10.1)$$

όπου,

$I_p$  : κορυφή ανοδικού ρεύματος, (A)

$n$  : αριθμός ηλεκτρονίων που μεταφέρονται

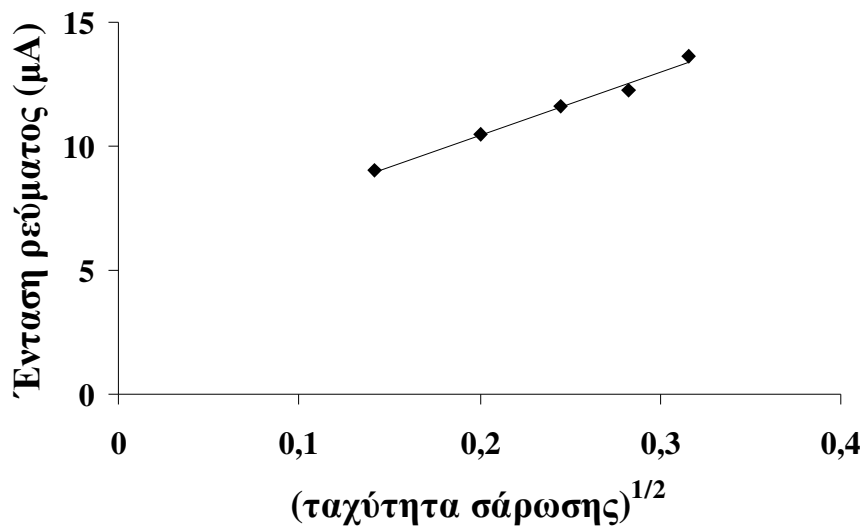
$A$  : γεωμετρική επιφάνεια, ( $\text{cm}^2$ )

$D_0$  : συντελεστής διάχυσης, ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )

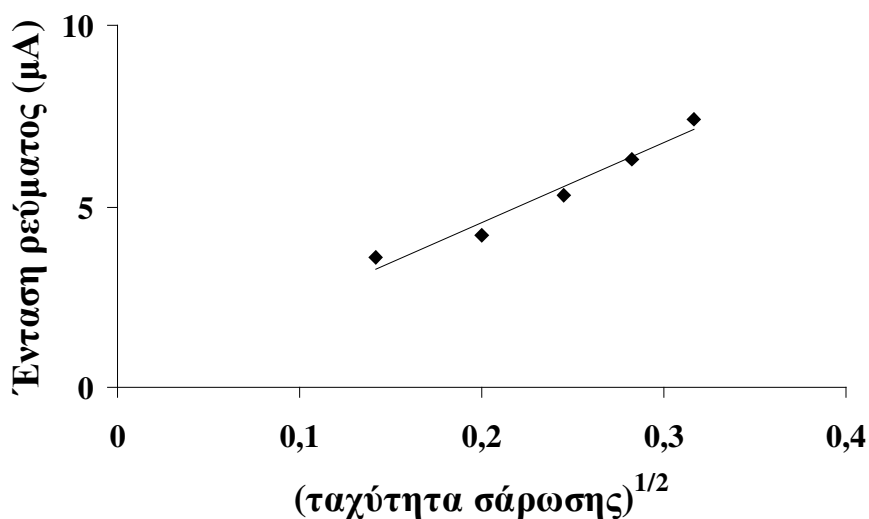
$C_0$  : Συγκέντρωση, ( $\text{mol cm}^{-3}$ )

προσδιορίστηκε η γεωμετρική επιφάνεια των ηλεκτροδίων CPE και MWNTPEs αντικαθιστώντας τις τιμές των  $D$ ,  $n$ ,  $\nu$  και  $C$ . Για το οξειδοαναγωγικό σύστημα που μελετήθηκε, ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ),  $n = 1$ ,  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , ενώ ο λόγος του ρεύματος

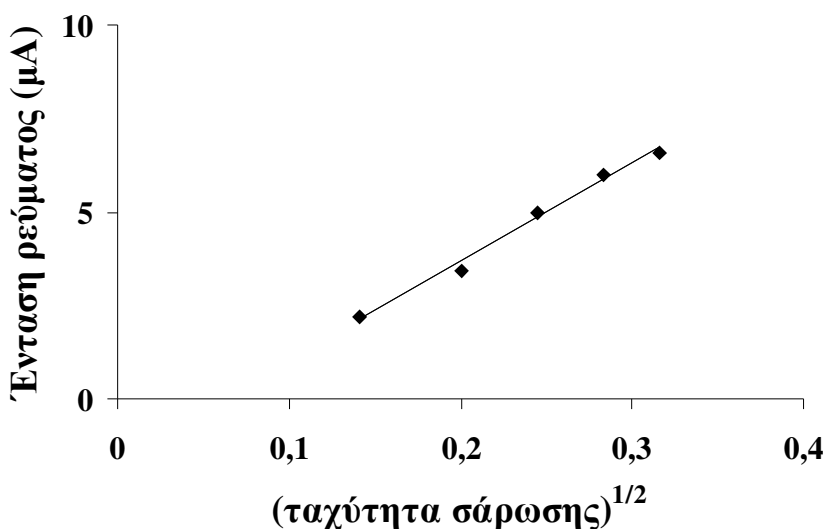
κορυφής προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού ( $I_p/v^{1/2}$ ) υπολογίστηκε από την κλίση των καμπυλών που δίνονται στα Σχήματα 10.3 έως 10.6.



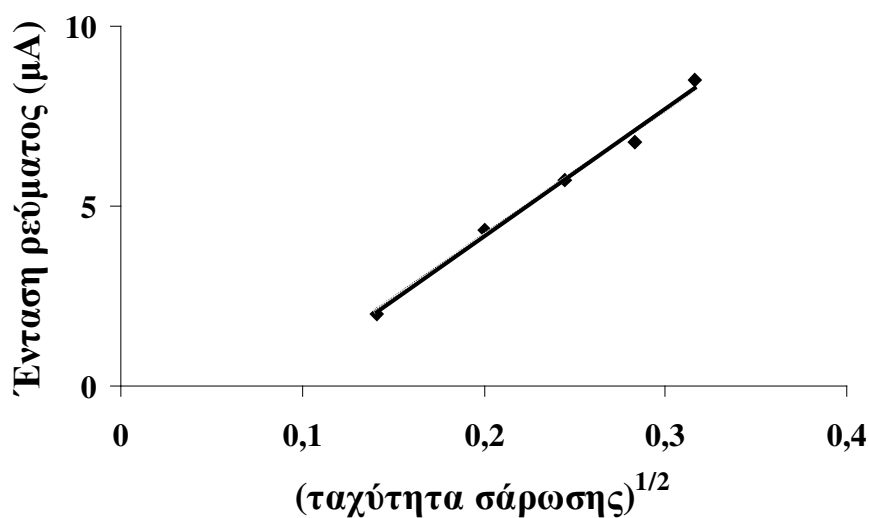
**Σχήμα 10.3.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  ηλεκτροδίου CPE με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.



**Σχήμα 10.4.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  ηλεκτροδίου MWNTPE<sub>1</sub> με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.



**Σχήμα 10.5.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  ηλεκτροδίου  $\text{MWNTPE}_2$  με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.



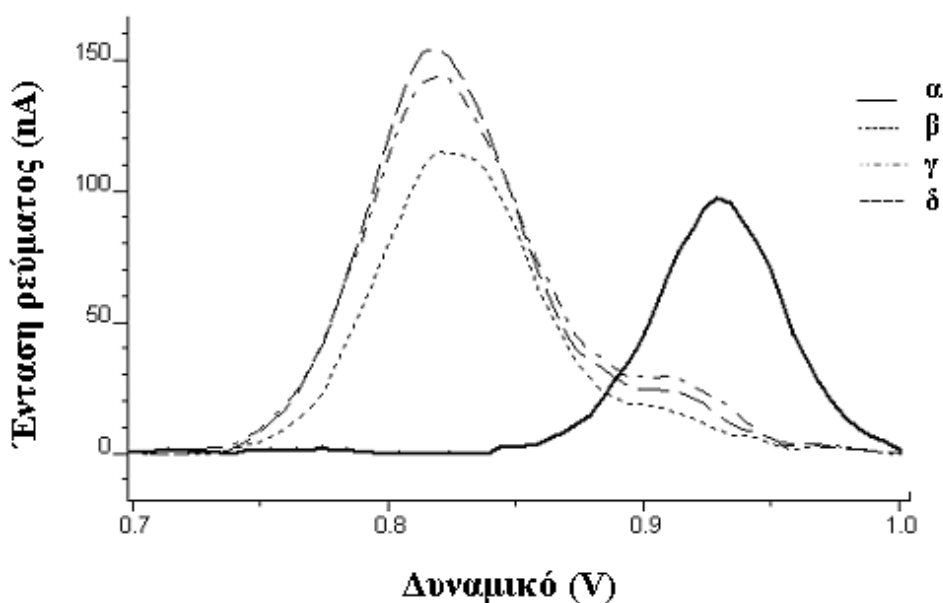
**Σχήμα 10.6.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  ηλεκτροδίου  $\text{MWNTPE}_3$  με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω οι γεωμετρικές επιφάνειες των ηλεκτροδίων CPE,  $\text{MWNTPE}_1$ ,  $\text{MWNTPE}_2$  και  $\text{MWNTPE}_3$  υπολογίστηκαν σε 0,029, 0,033, 0,035 και  $0,037 \text{ cm}^2$ , αντίστοιχα. Παρατηρούμε, ότι οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων είναι

μικρότερες από την επιφάνεια που υπολογίζεται με βάση τις διαστάσεις του ηλεκτροδίου.

#### 10.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ CPE ΚΑΙ MWNTPEs

Ουσιαστικές διαφορές στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA με χρήση βολταμμετρίας διαφορικού παλμού, παρατηρήθηκαν μεταξύ του συμβατικού ηλεκτροδίου CPE και των ηλεκτροδίων MWNTPEs (Σχήμα 10.7). Η προκατεργασία πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) για 20 s. Το dsDNA ακινητοποιήθηκε επί των προκατεργασμένων ηλεκτροδίων με εφαρμογή ενός δυναμικού  $0,5 \text{ V}$  επί 300s, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) που περιείχε  $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ dsDNA}$ , υπό συνεχή ανάδευση. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε σε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα.



**Σχήμα 10.7.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του dsDNA ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε διαφορετικά προκατεργασμένα ηλεκτρόδια :α) CPE β) MWNTPE<sub>1</sub>, γ) MWNTPE<sub>2</sub> και δ) MWNTPE<sub>3</sub>.

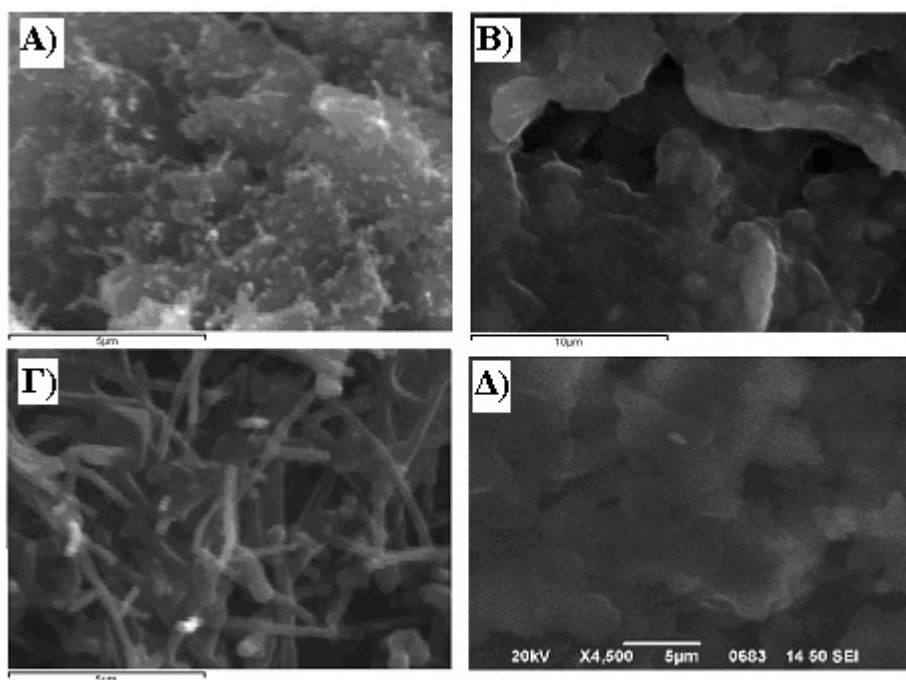
Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 10.7, η κορυφή οξειδωσης της γουανίνης εμφανίζεται αυξημένη κατά 25%, 53% και 59% για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub> και MWNTPE<sub>3</sub>, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο CPE στις ίδιες συνθήκες μέτρησης. Επιπλέον, μια μετατόπιση της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης σε αρνητικότερα δυναμικά στα ηλεκτρόδια MWNTPEs, παρατηρήθηκε σε σχέση με το ηλεκτρόδιο CPE σε αντίθεση με τα πειραματικά αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του Pedano και των συνεργατών του [68], οι οποίοι αναφέρουν ότι δεν υπάρχει σημαντική μετατόπιση στο δυναμικό της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης σε ηλεκτρόδιο MWNTPE σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο CPE.

## 10.5 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των επιφανειών των ηλεκτροδίων CPE και MWNTPEs μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (Σχήμα 10.8). Από το Σχήμα 10.8, είναι σαφές ότι υπάρχουν μορφολογικές διαφορές μεταξύ του ηλεκτροδίου CPE και των ηλεκτροδίων MWNTPEs. Το ηλεκτρόδιο CPE (Σχήμα 10.8Α) χαρακτηρίζεται από μια επιφάνεια που αποτελείται από ακανόνιστου σχήματος νιφάδες γραφίτη που συνθέτουν μια νανοδομή, σημαντική συνοχή και μικρό μέγεθος πόρων. Στα ηλεκτρόδια MWNTPEs, οι CNTs κατανέμονται ομοιογενώς εντός του ορυκτελαίου και ακόμη παρουσιάζουν μια πιο χαλαρή δομή από εκείνη του ηλεκτροδίου CPE.

Επιπλέον, οι τρεις τύποι ηλεκτροδίων MWNTPEs παρουσιάζουν διαφορετική συνοχή, δομή και μέγεθος πόρων (MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, MWNTPE<sub>3</sub>), όπως φαίνεται και στο Σχήμα (10.8Β), (10.8Γ) και (10.8Δ).

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του dsDNA επηρεάζεται ισχυρότερα από εκείνη του K<sub>3</sub> [Fe (CN)<sub>6</sub>] στα ηλεκτρόδια MWNTPEs. Πιθανότατα, η συνοχή, μαζί με το μέγεθος των πόρων και τη δομή επηρεάζουν ισχυρότερα την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του dsDNA στα ηλεκτρόδια MWNTPEs από τις διαστάσεις των ίδιων των νανοσωλήνων. Είναι προφανές, ότι όλα αυτά τα χαρακτηριστικά είναι παρόμοια για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>2</sub> και MWNTPE<sub>3</sub> και επιτρέπουν μεγαλύτερο αριθμό μορίων DNA να διεισδύσει μέσα στους πόρους των ηλεκτροδίων και να προσροφηθεί στους τοίχους και τα άκρα των νανοσωλήνων, σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>1</sub>.



**Σχήμα 10.8.** Εικόνες SEM για τα ηλεκτρόδια :A) CPE, B) MWNTPE<sub>1</sub>, Γ) MWNTPE<sub>2</sub> και Δ) MWNTPE<sub>3</sub>.

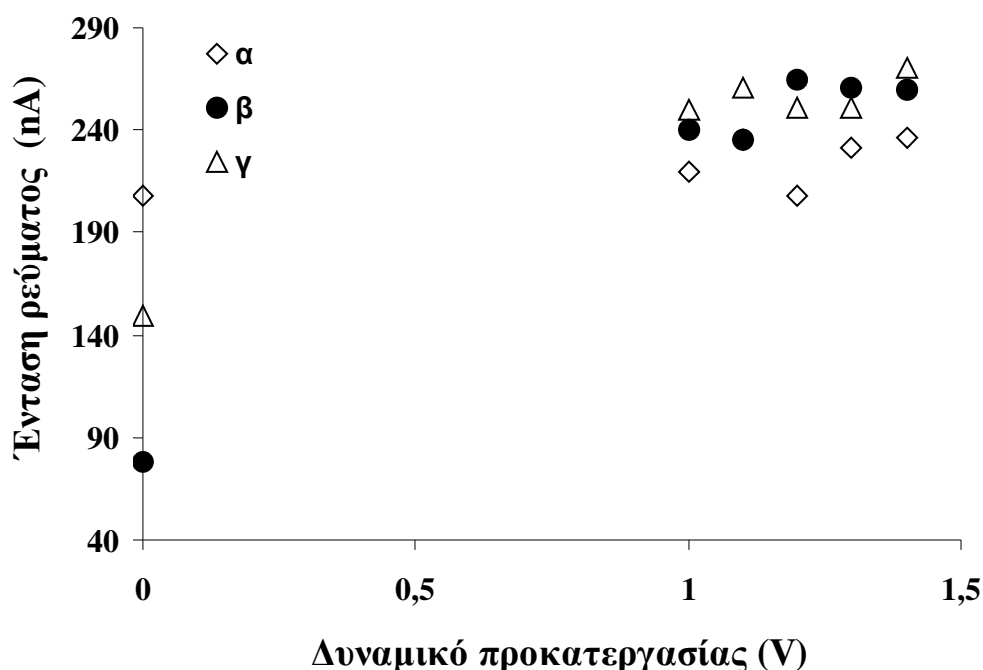
## 10.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ

Γενικά, η προκατεργασία των CNTs απαιτείται, ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητες μεταφοράς ηλεκτρονίων, να εξαλειφθούν οι μεταλλικές προσμίξεις και ακόμη για να επιτευχθεί μια περαιτέρω ενεργοποίηση. Ενεργοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με κατεργασία σε όξινα διαλύματα, είτε με ηλεκτροχημική προκατεργασία-ποτενσιοστατική ή ποτενσιοδυναμική [259].

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ποτενσιοστατική μέθοδος για την ενεργοποίηση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων.

Το Σχήμα 10.9 δείχνει την επίδραση του δυναμικού προκατεργασίας, στην κορυφή οξείδωσης της γουανίνης του dsDNA, το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια των προκατεργασμένων ηλεκτροδίων, με χρήση βολταμετρίας διαφορικού παλμού. Εφαρμόζοντας την ποτενσιοστατική μέθοδο προκατεργασίας το ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης αυξάνεται σε πιο θετικά δυναμικά. Με βάση, λοιπόν, τα χαρακτηριστικά της κορυφής της γουανίνης, τα δυναμικά

προκατεργασίας για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, και MWNTPE<sub>3</sub> επιλέχθηκαν να είναι ίσα με + 1,4 V, 1,3 V + και + 1,4 V, αντίστοιχα.



**Σχήμα 10.9.** Επίδραση του δυναμικού προκατεργασίας στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) σε ηλεκτρόδια : α) MWNTPE<sub>1</sub>, β) MWNTPE<sub>2</sub>, γ) MWNTPE<sub>3</sub>. Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00), χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V. Η προκατεργασία πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό για 20 s στο καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα.

Διαφορετικοί χρόνοι ενεργοποίησης που κυμάνθηκαν από 10 έως 60 s μελετήθηκαν εφαρμόζοντας τα παραπάνω επιλεγμένα δυναμικά. Το dsDNA ακινητοποιήθηκε επί των προκατεργασμένων ηλεκτροδίων με εφαρμογή ενός δυναμικού 0,5 V επί 300s, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) που περιείχε  $140 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA, υπό συνεχή ανάδευση (λεπτομέρειες στην παράγραφο 10.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων οι βέλτιστοι χρόνοι προκατεργασίας είναι 40 s, 30 s και 40 s για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub> και MWNTPE<sub>3</sub>, αντίστοιχα.

## 10.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Η ακινητοποίηση του dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο στη συνολική απόδοση του ηλεκτροχημικού προσδιορισμού. Η ακινητοποίησή του μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσροφήσή του από ένα αναδεδυμένο διάλυμά του [68]. Οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραπάνω διαδικασία (δυναμικό και χρόνος προσρόφησης) μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την πιο ευαίσθητη τεχνική της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού.

### 10.7.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του δυναμικού ακινητοποίησης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης του dsDNA αξιολογήθηκε και παρουσιάζεται στον πίνακα 10.1. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε  $140 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NaCl (pH 5,00). Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 10.1, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης, όταν το δυναμικό ακινητοποίησης μεταβάλλεται από 0 έως 0,6 V. Αυτό συνεπάγεται ότι το δυναμικό ακινητοποίησης δεν επηρεάζει την προσρόφηση του dsDNA στα ηλεκτρόδια MWNTPEs, σε αντίθεση με την εξάρτηση του δυναμικού που παρατηρείται για τη συσσώρευση του DNA σε ηλεκτρόδια CPE, η οποία ενοείται σε θετικά δυναμικά. Η προσρόφηση του dsDNA στην επιφάνεια MWNTPEs δεν είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, αλλά οφείλεται, κυρίως, στις υδρόφοβες ομάδες του πυρενίου, που προσροφώνται στα πλευρικά τοιχώματα του γραφίτη [68,260].

Συνεπώς, δυναμικά ίσα με 0,20 V, 0,30 V, και 0,30 V επιλέχθηκαν ως βέλτιστα δυναμικά ακινητοποίησης για τα ηλεκτρόδια MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, MWNTPE<sub>3</sub>, αντίστοιχα.

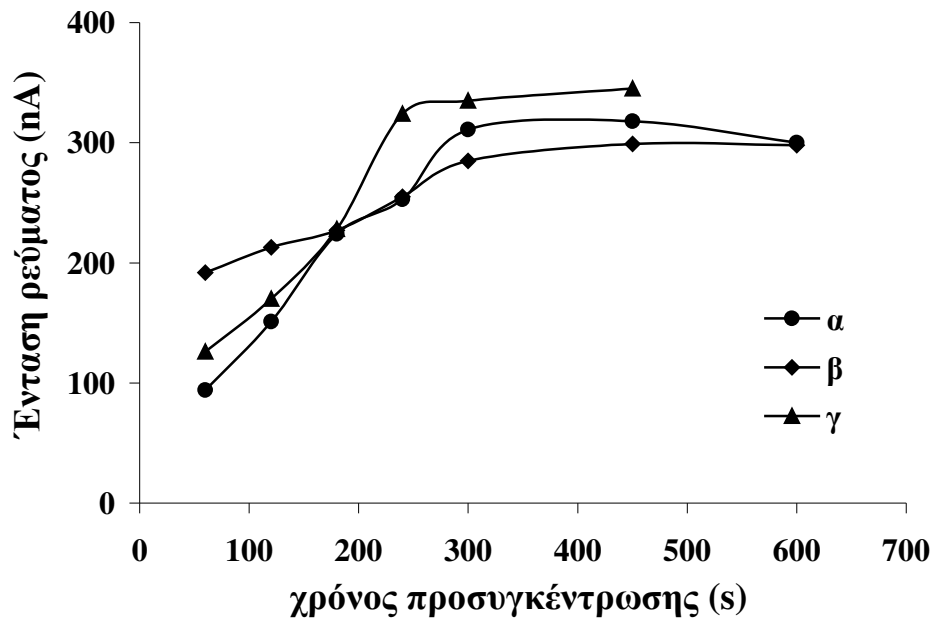


**Πίνακας 10.1:** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) σε ηλεκτρόδια : α) MWNTPE<sub>1</sub>, β) MWNTPE<sub>2</sub>, γ) MWNTPE<sub>3</sub>. Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH- CH<sub>3</sub>COONa  $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00), χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s, προκατεργασία: α) 1,4 V για 40 s, β) 1,3V για 30 s γ) 1,4 V για 40 s στο φέροντα ηλεκτρολύτη.

Δυναμικό προσυγκέντρωσης (V)	Ένταση ρεύματος (nA)		
	MWNTPE <sub>1</sub>	MWNTPE <sub>2</sub>	MWNTPE <sub>3</sub>
0	273	290	341
0,1	220	280	316
0,2	281	301	305
0,3	263	328	348
0,4	245	316	332
0,5	274	330	322
0,6	207	340	330

### 10.7.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα οξείδωσης της γουανίνης μελετήθηκε στο διάστημα 0 – 600 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH- CH<sub>3</sub>COONa  $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) που περιείχε  $140 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA (Σχήμα 10.10). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 10.10, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, από 60 έως 300 s, το ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης αυξάνεται, ενώ σε χρόνους προσυγκέντρωσης μεγαλύτερους των 300 s το ύψος της κορυφής σταθεροποιείται. Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγονται τα 300 s.



**Σχήμα 10.10.** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα *dsDNA* ( $140 \text{ mg L}^{-1}$ ) και σε ηλεκτρόδια : α) *MWNTPE*<sub>1</sub>, β) *MWNTPE*<sub>2</sub>, γ) *MWNTPE*<sub>3</sub>. Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  ( $\text{pH } 5,00$ ), δυναμικό προσυγκέντρωσης : α)  $0,2 \text{ V}$ , β)  $0,3 \text{ V}$  και γ)  $0,3 \text{ V}$ , προκατεργασία: α)  $1,4 \text{ V}$  για  $40 \text{ s}$ , β)  $1,3 \text{ V}$  για  $30 \text{ s}$  γ)  $1,4 \text{ V}$  για  $40 \text{ s}$  στο φέροντα ηλεκτρολύτη.

## 10.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Στις επιλεγόμενες συνθήκες η αναλυτική συμπεριφορά των ηλεκτροδίων *MWNTPEs* διερευνήθηκε.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του *dsDNA* με το ηλεκτρόδιο *MWNTPE*<sub>1</sub> σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 10.2.

**Πίνακας 10.2:** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV).

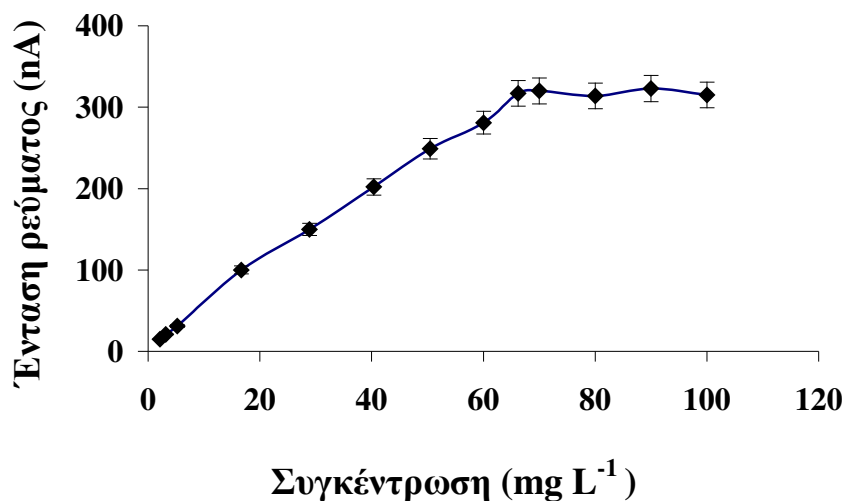
Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV)	
Παράμετροι μέτρησης	Επιλεγόμενες συνθήκες
$E_{\text{cond}}$ (δυναμικό προκατεργασίας)	1,400 V
$t_{\text{cond}}$ (χρόνος προκατεργασίας)	40 s
$E_{\text{dep}}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0,200 V
$t_{\text{dep}}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	300 s
$E_{\text{begin}}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{\text{end}}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{\text{step}}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{\text{pulse}}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{\text{pulse}}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 V s <sup>-1</sup>

Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 10.11. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 10.11 η ένταση του ρεύματος οξειδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA, μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 66,22 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

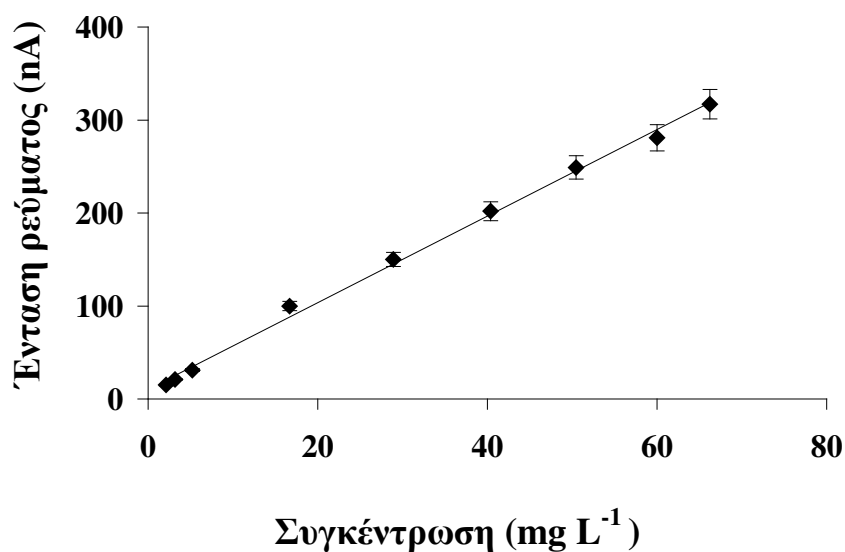
Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από 3,16 έως 66,2 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 10.12) εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 4,650 (\pm 0,097) \gamma \text{ (dsDNA)} + 10,67 (\pm 3,73), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,997.

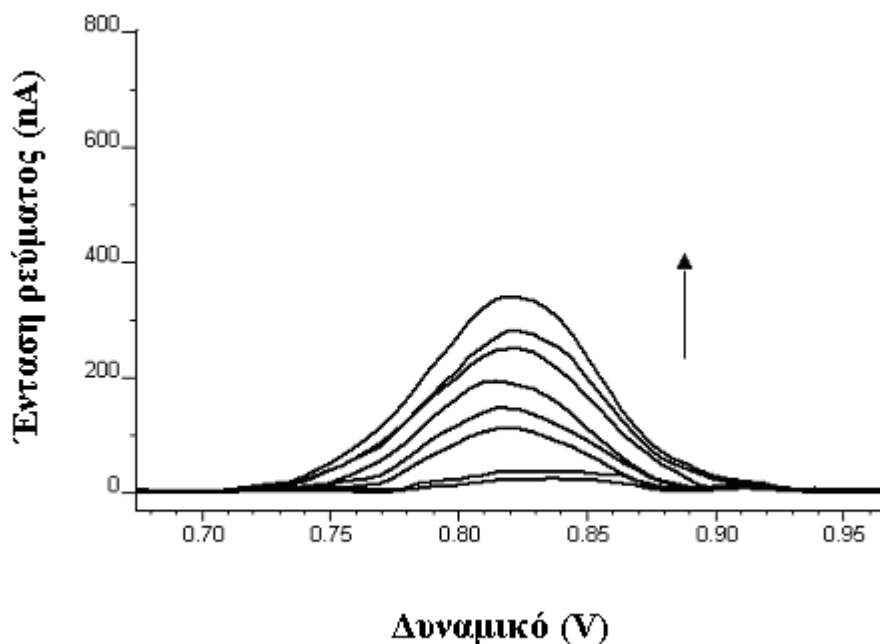


**Σχήμα 10.11.** Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>1</sub>. Ο Πίνακας 10.2 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες.



**Σχήμα 10.12.** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>1</sub>. Ο Πίνακας 10.2 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Στο Σχήμα 10.13 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 10.13.** Σειρά βολταμμογραφημάτων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA στο ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>1</sub>. Ο Πίνακας 10.2 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση:

$$c_L = \frac{3s_\beta}{\alpha} \quad (10.2)$$

όπου:

$s_\beta$ : η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς με τον άξονα των y και

$\alpha$ : η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

ως  $2,64 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση:

$$c_q = \frac{10s_\beta}{\alpha} \quad (10.3)$$

όπου:

$s_\beta$ : η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς με τον άξονα των y και

$\alpha$ : η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

ως  $8,018 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίστηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 10.3.

**Πίνακας 10.3** Μετρήσεις επαναληψιμότητας (n=6)

Συγκέντρωση ( $\text{mgL}^{-1}$ )	5,22	40,36	66,22
$s_r(\%)$	8,83	6,39	5,04

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>2</sub> σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 10.4.

**Πίνακας 10.4:** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV).

<b>Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV)</b>	
<b>Παράμετροι μέτρησης</b>	<b>Επιλεγόμενες συνθήκες</b>
$E_{\text{cond}}$ (δυναμικό προκατεργασίας)	1,300 V
$t_{\text{cond}}$ (χρόνος προκατεργασίας)	30 s
$E_{\text{dep}}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0,300 V
$t_{\text{dep}}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	300 s
$E_{\text{begin}}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{\text{end}}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{\text{step}}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{\text{pulse}}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{\text{pulse}}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 $\text{V s}^{-1}$

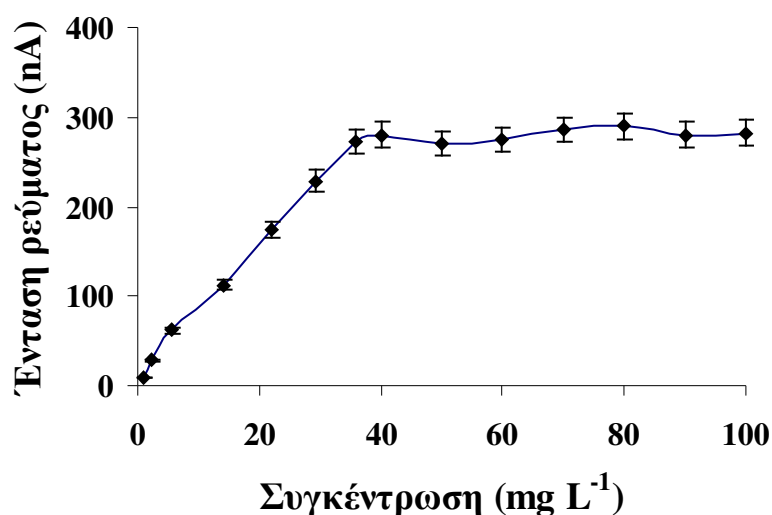
Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες, δίνεται στο Σχήμα 10.14. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 10.14, η ένταση

του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 35,73 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

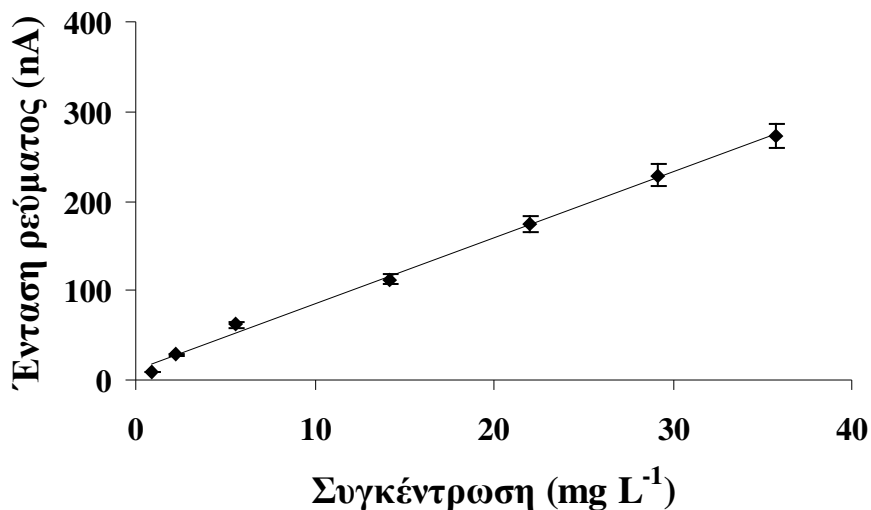
Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από 2,24 έως 35,73 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 10.15) εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 6,94 (\pm 4,25) \gamma \text{ (dsDNA)} + 23,58 (\pm 0,195) , I_p : \text{nA}, \gamma : \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,996.

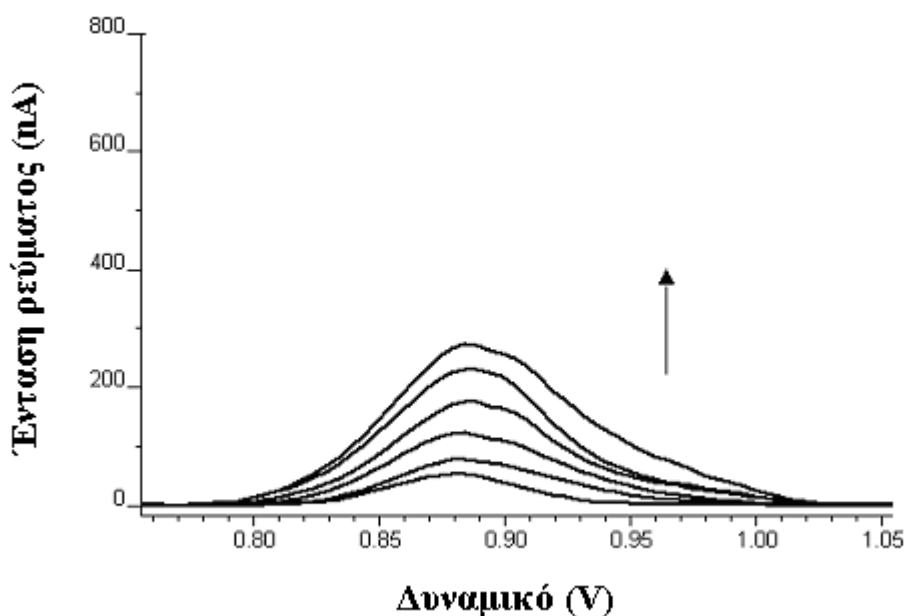


**Σχήμα 10.14.** Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>2</sub>. Ο Πίνακας 10.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



**Σχήμα 10.15.** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>2</sub>. Ο Πίνακας 10.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Στο σχήμα 10.16 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 10.16.** Σειρά βολταμμογραφήματων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>2</sub>. Ο Πίνακας 10.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $2,02 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $6,12 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίστηκε, επίσης, η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 10.5.

**Πίνακας 10.5 :** Μετρήσεις επαναληψιμότητας

Συγκέντρωση ( $\text{mgL}^{-1}$ )	5,54	14,14	35,73
$s_r(\%)$	8,48	6,18	2,37

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub> σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 10.6.

**Πίνακας 10.6:** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (*AdsTDPV*).

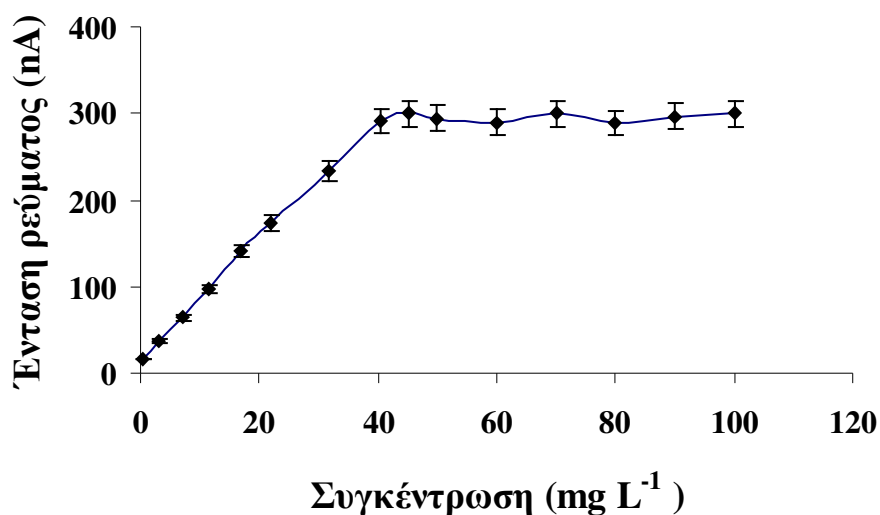
<b>Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (<i>AdsTDPV</i>)</b>	
<b>Παράμετροι μέτρησης</b>	<b>Επιλεγόμενες συνθήκες</b>
$E_{\text{cond}}$ (δυναμικό προκατεργασίας)	1,400 V
$t_{\text{cond}}$ (χρόνος προκατεργασίας)	40 s
$E_{\text{dep}}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0,300 V
$t_{\text{dep}}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	300 s
$E_{\text{begin}}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{\text{end}}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{\text{step}}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{\text{pulse}}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{\text{pulse}}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 $\text{V s}^{-1}$

Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 10.17. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 10.17, η ένταση του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με  $40,36 \text{ mg L}^{-1}$ . Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

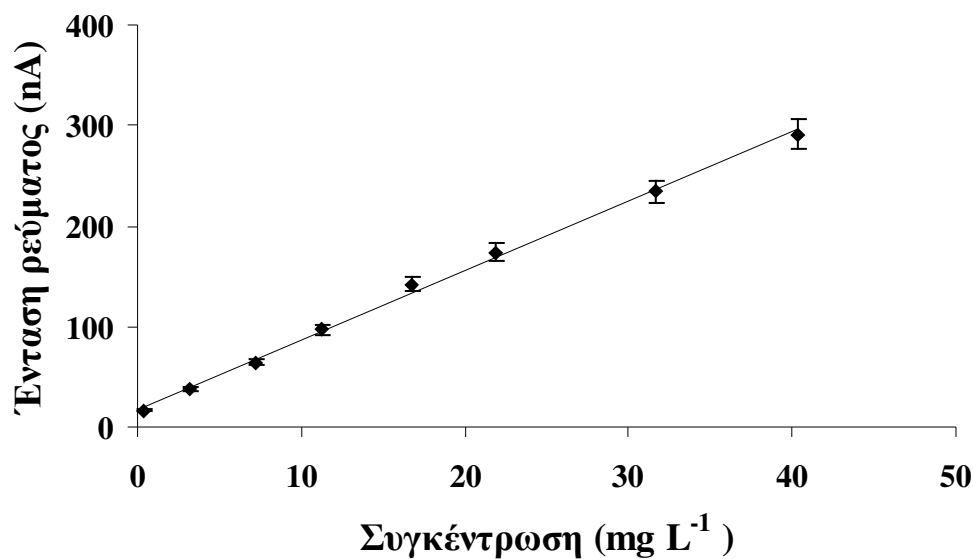
Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από  $0,35$  έως  $40,36 \text{ mg L}^{-1}$ . Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 10.18) εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 6,89 (\pm 0,14) \gamma (\text{dsDNA}) + 17,60 (\pm 3,06) , I_p: \text{nA}, \gamma : \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με  $0,997$ .

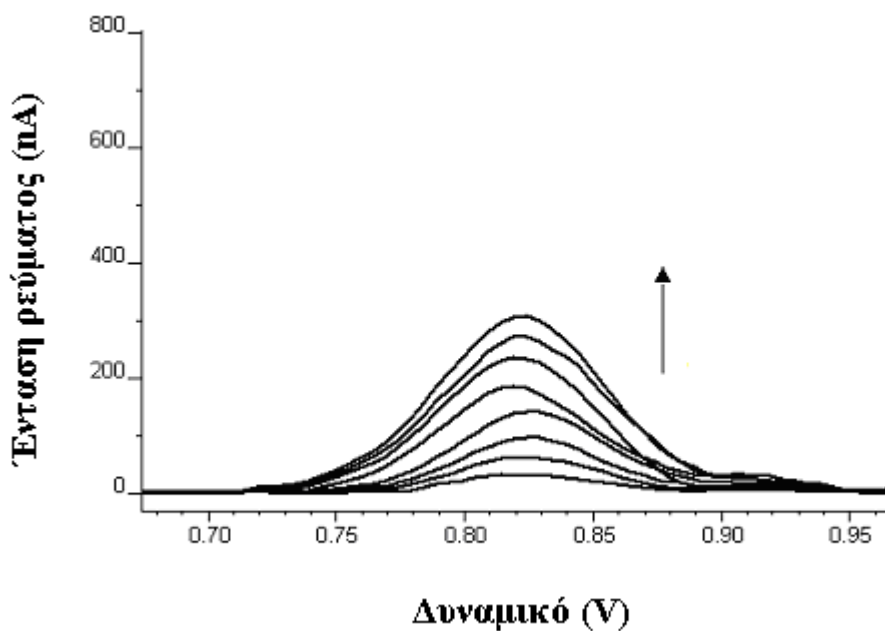


**Σχήμα 10.17.** Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub>. Ο Πίνακας 10.6 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



**Σχήμα 10.18** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub>. Ο Πίνακας 10.6 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Στο σχήμα 10.19, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 10.19.** Σειρά βολταμμογραφημάτων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA με το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub>. Ο Πίνακας 10.6 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου, που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $1,46 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $4,44 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίστηκε, επίσης, η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 10.7.

**Πίνακας 10.7.** Μετρήσεις επαναληψιμότητας ( $n=6$ ).

Συγκέντρωση ( $\text{mgL}^{-1}$ )	3,16	16,69	40,36
$s_r(\%)$	8,33	5,32	2,00

## 10.9 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

DNA προερχόμενο από ήπαρ αρουραίου (δύο δείγματα) χρησιμοποιήθηκε για να δοκιμαστεί η εφαρμοσιμότητα των μεθόδων που αναπτύχθηκαν.

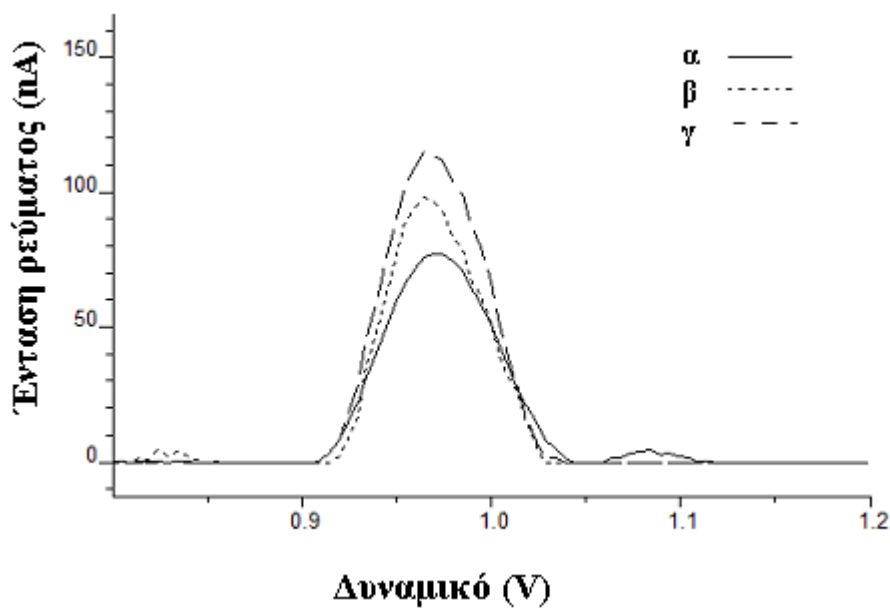
### 10.9.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε την αρχική διάλυσή του σε διάλυμα  $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl +  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  EDTA, (pH 8,00) και τη μετέπειτα αραίωσή του με το φέροντα ηλεκτρολύτη ( $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  +  $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NaCl (pH 5,00). Η ακινητοποίηση του DNA και η μέτρηση πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στους πίνακες 10.2, 10.4 και 10.6.

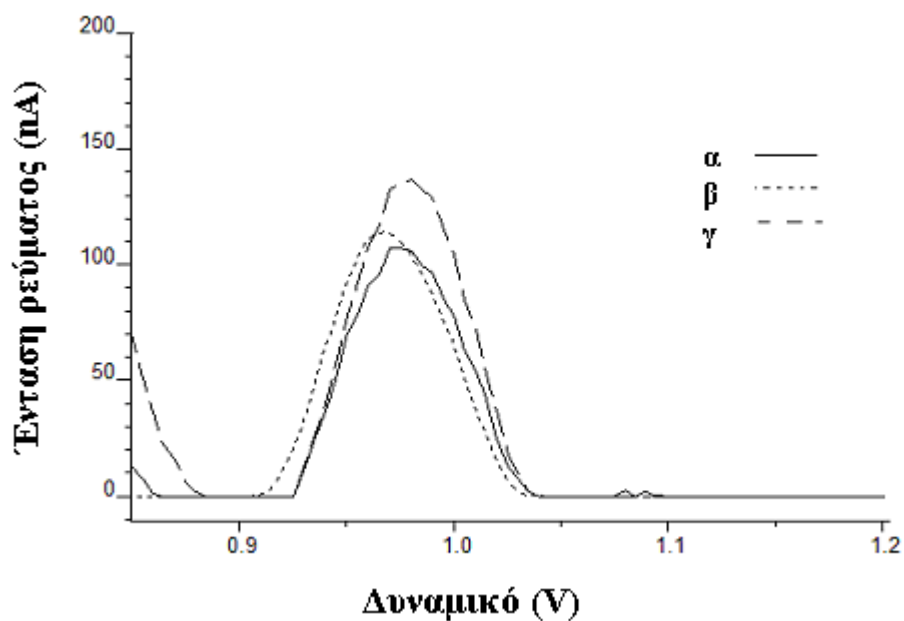
Για την αποφυγή των παρεμποδίσεων, ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης πρότυπου διαλύματος dsDNA.

### 10.9.2 Προσδιορισμός DNA

Στα Σχήματα 10.20 και 10.21 δίνονται τα βολταμμογράφημα των δυο δειγμάτων DNA που προέκυψαν με εφαρμογή των παραπάνω συνθηκών. Όπως φαίνεται εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με 0,96 V.



**Σχήμα 10.20.** Βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού δείγματος DNA απομονωμένου από ήπαρ αρουραίου στα ηλεκτρόδια : α) MWNTPE<sub>1</sub>, β) MWNTPE<sub>2</sub>, γ) MWNTPE<sub>3</sub>. Συνθήκες όπως αναφέρονται στους Πίνακες 10.2, 10.4 και 10.6.



**Σχήμα 10.21.** Βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού δείγματος DNA απομονωμένου από ήπαρ αρουραίου, στα ηλεκτρόδια : α) MWNTPE<sub>1</sub>, β) MWNTPE<sub>2</sub>, γ) MWNTPE<sub>3</sub>. Συνθήκες όπως αναφέρονται στους Πίνακες 10.2, 10.4 και 10.6.

Στον Πίνακα 10.7 παρατίθενται τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων.

**Πίνακας 10.7.** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων.

Ποσότητα dsDNA (μg)	MWNTPE <sub>1</sub>	MWNTPE <sub>2</sub>	MWNTPE <sub>3</sub>
Δείγμα 1	49,8±0,2	49,5±0,2	49,1±0,3
Δείγμα 2	47,5±0,2	47,8±0,3	47,3±0,2

## 10.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Συνοψίζοντας, συμπεραίνουμε ότι, οι νανοσωλήνες άνθρακα σε συνδυασμό με την προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdSTV), είναι κατάλληλοι για τον προσδιορισμό του dsDNA. Η απόδοση και των τριών τύπων νανοσωλήνων άνθρακα διευρύνθηκε και διαπιστώθηκε αύξηση του σήματος οξείδωσης της γουανίνης σε σύγκριση με εκείνο που λαμβάνεται με τα συμβατικά ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPEs). Μεταξύ των τριών ηλεκτροδίων MWNTPEs, το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub> επέδειξε την καλύτερη ηλεκτροχημική συμπεριφορά, λόγω της καταλληλότερης δομής και μεγέθους των πόρων. Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, μπορούν να ανιχνευθούν πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μετά από σύντομους χρόνους ακινητοποίησης και με τα τρία ηλεκτρόδια MWNTPEs (MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, MWNTPE<sub>3</sub>) με όρια ανίχνευσης ίσα με 2,64 mg L<sup>-1</sup>, 2,02 mg L<sup>-1</sup> και 1,46 mg L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

## **11. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΥΜΕΝΙΟ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ**

### **11.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ**

Τα δύο ηλεκτρόδια εργασίας κατασκευάστηκαν με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με τα εξής χαρακτηριστικά : διάμετρος 110-170 nm, μήκος 5-9  $\mu\text{m}$  και καθαρότητα >90%.

Η προκατεργασία των MWNTs πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία :

σε κωνική φιάλη διασπείρονται 0,15 g MWNTs σε 80 mL διαλύματος αποτελούμενο από μίγμα πυκνού  $\text{H}_2\text{SO}_4$ / πυκνού  $\text{HNO}_3$ , με αναλογία 3:1 (v/v) με την επίδραση λουτρού υπερήχων για 3 h στους 50  $^{\circ}\text{C}$ . Ακολούθησε αραίωση σε 250 mL ύδατος Milli-Q και διήθηση υπό κενό με χρήση φίλτρων οξικής κυτταρίνης μεγέθους 0.2  $\mu\text{m}$ , πλύση με υπερκάρθαρο νερό Milli-Q, έως ότου το pH του διηθήματος γίνει ίσο με 7,0. Τέλος, το προκύπτον προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται για 22 h στους 90  $^{\circ}\text{C}$ . Το εναιώρημα των MWNTs παρασκευάστηκε με διασπορά 1 mg των MWNTs σε 1 mL οργανικού διαλύτη N, N-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) με την επίδραση λουτρού υπερήχων για 15 min.

### **11.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

#### **11.2.1 Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/GCE)**

Πριν από την τροποποίηση, το ηλεκτρόδιο GC γυαλίζεται με πάστα αλουμίνας ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ξεπλένεται με διπλά απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο ζέσεως που περιέχει διπλά απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  με την επίδραση λουτρού υπερήχων για 15 min.



Το ηλεκτρόδιο MWNTs / GCE κατασκευάστηκε με εμποτισμό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου GC με 3,0  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος MWNTs και εξάτμιση του διαλύτη.

### **11.2.2 Υμένιο υδραργύρου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MF/MWNTs/GCE)**

Το υμένιο υδραργύρου εναποτέθηκε ηλεκτρολυτικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE, εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό  $-0,6\text{ V}$  για  $180\text{ s}$ , υπό συνεχή ανάδευση, από ένα διάλυμα που περιείχε  $0,01\text{ mol L}^{-1}\text{ HgCl}_2$  σε διάλυμα HCl-KCl (pH 3,11), σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται στην παράγραφο 11.4.

## **11.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **11.3.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών εναπόθεσης του υδραργύρου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE**

Η εναπόθεση του υδραργύρου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό για ορισμένο χρόνο, με συνεχή ανάδευση, από ένα διάλυμα που περιείχε ορισμένη ποσότητα  $\text{HgCl}_2$  σε διάλυμα HCl-KCl (pH 3,11). Το διάλυμα στη συνέχεια αφήνονταν να ηρεμήσει για  $30\text{ s}$  και καταγραφόταν το βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού με σάρωση του δυναμικού από  $-0,6\text{V}$  έως  $0,1\text{ V}$ , δυναμικό παλμού  $0,025\text{ V}$ , βήμα δυναμικού  $0,005\text{ V}$  και ταχύτητα σάρωσης δυναμικού  $0,050\text{ V s}^{-1}$ .

Στο συγκεκριμένο εύρος δυναμικού γίνεται οξείδωση του Hg σε δυναμικό περίπου ίσο με  $-0,10\text{ V}$ .

Για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, στο ίδιο ηλεκτρόδιο, εφαρμόστηκε δυναμικό ίσο με  $0,10\text{ V}$  για  $60\text{ s}$  για την απομάκρυνση προηγούμενων εναποθέσεων.

### **11.3.2 Ηλεκτροχημική ανάλυση του DNA**

Το DNA προσροφήθηκε στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια από ένα διάλυμα  $5\text{ }\mu\text{L}$  ( $10^{-3}\text{ x mol L}^{-1}\text{ Tris-HCl} + 0,2\text{ mol L}^{-1}\text{ NaCl}$ , pH 7,5), το οποίο βρισκόταν σε παραφίλμ, για  $60\text{ s}$ . Μετά την ακινητοποίηση του DNA, το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο MF/MWNTs/GCE εκπλύθηκε με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα για  $10\text{ s}$ . Στη συνέχεια

το ηλεκτρόδιο μεταφερόταν στην κυψελίδα, που περιείχε καθαρό απαερωμένο ρυθμιστικό διάλυμα και καταγράφονταν το βολταμμογράφηνα τετραγωνικού παλμού με σάρωση του δυναμικού από  $-0,1$  V έως  $-1,6$  V, δυναμικό παλμού  $0,025$  V, βήμα δυναμικού  $0,005$  V και συχνότητα  $10$  Hz (εκτός και αν αναφέρεται διαφορετική τιμή της συχνότητας). Το δυναμικό προκατεργασίας ήταν  $-0,1$  V και ο χρόνος προκατεργασίας ήταν  $15$  s.

## 11.4 ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της εναπόθεσης υδραργύρου στο ηλεκτρόδιο MWNTs / GCE πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ηλεκτροχημικές διαδικασίες.

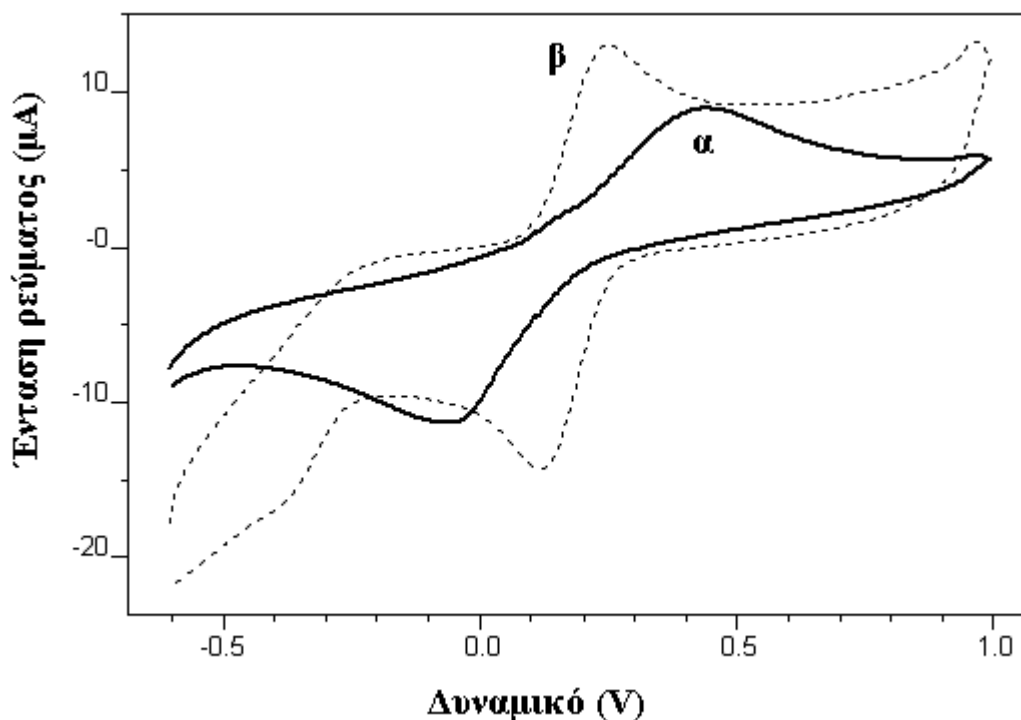
### 11.4.1 Βολταμμετρική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του οξειδοαναγωγικού συστήματος  $K_3[Fe(CN)_6]$  στο ηλεκτρόδιο GC και στο ηλεκτρόδιο MWNTs/GCE ερευνήθηκε με κυκλική βολταμμετρία (Σχήμα 11.1). Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $0,2$  mol L<sup>-1</sup> KCl. Η συγκέντρωση του  $K_3[Fe(CN)_6]$  ήταν  $10^{-6} \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από  $-0,6$  V έως  $+1,0$  V, ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,1$  V s<sup>-1</sup>.

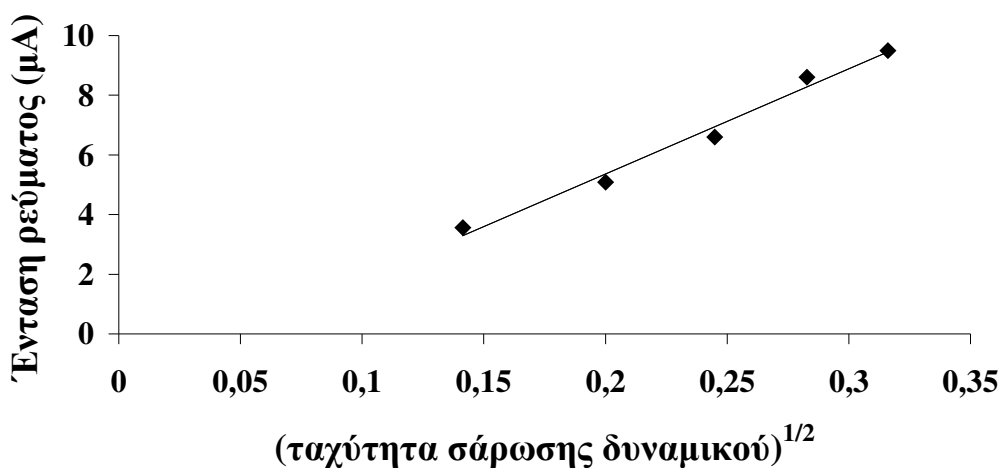
Όπως φαίνεται και από το Σχήμα.11.1, στο ηλεκτρόδιο GCE (καμπύλη α) εμφανίζεται ένα ζεύγος σαφώς καθορισμένων βολταμμετρικών κορυφών με το δυναμικό της καθοδικής κορυφής ( $E_{pc}$ ) στα  $-0,041$  V και το δυναμικό της ανοδικής κορυφής ( $E_{pa}$ ) στα  $0,049$  V. Με τη χρήση του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE (καμπύλη β) οι εντάσεις των ρευμάτων των αντίστοιχων κορυφών αυξήθηκαν, ενώ η τιμή της διαφοράς δυναμικού μεταξύ ανοδικής και καθοδικής κορυφής ( $\Delta E_p$ ) μειώθηκε από τα  $460$  mV στα  $110$  mV.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης Randles-Sevcik (Σχέση 10.1) προσδιορίστηκε η γεωμετρική επιφάνεια του ηλεκτροδίου GCE και του ηλεκτροδίου MWNTs/GCE, αντικαθιστώντας τις τιμές των  $D$ ,  $n$ ,  $\nu$  και  $C$ . Για το οξειδοαναγωγικό σύστημα που μελετήθηκε, ( $K_3 [Fe(CN)_6]$ ),  $n = 1$ ,  $D = 7,6 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, ο λόγος του ρεύματος κορυφής προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού ( $I_p / \nu^{1/2}$ ), για το ηλεκτρόδιο GCE, υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης που δίνεται στο

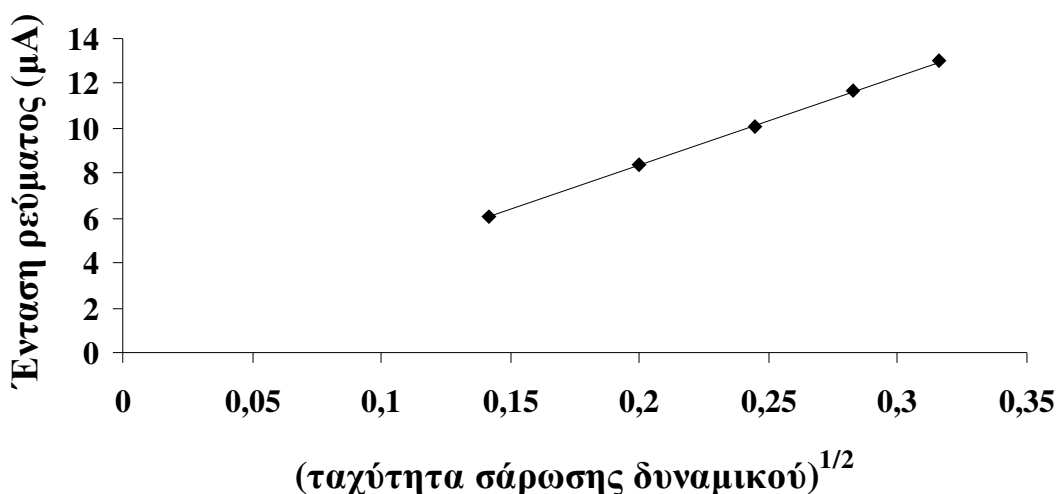
Σχήμα 11.2, ενώ για το ηλεκτρόδιο MWNTs/GCE από την κλίση της καμπύλης που δίνεται στο Σχήμα 11.3.



**Σχήμα 11.1.** Κυκλικά βολταμογραφήματα σε ηλεκτρόδιο GCE (α) και MWNTs/GCE (β) διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ .



**Σχήμα 11.2.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$  σε ηλεκτρόδιο GCE, με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.



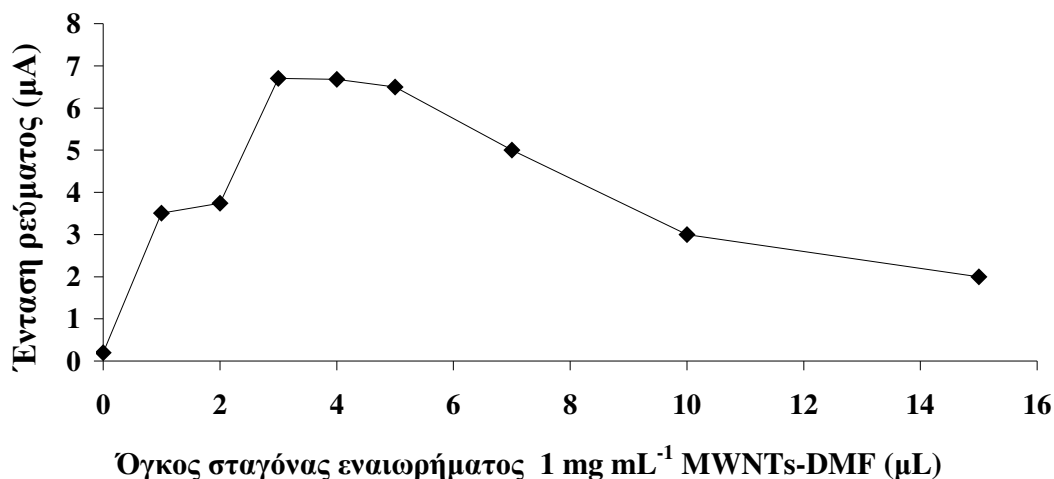
**Σχήμα 11.3.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$  σε ηλεκτρόδιο MWNTs/GCE, με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω οι γεωμετρικές επιφάνειες των ηλεκτροδίων GCE και MWNTs/GCE υπολογίστηκαν σε  $0,047$  και  $0,054 \text{ cm}^2$ , αντίστοιχα. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι η εναπόθεση MWNTs στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου GCE, ενισχύει την απόκριση του οξειδοαναγωγικού συστήματος ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) αυξάνοντας τα ρεύματα κορυφών ενώ παράλληλα η ηλεκτροδιακή δράση γίνεται πιο ανιστρεπτή.

#### 11.4.2 Επίδραση του πάχους του υμενίου MWNTs-DMF

Ο όγκος της σταγόνας του εναιωρήματος MWNTs-DMF, που εναποτίθεται επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου GCE, καθορίζει το πάχος του υμενίου MWNTs-DMF. Έτσι, μελετήθηκε η απόκριση των ρευμάτων κορυφής οξείδωσης του στοιχειακού Hg για διάφορους όγκους σταγόνας εναιωρήματος MWNTs- DMF. Καθώς ο όγκος της σταγόνας του εναιωρήματος MWNTs- DMF αυξάνει από  $1$  έως  $3 \mu\text{L}$  (Σχήμα 11.4), η ένταση της κορυφής οξείδωσης του στοιχειακού Hg αυξάνει, ενώ σε όγκους σταγόνας μεγαλύτερους των  $3 \mu\text{L}$  το ύψος της κορυφής σταθεροποιείται και στη συνέχεια μειώνεται. Παρά το γεγονός ότι, οι MWNTs παρουσιάζουν πολύ καλή αγωγιμότητα και ικανότητα να προωθούν τη μεταφορά ηλεκτρονίων, το DMF είναι ένας μονωτής με αποτέλεσμα να μειώνεται η ηλεκτρική αγωγιμότητα του υμενίου που σχηματίζεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε αντίθεση, το ρεύμα κορυφής

μειώνεται όταν το υμένιο MWNTs- DMF είναι πολύ παχύ λόγω της αυξημένης αντίστασης ή της μείωσης του ρυθμού μεταφοράς φορτίου [261,262].

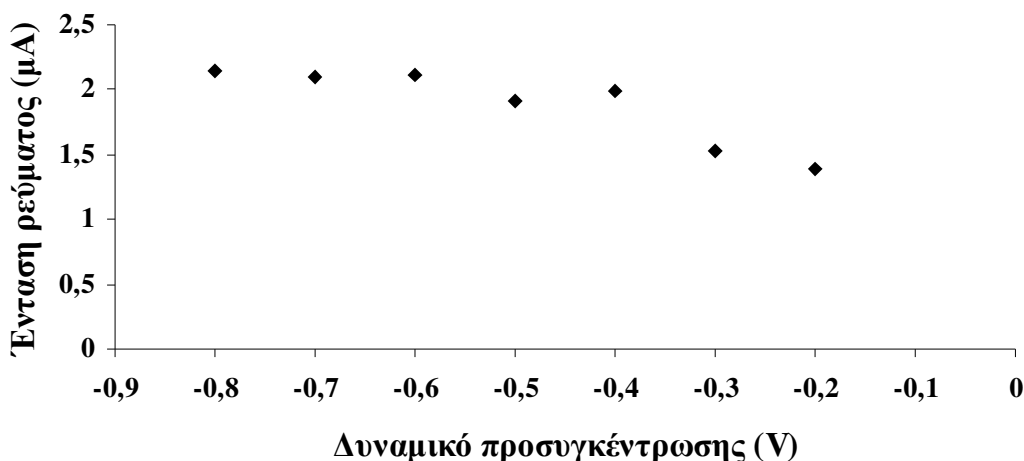


**Σχήμα 11.4.** Μεταβολή της έντασης της κορυφής οξείδωσης του Hg ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) για διάφορους όγκους του εναιωρήματος MWNTs-DMF ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Δυναμικό προσυγκέντρωσης :  $-0,6 \text{ V}$  , χρόνος προσυγκέντρωσης :  $180 \text{ s}$ . Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.1.

#### 11.4.3 Επίδραση του δυναμικού, του χρόνου προσυγκέντρωσης και της συγκέντρωσης του $\text{Hg}^{2+}$

Η επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης του Hg μελετήθηκε στο διάστημα από  $-0,2 \text{ V}$  έως  $-0,8 \text{ V}$  και παρουσιάζεται στο Σχήμα 11.5. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε  $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  σε διάλυμα HCl-KCl (pH 3,11). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 11.5, το ρεύμα κορυφής αυξανόταν, με την αύξηση του δυναμικού από  $-0,2 \text{ V}$  έως  $-0,6 \text{ V}$ . Σε δυναμικά προσυγκέντρωσης αρνητικότερα από  $-0,6 \text{ V}$ , το ρεύμα κορυφής σταθεροποιείται.

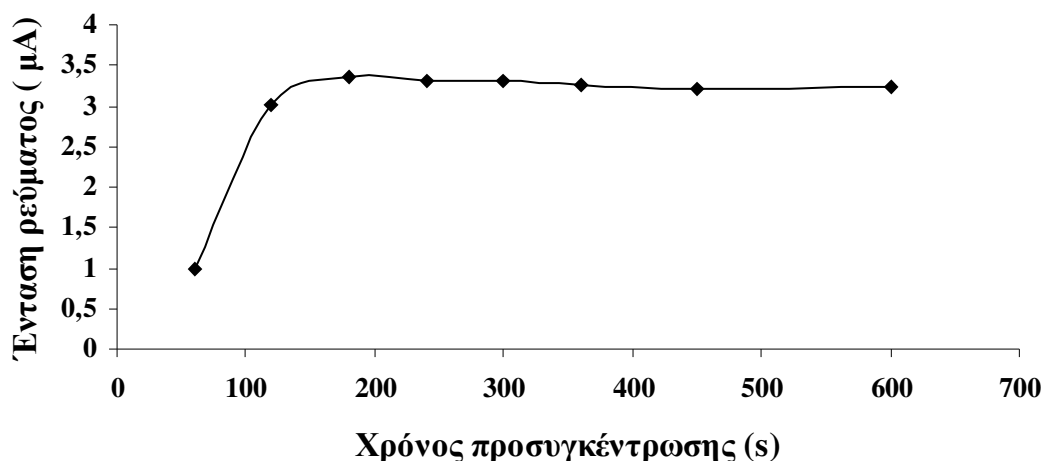
Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα επιλέχθηκε δυναμικό προσυγκέντρωσης ίσο με  $-0,6 \text{ V}$ .



**Σχήμα 11.5.** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης του Hg ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Χρόνος προσυγκέντρωσης : 180 s, όγκος σταγόνας εναιωρήματος MWNTs-DMF : 3  $\mu\text{L}$ . Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.1.

Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα οξείδωσης του Hg μελετήθηκε στο διάστημα 60 – 600 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl (pH 3,11) που περιείχε  $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ HgCl}_2$  (Σχήμα 11.6). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 11.6, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, από 0-180 s, το ύψος της κορυφής οξείδωσης του Hg αυξάνεται. Σε χρόνους προσυγκέντρωσης μεγαλύτερους των 180 s το ύψος της κορυφής παραμένει σταθερό. Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγονται τα 180 s.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του  $\text{HgCl}_2$  στο ρεύμα οξείδωσης του Hg σε ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl (pH 3,11). Ο χρόνος προσυγκέντρωσης ήταν 180 s και το δυναμικό προσυγκέντρωσης ήταν  $-0,6\text{V}$ , ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες μέτρησης αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ένταση του ρεύματος οξείδωσης του Hg αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του  $\text{HgCl}_2$  μέχρι η τελική συγκέντρωση του  $\text{HgCl}_2$  να γίνει ίση με  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας. Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγεται συγκέντρωση  $\text{HgCl}_2$  ίση με  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .



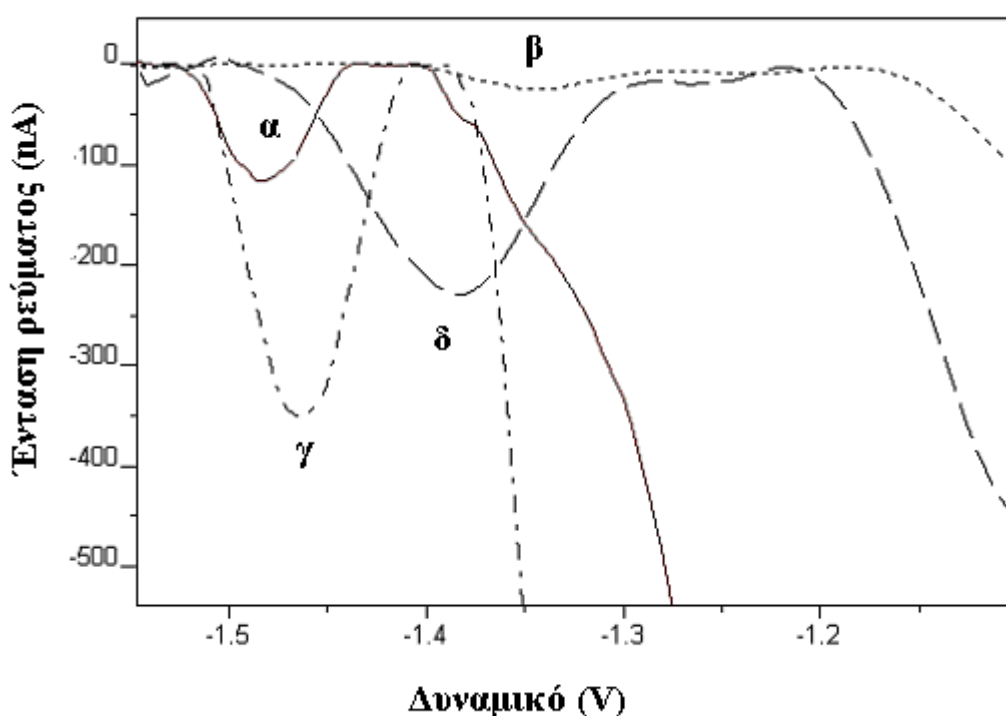
**Σχήμα 11.6.** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης του Hg ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Δυναμικό προσυγκέντρωσης : - 0,6V, όγκος σταγόνας εναιωρήματος MWNTs-DMF :3  $\mu\text{L}$ . Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.1.

## 11.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ss ΚΑΙ dsDNA

Όπως προαναφέρθηκε, στα νουκλεϊκά οξέα, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, η αδενίνη και η κυτοσίνη παράγουν μια ενιαία καθοδική κορυφή γύρω στα  $-1,4\text{V}$  (κορυφή CA). Ένας σημαντικός παράγοντας για την αναγωγή των βάσεων του DNA είναι η πρωτονίωσή τους και η προσρόφησή τους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Έτσι, τα αναγωγικά αυτά σήματα εξαρτώνται από το pH και από την παρουσία αλάτων [263]. Με απουσία κατιόντων, το πολυανιονικό DNA θα απωθηθεί έντονα, σε ουδέτερο pH, από το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Ωστόσο, ορισμένα κατιόντα μεγάλου μεγέθους ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) έχουν θετικά αποτελέσματα επί του σχηματισμού των καθοδικών κορυφών του DNA [263,264].

Γενικά, στα ηλεκτρόδια υδραργύρου το ss και το dsDNA παράγουν διαφορετικά ηλεκτροχημικά σήματα. Χρησιμοποιώντας το ηλεκτρόδιο MF / GCE, ως ηλεκτρόδιο εργασίας, σε φέροντα ηλεκτρολύτη με ουδέτερο pH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  ρυθμιστικό διάλυμα,  $\text{pH } 7,00 + 0,3 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCOONH}_4$ ) οι μετρήσεις με βολταμετρία τετραγωνικού παλμού έδειξαν μια αναγωγική κορυφή στα  $-1,46 \text{ V}$  για το ssDNA και μια αναγωγική κορυφή στα  $-1,34 \text{ V}$  για το dsDNA (Σχήμα 11.7α, β). Αντιθέτως, χρησιμοποιώντας το ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE, ως ηλεκτρόδιο εργασίας, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, εμφανίστηκε για το ssDNA μια

κορυφή στα -1,46 V και για το dsDNA μια κορυφή στα -1,38 V (Σχήμα 11.7γ, δ). Από το Σχήμα 11.7, φαίνονται οι σημαντικές διαφορές, στις ηλεκτροχημικές αποκρίσεις, μεταξύ των ηλεκτροδίων MF / GCE και MF / MWNTs / GCE. Στο ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE το ύψος της κορυφής CA εμφανίζεται αυξημένο σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο MF / GCE. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στη μεγαλύτερη επιφάνεια που προσφέρεται από τους MWNTs, η οποία βελτιώνει την προσροφητική ικανότητα του ηλεκτροδίου και ως εκ τούτου βελτιώνει και τη συγκέντρωση του υμενίου του υδραργύρου στην επιφάνεια του.



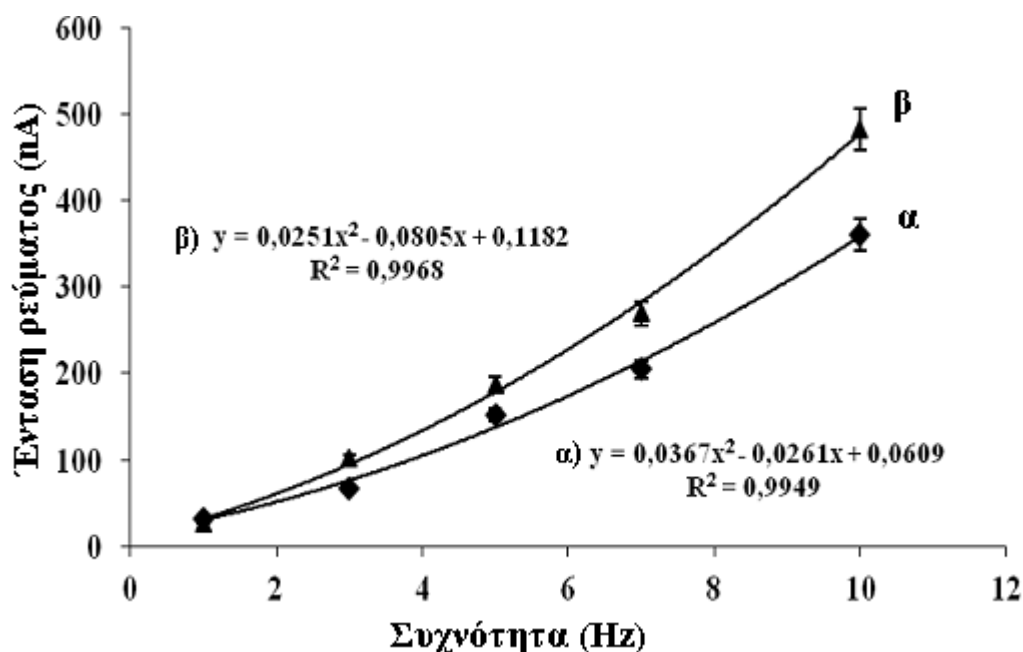
**Σχήμα 11.7.** Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού διαλύματος  $30 \text{ mg L}^{-1}$  : α) ssDNA, β) dsDNA με το ηλεκτρόδιο MF / GCE και γ) ssDNA, δ) dsDNA με το ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE. Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2.

Οι καθοδικές κορυφές CA, που φαίνονται στο Σχήμα, 11.7 οφείλονται στην αναγωγή των καταλοίπων αδενίνης και κυτοσίνης στο μόριο του DNA [264]. Στο dsDNA η κορυφή CA είναι ευρύτερη και το ύψος της μικρότερο και υπάρχει, επίσης, μια μετατόπιση της κορυφής CA προς λιγότερο αρνητικά δυναμικά, σε σύγκριση με το ssDNA. Η μείωση του ύψους της κορυφής, η οποία συνοδεύεται και από διεύρυνση του πλάτους της, θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι στο dsDNA οι

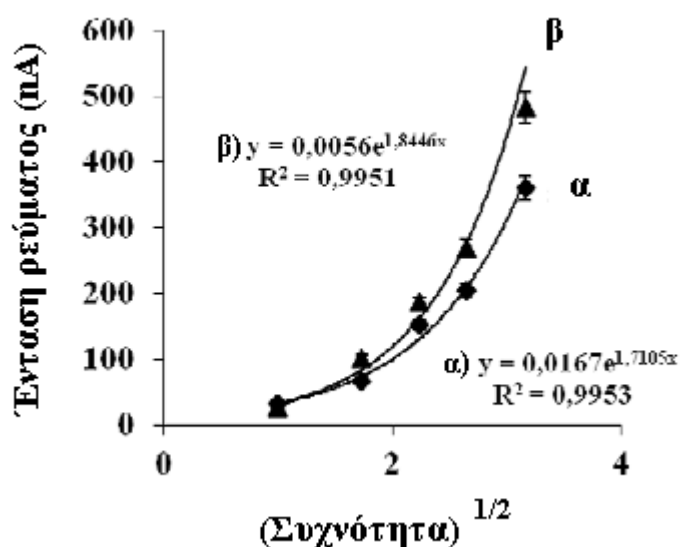


πρωτογενείς θέσεις αναγωγής τόσο της κυτοσίνης όσο και της αδενίνης, οι οποίες εντοπίζονται στους διπλούς δεσμούς N3 = C4 (στην κυτοσίνη) ή στους δεσμούς N1 = C6 (στην αδενίνη), είναι κρυμμένες στο εσωτερικό της διπλής έλικας του DNA και επομένως η ισχυρή προσρόφηση του dsDNA μέσω των βάσεων επί της επιφανείας του ηλεκτροδίου παρεμποδίζεται [13,265].

Η μεταβολή της έντασης των δύο κορυφών CA του ds και του ssDNA με τη συχνότητα (Σχήμα 11.8) και με την τετραγωνική ρίζα της συχνότητας (Σχήμα 11.9) μελετήθηκε για την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν τη φύση των ηλεκτροχημικών δράσεων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια μη γραμμική (πολυωνυμική) και μια εκθετική εξάρτηση με τη μεταβολή της συχνότητας από 1 έως 10 Hz και για τις δύο περιπτώσεις. Αυτό συνεπάγεται ημιαντιστρεπτές ηλεκτροχημικές δράσεις, υποθέτοντας ότι τόσο το αντιδραστήριο όσο και το προϊόν είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [13]. Επιπλέον, όταν η τιμή της συχνότητας γίνεται μεγαλύτερη από 10 Hz δεν παρατηρούνται καθόλου αναγωγικές κορυφές CA, δεδομένου ότι σε αυτές τις συχνότητες οι ηλεκτροχημικές δράσεις έχουν καταστεί μη αντιστρεπτές.



**Σχήμα 11.8.** Μεταβολή του ρεύματος της κορυφής CA σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας: α) dsDNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) και β) ssDNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) Υπόλοιπες συνθήκες, όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2.

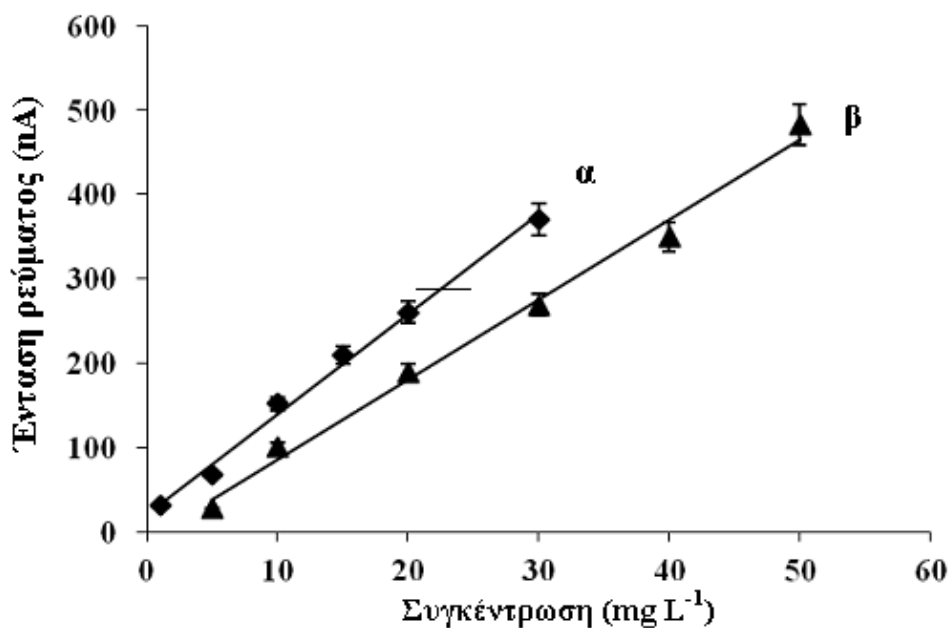


**Σχήμα 11.9.** Μεταβολή του ρεύματος της κορυφής CA σε συνάρτηση με την αύξηση της τετραγωνικής ρίζας της συχνότητας: α) dsDNA (30 mg L<sup>-1</sup>) και β) ssDNA (30 mg L<sup>-1</sup>) Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2.

Στο Σχήμα 11.10 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του ssDNA και του dsDNA στην ένταση του ρεύματος αναγωγής της κορυφής CA. Ο Πίνακας 11.1 περιέχει τις συνθήκες μέτρησης. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 11.10, το ύψος της κορυφής CA αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του ssDNA σε μια περιοχή από 1,00 έως 30,00 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το ύψος της κορυφής παραμένει σταθερό, λόγω του κορεσμού της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

**Πίνακας 11.1** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (AdsSWV).

Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (AdsSWV)	
Παράμετροι μέτρησης	Επιλεγόμενες συνθήκες
$E_{cond}$ (δυναμικό προκατεργασίας)	0,100 V
$t_{cond}$ (χρόνος προκατεργασίας)	15 s
$E_{begin}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	-0,400 V
$E_{end}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	-1,6 V
$E_{step}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{pulse}$ (δυναμικό παλμού)	0,010 V
<b>Freq</b> (συχνότητα)	10 Hz



**Σχήμα 11.10.** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του α) ssDNA και β) dsDNA. Ο Πίνακας 11.1 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες

Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 11,23(\pm 0,61) \gamma \text{ (dsDNA)} + 29,88(\pm 10,31), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,993.

Επίσης, από το Σχήμα 11.10 παρατηρούμε, ότι η ένταση του ρεύματος αναγωγής της κορυφής CA αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας. Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή CA κυμάνθηκε από 5,00 έως 50,00 mg L<sup>-1</sup>.

Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 9,51(\pm 0,44) \gamma \text{ (dsDNA)} - 9,35 (\pm 13,29), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,992.

Προσδιορίσθηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους ακόλουθους Πίνακες 11.2 και 11.3.

**Πίνακας 11.2** Μετρήσεις επαναληψιμότητας για το ssDNA (n=6).

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,00	15,0	30,0
$s_r$ (%)	8,57	7,28	6,04

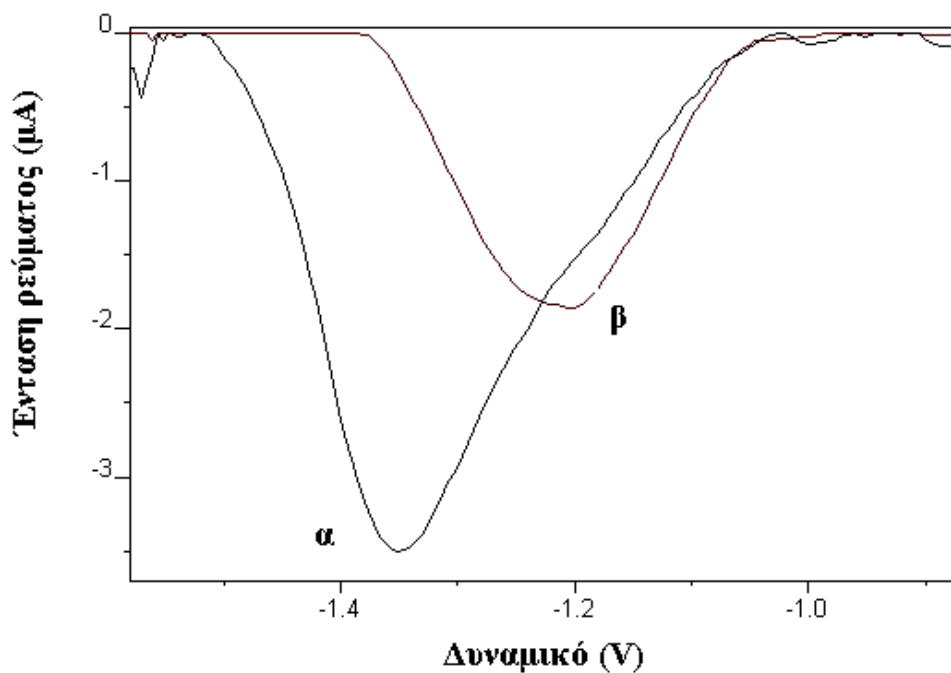
**Πίνακας 11.3** Μετρήσεις επαναληψιμότητας για το dsDNA (n=6).

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	5,00	25,0	50,0
$s_r$ (%)	8,88	6,95	6,27

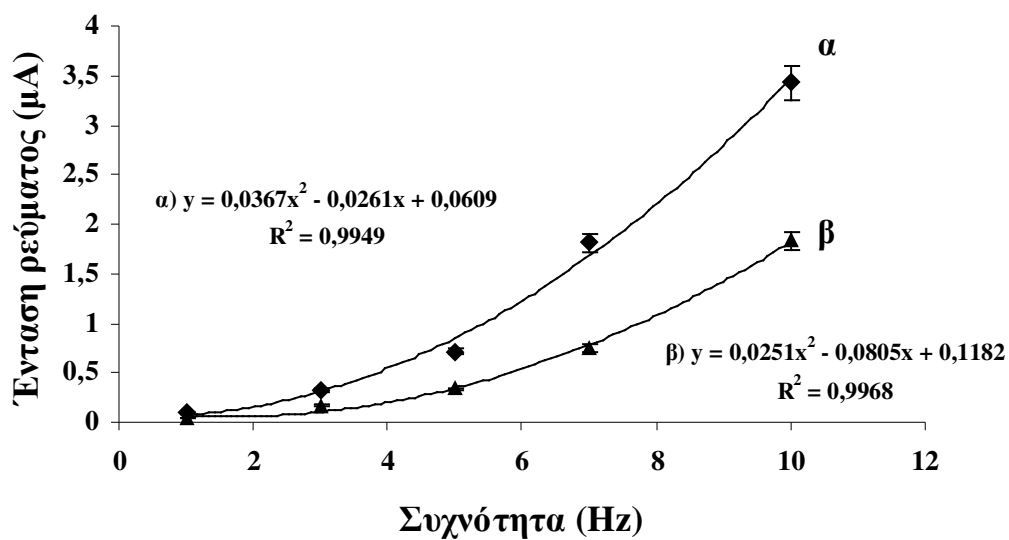
## **11.6 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ DNA**

Τόσο το απομεθυλιωμένο, όσο και το μεθυλιωμένο DNA εμφανίζουν δύο μεγάλες και ευρείες καθοδικές κορυφές σε δυναμικά ίσα με  $-1,351 \text{ V}$  και  $-1,206 \text{ V}$ , αντίστοιχα (Σχήμα 11.11). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 11.11, η κορυφή CA του απομεθυλιωμένου DNA είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη κορυφή CA του μεθυλιωμένου DNA. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγουμένως δημοσιευμένα αποτελέσματα [13], δείχνοντας ότι η μεθυλίωση των μορίων του DNA οδηγεί σε σημαντικά χαμηλότερες κορυφές στα ηλεκτρόδια υδραργύρου.

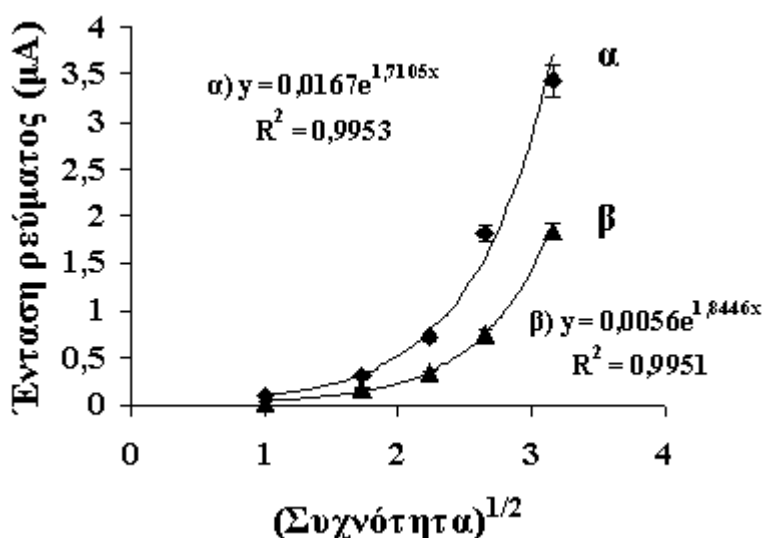
Στα Σχήματα 11.12 και 11.13 φαίνεται η επίδραση της συχνότητας και της τετραγωνικής ρίζας της συχνότητας του τετραγωνικού παλμού στην ένταση των κορυφών CA του μεθυλιωμένου και του απομεθυλιωμένου DNA. Όταν η συχνότητα μεταβάλλεται από 1 έως 10 Hz, τα ύψη των κορυφών CA τόσο του μεθυλιωμένου, όσο και του απομεθυλιωμένου DNA αυξάνονται πολυωνυμικά και εκθετικά υποδεικνύοντας ημιαντιστρεπτές ηλεκτροχημικές δράσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Σε υψηλότερες συχνότητες (μεγαλύτερες από 10 Hz) δεν παρατηρούνται κορυφές CA και στα δύο DNA.



**Σχήμα 11.11.** Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού διαλύματος  $100 \text{ mg L}^{-1}$  : α) απομεθυλιωμένου DNA και β) μεθυλιωμένου DNA. Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2..



**Σχήμα 11.12.** Μεταβολή του ρεύματος της κορυφής CA σε συνάρτηση με την αύξηση της συχνότητας: α) απομεθυλιωμένο DNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) και β) μεθυλιωμένο DNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ). Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2.



**Σχήμα 11.13.** Μεταβολή του ρεύματος της κορυφής CA σε συνάρτηση με την αύξηση της τετραγωνικής ρίζας της συχνότητας: α) απομεθυλιωμένο DNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) και β) μεθυλιωμένο DNA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.

Η επίδραση της συγκέντρωσης του απομεθυλιωμένου και του μεθυλιωμένου DNA στην ένταση της κορυφής CA παρουσιάζεται στο Σχήμα 11.14. Ο Πίνακας 11.1 περιέχει τις συνθήκες μέτρησης. Η κορυφή CA του απομεθυλιωμένου DNA εμφανίζει μια γραμμική εξάρτηση με τη συγκέντρωση μεταξύ  $0,5$  και  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων εκφράζεται από την εξίσωση :

$$I_p = 0,024(\pm 0,001) \gamma \text{ (dsDNA)} - 0,508 (\pm 0,533), I_p: \mu\text{A}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

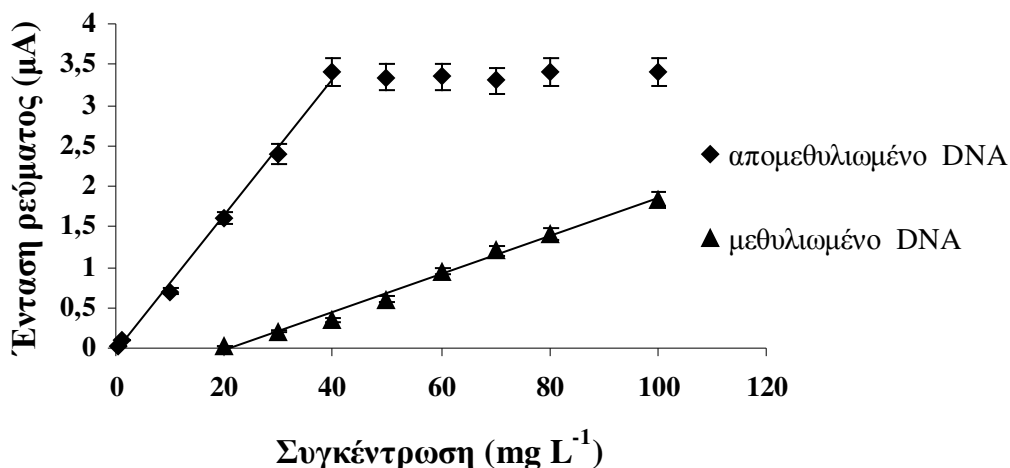
με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,992.

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση του ύψους της κορυφής CA με την συγκέντρωση.

Η κορυφή CA του μεθυλιωμένου DNA αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση μεταξύ  $20$  και  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν ελέγχθηκαν). Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων εκφράζεται από την εξίσωση :

$$I_p = 0,084(\pm 0,003) \gamma \text{ (dsDNA)} - 0,518 (\pm 0,071), I_p: \mu\text{A}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,992.



**Σχήμα 11.14.** Καμπύλες βαθμονόμησης του απομεθυλιωμένου και του μεθυλιωμένου DNA. Ο Πίνακας 11.1 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Προσδιορίστηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους ακόλουθους Πίνακες 11.4 και 11.6.

**Πίνακας 11.4** Μετρήσεις επαναληψιμότητας για το απομεθυλιωμένο DNA (n=6).

Συγκέντρωση (mg L <sup>-1</sup> )	0,5	20,0	40,0
$s_r$ (%)	8,93	6,58	6,21

**Πίνακας 11.5** Μετρήσεις επαναληψιμότητας για το μεθυλιωμένο DNA (n=6).

Συγκέντρωση (mg L <sup>-1</sup> )	20,0	60,0	100,0
$s_r$ (%)	8,48	6,58	6,37

Όπως μπορεί να φανεί από το Σχήμα 11.14, η ευαισθησία του μεθυλιωμένου DNA είναι δραματικά χαμηλότερη, επιτρέποντας την ανίχνευση περίπου 20 mg L<sup>-1</sup> μεθυλιωμένου DNA. Η χαμηλή προσβασιμότητα των ηλεκτροενεργών θέσεων της αδενίνης και της κυτοσίνης στο ηλεκτρόδιο εργασίας είναι η αιτία αυτής της

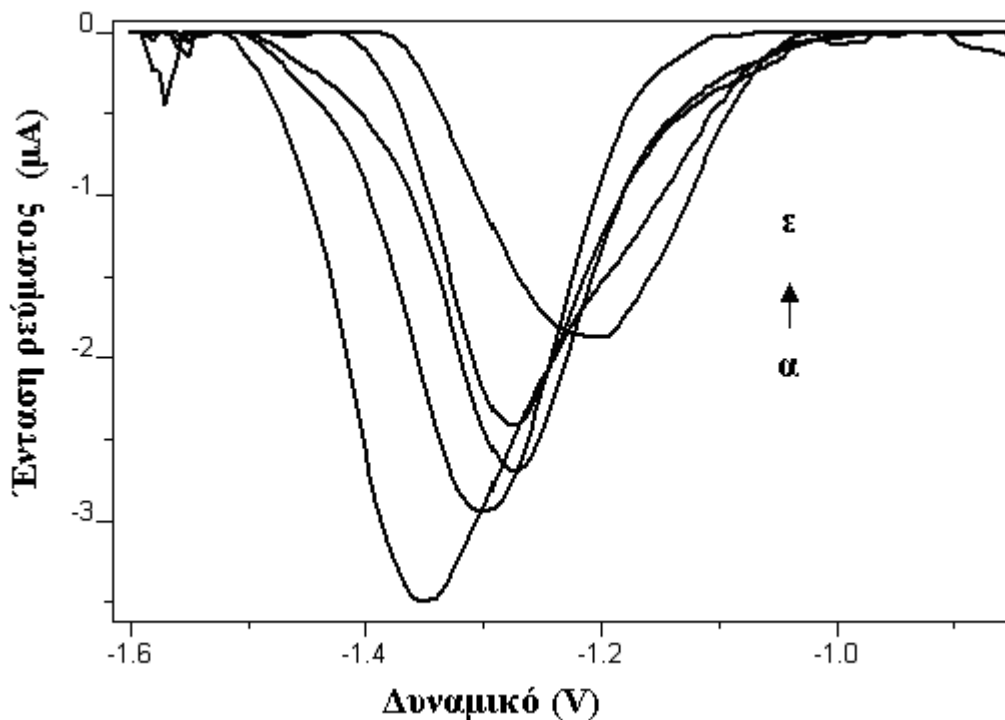
παρατήρησης, διότι η καθοδική αντίδραση του DNA επηρεάζεται έντονα από τη δομή του στα ηλεκτρόδια υδραργύρου

### **11.7 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ DNA ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ**

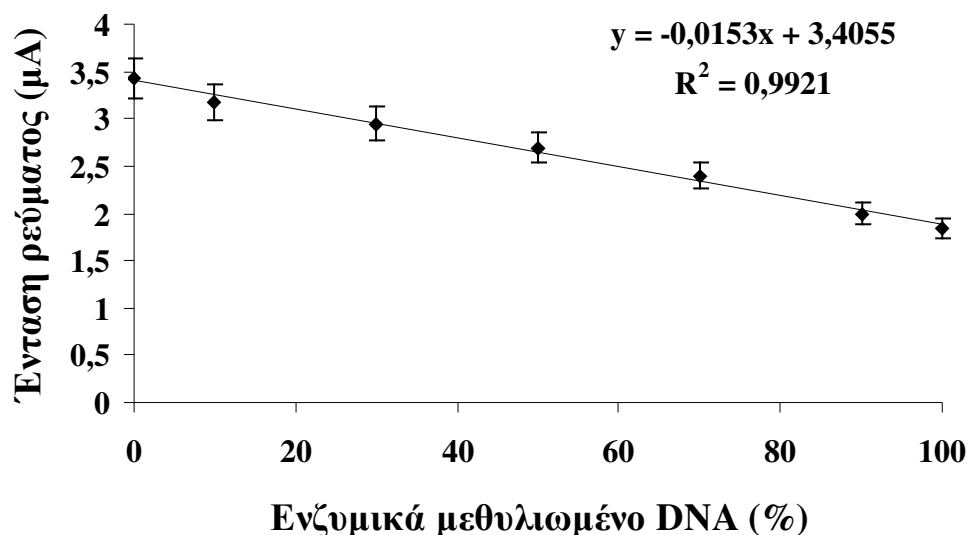
Από την ηλεκτροχημική μελέτη των μιγμάτων DNA διαφορετικού βαθμού μεθυλίωσης προέκυψαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.15, με αύξηση του ποσοστού του ενζυμικά μεθυλιωμένου DNA από 0% μέχρι 100%, μειώνεται το ύψος της κορυφής CA, από 3,5  $\mu\text{A}$  μέχρι 1,8  $\mu\text{A}$ . Επιπλέον, η κορυφή CA μετατοπίζεται προς λιγότερο αρνητικά δυναμικά, από -1,351 V μέχρι -1,206 V. Η μείωση της έντασης της κορυφής CA σε συνάρτηση με το ποσοστό του ενζυμικά μεθυλιωμένου DNA παρατίθεται στο Σχήμα 11.16 και όπως φαίνεται με μόνο 10% αύξηση του ποσοστού του ενζυμικά μεθυλιωμένου DNA παρατηρείται μια αξιοσημείωτη μείωση της κορυφής CA. Αφού τόσο η κυτοσίνη, όσο και η μεθυλοκυτοσίνη μπορούν να πρωτονιωθούν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, και οι δύο βάσεις δέχονται πρωτόνιο στο N-3, τότε η μείωση της κορυφής CA αποδίδεται στη συμπαγή διαμόρφωση που προκαλεί η μεθυλίωση.

Η κορυφή CA (στα -1,4 V περίπου) αποδεικνύει ότι η αδερίνη και κυτοσίνη, τόσο στο μεθυλιωμένο και όσο και στο αμεθυλιωτό DNA, είναι πρωτονιωμένες, δεδομένου ότι υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες (pH 7,00), η δομή του δίκλωνου του DNA παραμένει σταθερή. Καθώς η προσβασιμότητα των βάσεων για την αλληλεπίδρασή τους με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην προσρόφηση του DNA, με την αύξηση του ποσοστού των μεθυλιωμένων καταλοίπων το ύψος της κορυφής CA παρουσιάζει μια ελάττωση που συνοδεύεται από διαπλάτυνση και μια ελαφρά μετατόπιση προς λιγότερο αρνητικά δυναμικά. Αυτή η διαφορά δείχνει μια πιο άκαμπτη δομή του μεθυλιωμένου DNA που επιτρέπει μικρότερο αριθμό βάσεων να έρθουν σε άμεση επαφή με προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου πιθανώς σχετίζεται με στερεοχημικά φαινόμενα [13].





**Σχήμα 11.15.** Ηλεκτροχημική ανάλυση των μιγμάτων DNA διαφορετικού βαθμού μεθυλίωσης. Αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης (α→ε). 0% (α), 30% (β), 50% (γ, -), 70% (δ) και 100% (ε) ενζυμικά μεθυλιωμένου *Jurkat* DNA. Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2 και στον Πίνακα 11.1.



**Σχήμα 11.16.** Συσχέτιση της έντασης του ρεύματος της κορυφής CA με αύξηση του ποσοστού του ενζυμικά μεθυλιωμένου DNA. Υπόλοιπες συνθήκες όπως αναφέρονται στην παράγραφο 11.3.2 και στον Πίνακα 11.1.

## 11.8 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Συνοψίζοντας, παρατηρούμε ότι, το ηλεκτρόδιο, το οποίο κατασκευάστηκε με εναπόθεση υμενίου υδραργύρου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα μορφοποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MF / MWNTs / GCE), μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανάλυση μονόκλωνου (ss) και δίκλωνου (ds) DNA, καθώς και για την ανάλυση ενζυμικά μεθυλιωμένου Jurkat DNA σε διαφορετικούς βαθμούς. Με βάση τη μέγιστη μείωση της καθοδικής κορυφής της κυτοσίνης και της αδερίνης (CA κορυφή), η οποία δείχνει μια υψηλή ευαισθησία στη δομή του DNA, εφόσον οι αναγόμενες περιοχές στην αδερίνη και την κυτοσίνη αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και κρύβονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας του μοντέλου Watson-Crick, το ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλά επίπεδα των μορίων του DNA έπειτα από την *ex situ* προσρόφηση του. Επίσης, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έδειξαν ότι το ηλεκτρόδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση του δίκλωνου (ds) από το μονόκλωνο (ss) DNA και για την ανίχνευση μεταβολών, που προκύπτουν από την παρουσία μεθυλίωσης σε ένα μόριο DNA.

## **12. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ**

### **12.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Τα δύο ηλεκτρόδια εργασίας κατασκευάστηκαν με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με τα εξής χαρακτηριστικά : διάμετρος 110-170 nm, μήκος 5-9  $\mu\text{m}$  και καθαρότητα >90%.

Το ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα ιοντικού υγρού (IL-CNTPE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη, σε μια κάψα, σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα και ιοντικού υγρού μέχρι να σχηματιστεί ένα ομογενοποιημένο μίγμα, το οποίο στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 60  $^{\circ}\text{C}$  για 1h. Η αναλογία νανοσωλήνων άνθρακα και ιοντικού υγρού ήταν 70:30 (w/w).

Το ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (MWNTPE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη, σε μια κάψα, σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα και ορυκτού ελαίου σε αναλογία 45:55 (w/w) μέχρι να σχηματιστεί μια ομογενοποιημένη πάστα.

Στη συνέχεια οι ομογενοποιημένες πάστες μεταφέρονταν μέσα στο ηλεκτρόδιο και η επιφάνεια του ηλεκτροδίου γυαλιζόταν με ειδικό χαρτί, για να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία.

### **12.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **12.2.1 Κυκλική βολταμμετρία**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 5,00-5,80) σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,00- 7,80) και Tris-EDTA pH 8,00. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 έως +1,4 V με διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης (0,01-0,1  $\text{V s}^{-1}$ ) και το βήμα δυναμικού 0,005 V. Το δυναμικό προσυγκέντρωσης ήταν 0,5 V, ενώ ο χρόνος προσυγκέντρωσης ήταν 120 s.

### 12.2.2 Βολταμμετρία διαφορικού παλμού

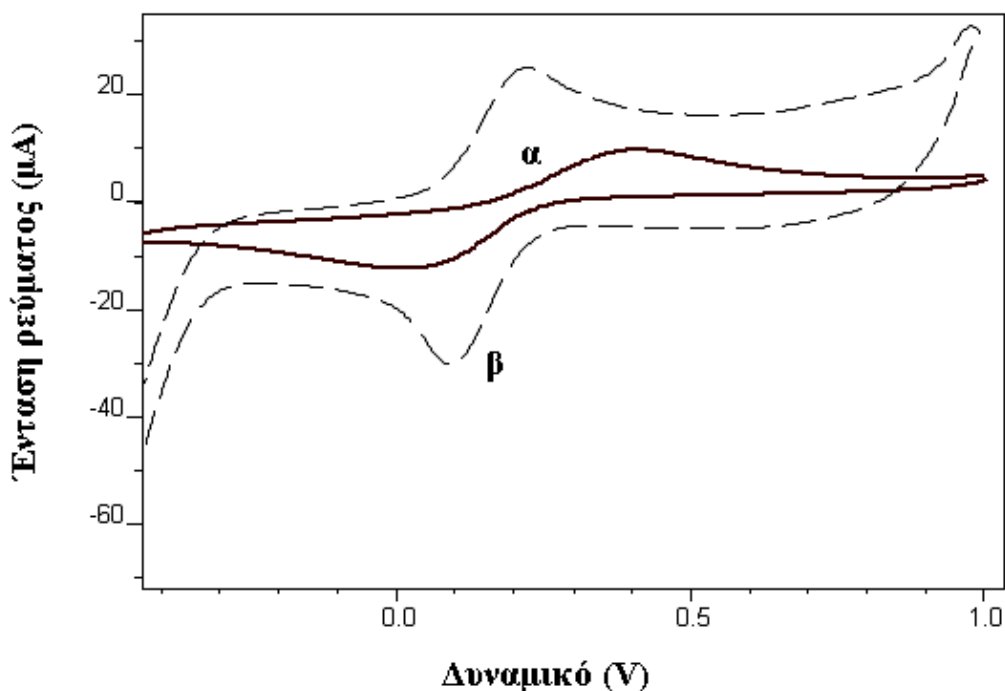
Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου IL-CNTPE η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 έως +1,4 V, η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ , το δυναμικό παλμού  $0,025 \text{ V}$ , και το βήμα δυναμικού  $0,005 \text{ V}$ . Το δυναμικό προσυγκέντρωσης κυμαινόταν από 0 έως  $0,7 \text{ V}$ , ενώ ο χρόνος προσυγκέντρωσης κυμαινόταν από 0 έως  $600 \text{ s}$ .

Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου CNTPE ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00) +  $20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ . Μετά την προκατεργασία του ηλεκτροδίου CNTPE, με εφαρμογή σταθερού δυναμικού  $1,3 \text{ V}$  για  $30 \text{ s}$  χωρίς ανάδευση στο φέροντα ηλεκτρολύτη, το ηλεκτρόδιο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα που περιείχε διάλυμα dsDNA  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Η ακινητοποίηση dsDNA στην επιφάνεια του προκατεργασμένου ηλεκτροδίου πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό  $+0,3 \text{ V}$  για  $300 \text{ s}$ , με συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο εκπλύθηκε με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα για  $10 \text{ sec}$  και μεταφέρθηκε σε κυψελίδα που περιείχε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόστηκε βολταμμετρία διαφορικού παλμού, με σάρωση του δυναμικού από  $0 \text{ V}$  έως  $+1,4 \text{ V}$ , ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού  $0,050 \text{ V s}^{-1}$ , δυναμικό παλμού  $0,025 \text{ V}$ , βήμα δυναμικού  $0,005 \text{ V}$ , (κεφάλαιο 10).

Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με αναγέννηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με κοπή και λείανσή της σε ένα ειδικό χαρτί. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν πριν από κάθε μέτρηση. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

### 12.3 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ IL-CNTPE

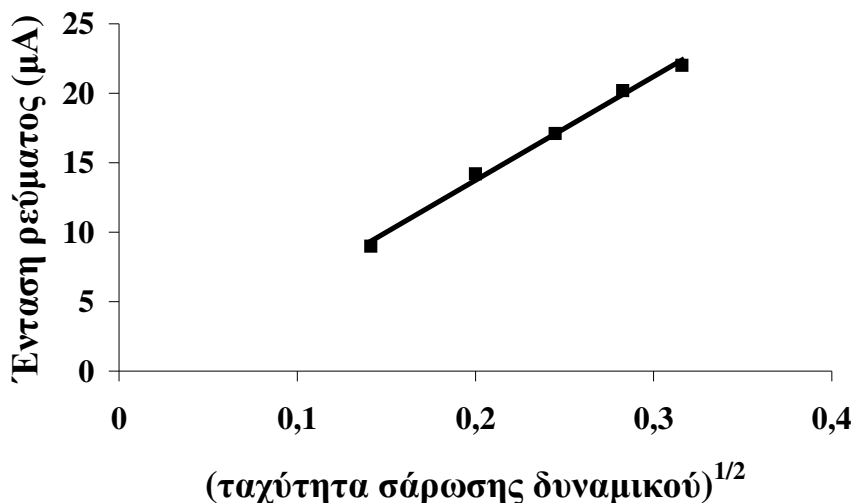
Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου CNTPE και του ηλεκτροδίου IL-CNTPE διερευνήθηκε σε διάλυμα  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας (Σχήμα 12.1). Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ . Η συγκέντρωση του  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ήταν  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από  $-0,6 \text{ V}$  έως  $+1,0 \text{ V}$ , ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .



**Σχήμα 12.1.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίου CNTPE ( $\alpha$ ) και IL- CNTPE ( $\beta$ ) διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ .

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα.12.1, στο ηλεκτρόδιο CNTPE (καμπύλη  $\alpha$ ) εμφανίζεται ένα ζεύγος σαφώς καθορισμένων βολταμμετρικών κορυφών με το δυναμικό της καθοδικής κορυφής ( $E_{pc}$ ) στα 0,055V και το δυναμικό της ανοδικής κορυφής ( $E_{pa}$ ) στα 0,375 V. Με τη χρήση του ηλεκτροδίου IL- CNTPE (καμπύλη  $\beta$ ) οι εντάσεις των ρευμάτων των αντίστοιχων κορυφών αυξήθηκαν, ενώ η τιμή της διαφοράς δυναμικού μεταξύ ανοδικής και καθοδικής κορυφής ( $\Delta E_p$ ) μειώθηκε από τα 320 mV στα 120 mV.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης Randles-Sevcik (Σχέση 10.1) προσδιορίστηκε η γεωμετρική επιφάνεια του ηλεκτροδίου CNTPE και του ηλεκτροδίου IL-CNTPE αντικαθιστώντας τις τιμές των  $D$ ,  $n$ ,  $\nu$  και  $C$ . Για το οξειδοαναγωγικό σύστημα που μελετήθηκε, ( $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ),  $n = 1$ ,  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , ενώ ο λόγος του ρεύματος κορυφής προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού ( $I_p / \nu^{1/2}$ ) για το ηλεκτρόδιο IL-CNTPE υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης που δίνεται στο Σχήμα 12.2. Ο αντίστοιχος λόγος για το ηλεκτρόδιο CNTPE υπολογίστηκε στο κεφάλαιο 10 (Σχήμα 10.5).

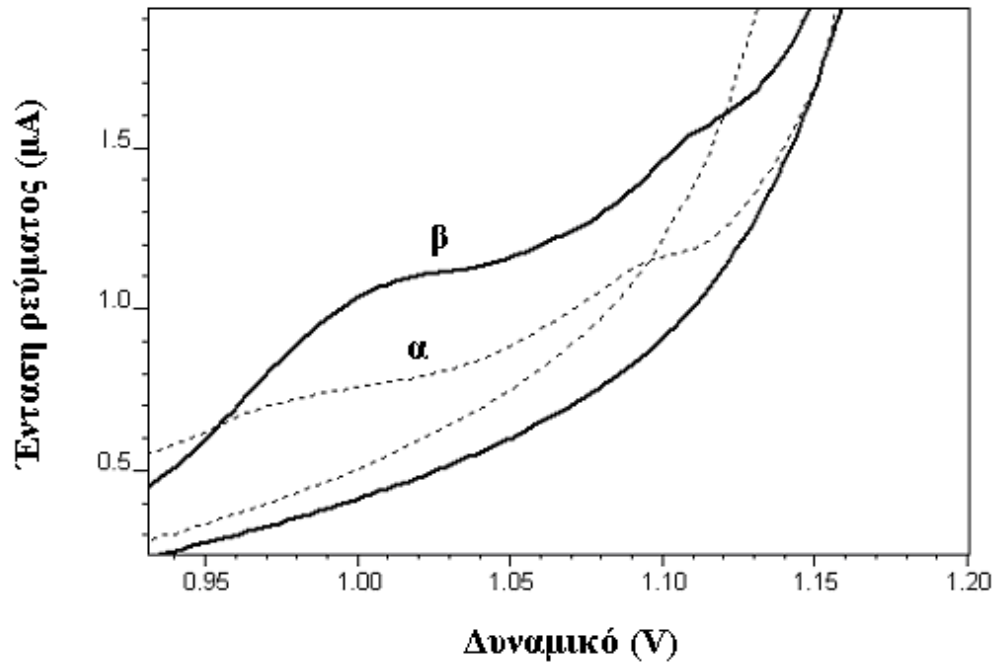


**Σχήμα 12.2.** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  ηλεκτροδίου IL- CNTPE, με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω οι γεωμετρικές επιφάνειες των ηλεκτροδίων CNTPE και IL-CNTPE υπολογίστηκαν σε  $0,035$  και  $0,10 \text{ cm}^2$ , αντίστοιχα. Όλα τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η χρήση ιοντικού υγρού, ως συνδετικό μέσο, σε ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα ενισχύει την απόκριση του οξειδοαναγωγικού συστήματος ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) αυξάνοντας τα ρεύματα κορυφών ενώ παράλληλα η ηλεκτροδιακή δράση γίνεται πιο αντιστρεπτή.

Στο Σχήμα 12.3 απεικονίζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα του dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) στα ηλεκτρόδια CNTPE και IL-CNTPE. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12.3, δύο κορυφές οξείδωσης εμφανίζονται και στα δύο ηλεκτρόδια, οι οποίες αποδίδονται στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης και της αδενίνης στο μόριο του dsDNA. Στο ηλεκτρόδιο CNTPE οι εντάσεις των κορυφών είναι  $46 \text{ nA}$  και  $23 \text{ nA}$ , ενώ στο ηλεκτρόδιο IL-CNTPE  $95 \text{ nA}$  και  $55 \text{ nA}$ .

Σύμφωνα λοιπόν με τα πειραματικά αποτελέσματα, η ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA βελτιώνεται σημαντικά στο ηλεκτρόδιο IL-CNTPE.



**Σχήμα 12.3.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα των ηλεκτροδίων: α) CNTPE και β) IL- CNTPE διαλύματος  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA. Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}- \text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , χρόνος προσυγκέντρωσης :  $120 \text{ s}$ , δυναμικό προσυγκέντρωσης:  $0,5 \text{ V}$  και ταχύτητα σάρωσης δυναμικού :  $0,10 \text{ V}$ .

#### 12.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

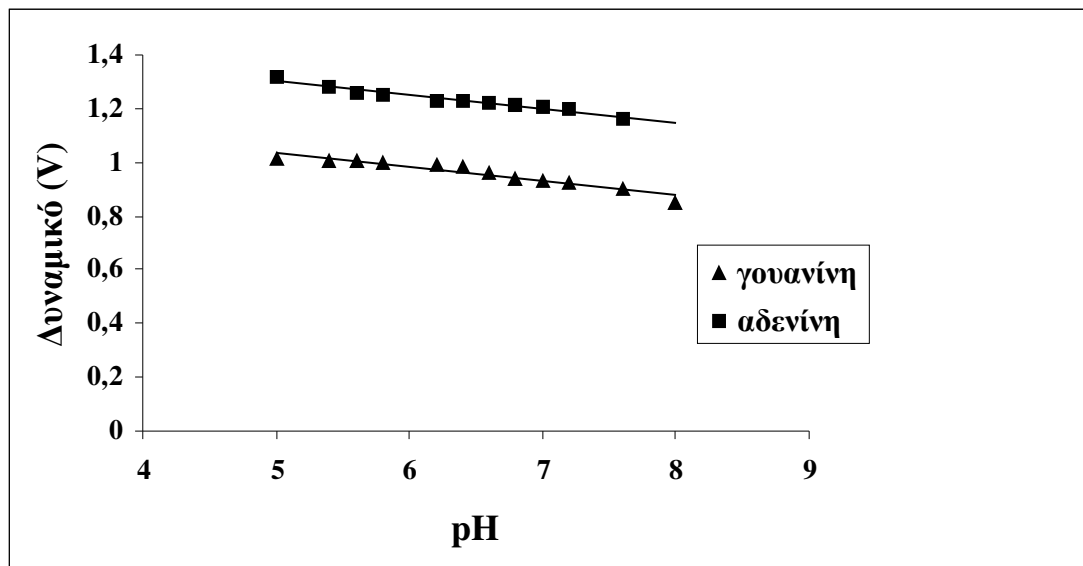
Η επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA στο ηλεκτρόδιο IL-CNTPE μελετήθηκε με κυκλική βολταμμετρία. Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από  $0 \text{ V}$  έως  $+1,4\text{V}$ , ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ .

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12.4, όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αυξάνεται, τα δυναμικά κορυφής οξείδωσης των καταλοίπων της αδερίνης και της γουανίνης στο μόριο του dsDNA μετατοπίζονται προς την αρνητική κατεύθυνση, υποδεικνύοντας ότι στη διεργασία μεταφοράς ηλεκτρονίων του dsDNA συμμετέχουν και πρωτόνια.

Οι γραμμικές εξισώσεις παλινδρόμησης μεταξύ των κορυφών του δυναμικού οξείδωσης και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορίστηκαν ως :

$E_{pa}$  (V) = -0,0535 pH + 1,034 (n=12,  $r^2 = 0,921$ ) για την κορυφή οξείδωση της γουανίνης και

$E_{pa}$  (V) = -0,0510 pH + 1,556 (n=11,  $r^2=0,943$ ) για την κορυφή οξείδωση της αδενίνης.



**Σχήμα 12.4.** Επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στα δυναμικά κορυφής οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 120 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

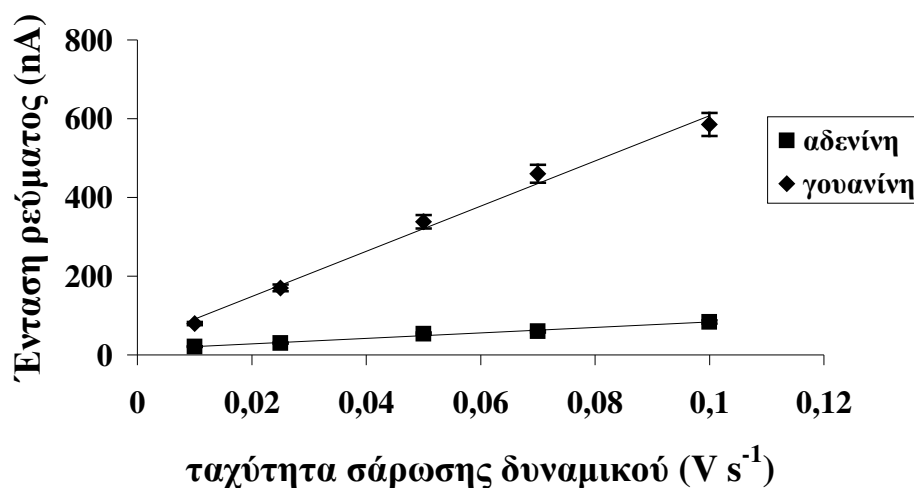
Όπως προαναφέρθηκε, η ηλεκτροχημική οξείδωση της γουανίνης ακολουθεί μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη συνολική απώλεια τεσσάρων ηλεκτρονίων, όπου το πρώτο στάδιο, στο οποίο πραγματοποιείται η απώλεια των δυο πρώτων ηλεκτρονίων, είναι το στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αντίδρασης. Η κλίση των 53,5 mV / pH έδειξε ότι δύο πρωτόνια έλαβαν μέρος στο καθοριστικό αυτό στάδιο, αριθμός ιδανικός για την ηλεκτροχημική οξείδωση των καταλοίπων γουανίνης στο μόριο του dsDNA [199].

Επειδή η μέγιστη κορυφή οξείδωσης της γουανίνης ελήφθη σε pH 5,00, το pH αυτό λαμβάνεται ως βέλτιστο για τα επόμενα πειράματα.



## 12.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Δεδομένου ότι, πολύ χρήσιμες πληροφορίες που αφορούν τον ηλεκτροχημικό μηχανισμό μπορούν να αποκτηθούν από τη σχέση μεταξύ της έντασης του ρεύματος κορυφής και της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού, η επίδραση της ταχύτητας σάρωσης στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA στο ηλεκτρόδιο IL-CNTPE αξιολογήθηκε με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 V έως +1,4V και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού κυμάνθηκε από 0,01 έως  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .



**Σχήμα 12.5.** Επίδραση της ταχύτητας σάρωσης στα ύψη των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 120 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12.5, οι εντάσεις των ανοδικών ρευμάτων κορυφής, που οφείλονται στην οξείδωση της γουανίνης και της αδενίνης αυξάνονται γραμμικά με την αύξηση της ταχύτητας σάρωσης, αποδεικνύοντας ότι η οξείδωση της γουανίνης και αδενίνης στο ηλεκτρόδιο IL-CNTPE είναι μια διεργασία ελεγχόμενη από την προσρόφιση.

Οι αντίστοιχες γραμμικές εξισώσεις παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν ως:

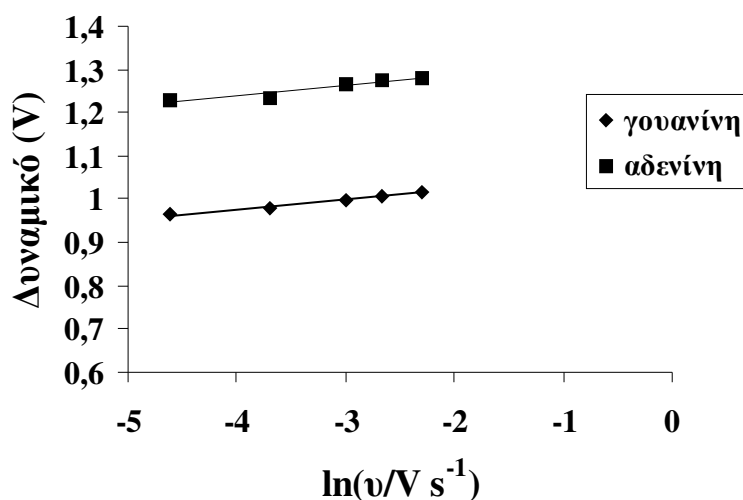
$I_{pa} \text{ (nA)} = 5735,7 v \text{ (V s}^{-1}\text{)} + 34,07$  ( $n=5$ ,  $r^2=0,990$ ) για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης και

$I_{pa}$  (nA) = 695,51 υ (V s<sup>-1</sup>) + 14,33 (n=5, r<sup>2</sup>=0,985) για την κορυφή οξείδωση της αδενίνης.

Επιπλέον τα δυναμικά κορυφής οξείδωσης μετατοπίζονται προς θετικότερες τιμές, καθώς αυξάνεται η ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού (Σχήμα 12.6). Γραμμικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ των ανοδικών δυναμικών κορυφής (E<sub>p</sub>) και του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης (ln(υ)) που περιγράφεται από τις ακόλουθες γραμμικές εξισώσεις παλινδρόμησης:

E<sub>pa</sub> (V) = 0,023 ln(υ/V s<sup>-1</sup>) + 1,33 (n=5, r<sup>2</sup>=0,985) για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης και

E<sub>pa</sub> (V) = 0,024 ln(υ/V s<sup>-1</sup>) + 1,06 (n=5, r<sup>2</sup>=0,923) για την κορυφή οξείδωσης της αδενίνης.



**Σχήμα 12.6.** Επίδραση του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού στα δυναμικά των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 120 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

Σύμφωνα με την εξίσωση του Laviron [200]:

$$E_p = E^{o'} + \frac{RT}{(1-a)nF} \ln \nu \quad (12.1)$$

όπου

a: συντελεστής μεταφοράς φορτίου

n: ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται,

υ: η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ( $V s^{-1}$ ),

$E^0$ : δυναμικό ημιαντίδρασης (V),

F: η σταθερά του Faraday (Cb)

Από την κλίση και το σημείο τομής η τιμή των α και  $E^0$  να υπολογιστεί ότι είναι 0,44 και 1,067 V, αντίστοιχα. Για μια μη ανιστρεπτή οξειδωτική αντίδραση, η ετερογενής σταθερά μεταφοράς ηλεκτρονίων (ks) υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση [201]:

$$E_p = E^0 + RT/(anF) [\ln[(RTk_s)/(anF)] - \ln v] \quad (12.2)$$

όπου

a: συντελεστής μεταφοράς φορτίου

n: ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται,

υ: η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ( $V s^{-1}$ ),

$E^0$ : δυναμικό ημιαντίδρασης (V),

F: η σταθερά του Faraday (Cb)

R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $\text{joule mol}^{-1} \text{ T}^{-1}$ )

T: θερμοκρασία (K)

Με βάση τα παραπάνω η τιμή της σταθεράς ks υπολογίστηκε ίση με  $0,55 s^{-1}$  για τα κατάλοιπα της γουανίνης στο μόριο του dsDNA. Η μικρή τιμή της προσδιοριζόμενης σταθεράς δικαιολογείται από το μεγάλο μοριακό βάρος και την πολύπλοκη δομή του μορίου του dsDNA [199].

## 12.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Δεδομένου ότι οι ηλεκτροδιακές δράσεις ελέγχονται από την προσρόφηση, οι συνθήκες που επηρεάζουν την ακινητοποίηση του dsDNA (δυναμικό και χρόνος προσρόφησης) μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την πιο ευαίσθητη τεχνική της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού και με την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης να αποτελεί το υπό παρακολούθηση ηλεκτροχημικό σήμα.

### 12.6.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης

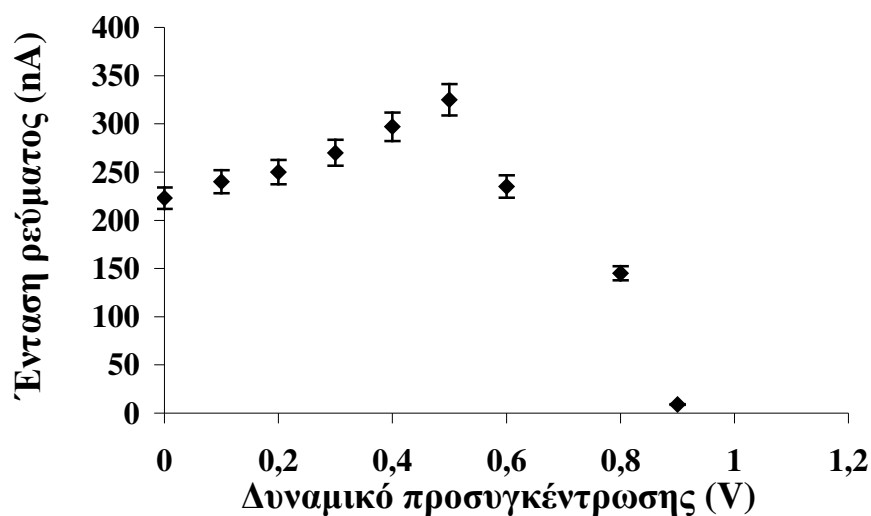
Η επίδραση του δυναμικού απόθεσης στο ύψος της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης του dsDNA μελετήθηκε στο διάστημα από 0 V έως 0,9 V και παρουσιάζεται στο Σχήμα 12.7. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε 50 mgL<sup>-1</sup> dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH- CH<sub>3</sub>COONa 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,00). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12.6 , το ρεύμα κορυφής αυξανόταν, σχεδόν γραμμικά, με την αύξηση του δυναμικού από 0 V έως 0,5 V. Σε δυναμικά απόθεσης θετικότερα από 0,5 V , το ρεύμα κορυφής μειώνεται δραματικά. Αυτό συνεπάγεται ότι η προσρόφηση του dsDNA στην επιφάνεια του IL-CNTPE επηρεάζεται σημαντικά από το δυναμικό απόθεσης. Το αρνητικά φορτισμένο dsDNA προσροφάται, πιθανότατα, στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τα θετικά φορτισμένα κατιόντα του ιοντικού υγρού, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (pH 5,00).

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα επιλέχθηκε δυναμικό προσυγκέντρωσης ίσο με 0,5 V.

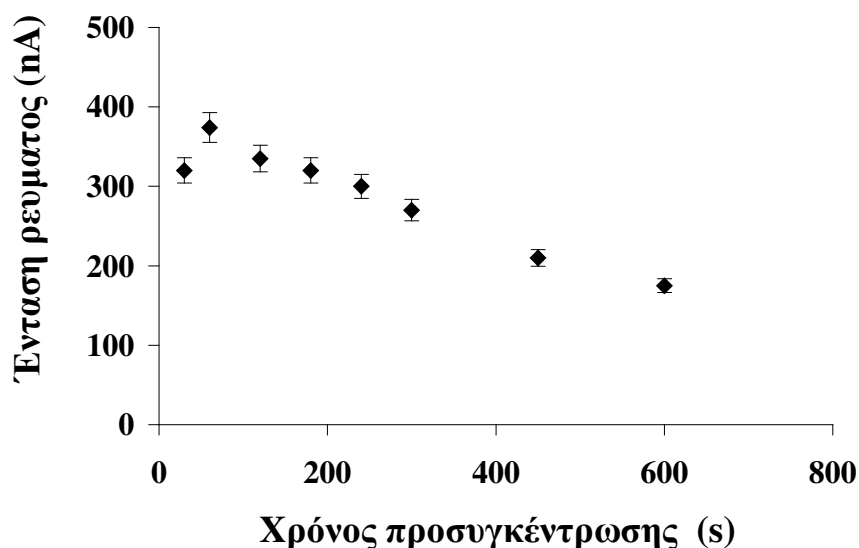
### 12.6.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα οξειδωσης της γουανίνης μελετήθηκε στο διάστημα 0 – 600 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH- CH<sub>3</sub>COONa 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,00) που περιείχε 50 mg L<sup>-1</sup> dsDNA (Σχήμα 12.8). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 12.7, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης από 0-60 s, το ύψος της κορυφής του dsDNA αυξάνεται. Σε χρόνους προσυγκέντρωσης

μεγαλύτερους των 60 s το ύψος της κορυφής μειώνεται και σταδιακά σταθεροποιείται. Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγονται τα 60 s.



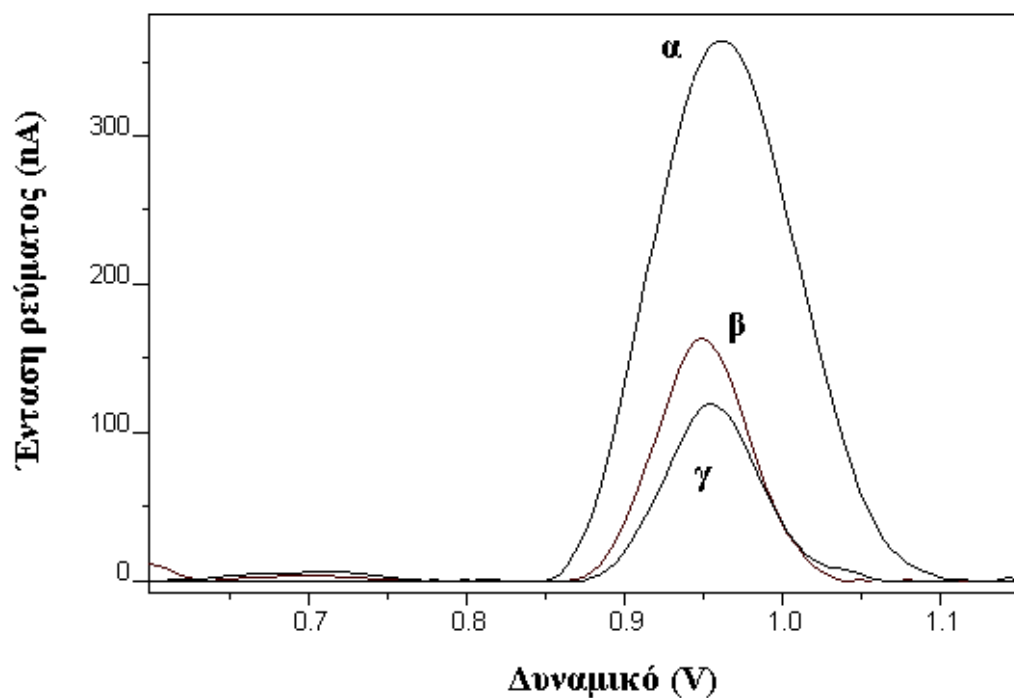
**Σχήμα 12.7.** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα *dsDNA* ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH } 5,00$ ), χρόνος προσυγκέντρωσης : 120 s.



**Σχήμα 12.8.** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα *dsDNA* ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH } 5,00$ ), δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

## 12.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΟΣ

Η επίδραση άλατος στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά του dsDNA στο ηλεκτρόδιο PL-CNTPE μελετήθηκε με τη χρήση της βολταμετρίας διαφορικού παλμού. Στο διάλυμα μέτρησης, το οποίο περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00), πραγματοποιήθηκε προσθήκη δύο διαφορετικών αλάτων: α)  $\text{NaCl}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  και β)  $\text{HCOONH}_4$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Σχήμα 12.9.** Βολταμογραφήματα διαφορικού παλμού dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 5,00: α) χωρίς άλας β)  $\text{HCOONH}_4$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  και γ)  $\text{NaCl}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Χρόνος προσυγκέντρωσης :  $120 \text{ s}$ , δυναμικό προσυγκέντρωσης :  $0,5 \text{ V}$ .

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 12.9, η προσθήκη άλατος στο διάλυμα του φέροντα ηλεκτρολύτη δεν επιδρά θετικά στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του ύψους της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης.

Δοκιμάστηκε, επίσης, η τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας αλλαγής μέσου, όπου η μετάλλαξη του σήματος πραγματοποιείται σε

καθαρό διάλυμα του φέροντα ηλεκτρολύτη. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα η αλλαγή μέσου δεν ευνοεί την ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA.

## 12.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Στις επιλεγόμενες συνθήκες η αναλυτική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου IL-CNTPE διερευνήθηκε.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 12.1.

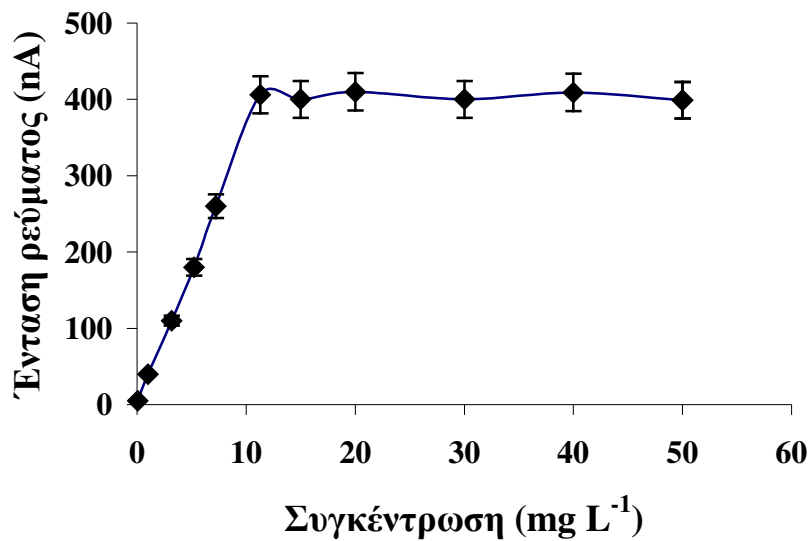
**Πίνακας 12.1:** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία διαφορικού παλμού (AdsDPV).

Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία διαφορικού παλμού (AdsDPV)	
Παράμετροι μέτρησης	Επιλεγόμενες συνθήκες
$E_{dep}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0,500 V
$t_{dep}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	60 s
$E_{begin}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{end}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{step}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{pulse}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{pulse}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 V s <sup>-1</sup>

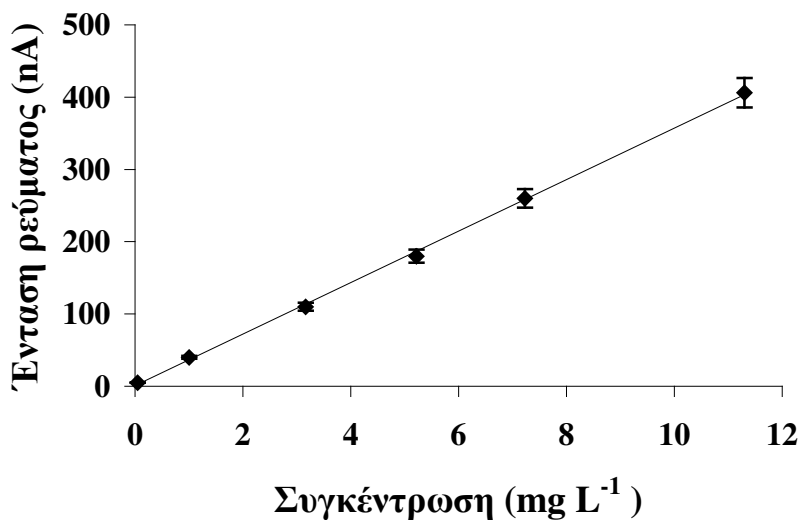
Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 12.10. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 12.10 η ένταση του ρεύματος οξειδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA, μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 11,30 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από 0,05 έως 11,30 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 12.11) εκφράζεται από την εξίσωση:

$I_p = 35,62(\pm 0,49) \gamma (\text{dsDNA}) + 0,86 (\pm 2,97), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$   
 με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,999.



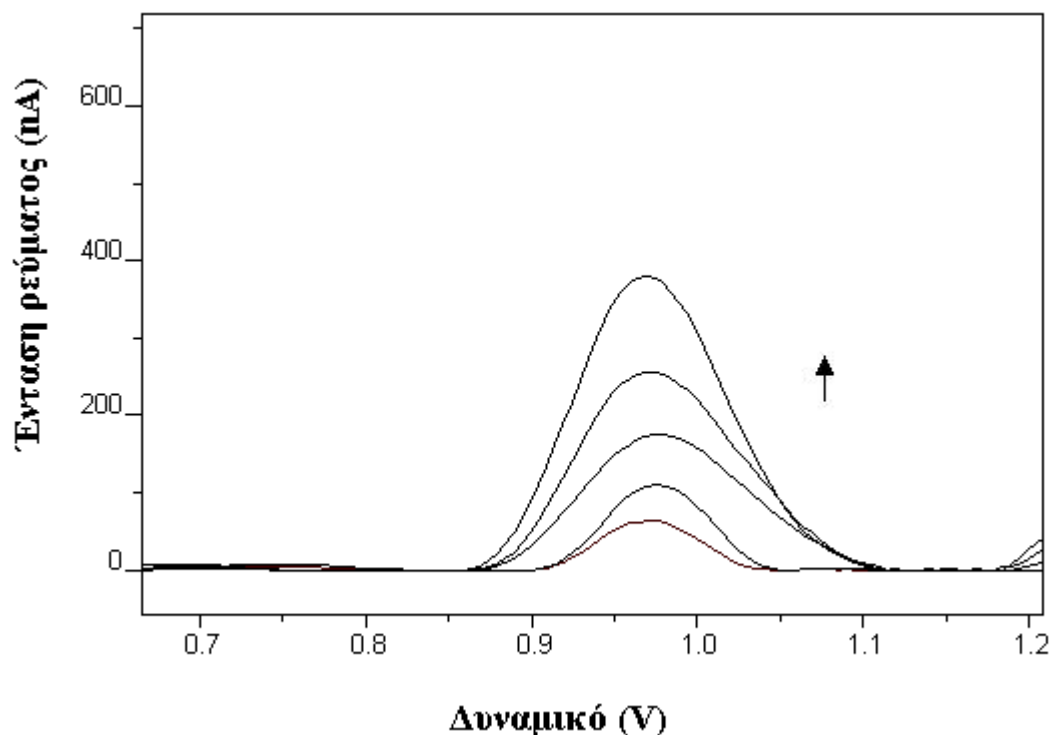
**Σχήμα 12.10.** Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 12.1 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες.



**Σχήμα 12.11.** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 12.1 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες



Στο σχήμα 12.12. παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 12.12.** Σειρά βολταμμογραφήματων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης dsDNA. Ο Πίνακας 12.1 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $0,83 \text{ mg L}^{-1}$ .

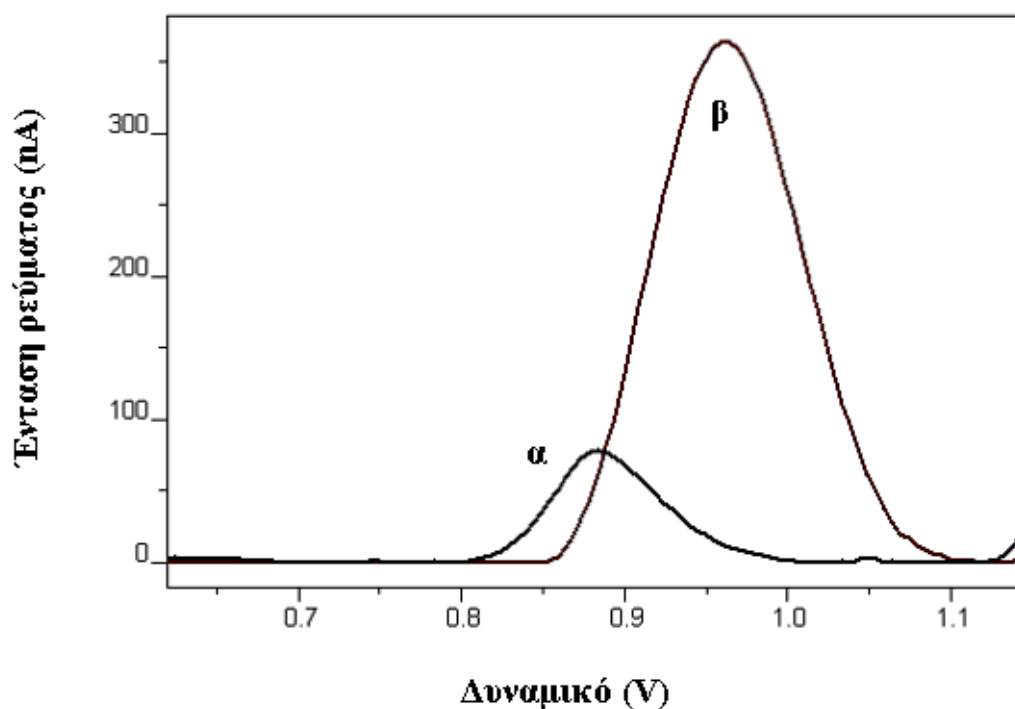
Προσδιορίστηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 12.2.

**Πίνακας 12.2** Μετρήσεις επαναληψιμότητας (n=6).

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,00	5,22	11,3
$s_r(\%)$	9,03	6,85	5,26

## 12.9 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ dsDNA ΣΤΟ CNTPE ΚΑΙ ΣΤΟ IL-CNTPE

Στο Σχήμα 12.13 απεικονίζονται τα βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του dsDNA ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε ηλεκτρόδιο CNTPE και σε ηλεκτρόδιο IL-CNTPE. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Κεφάλαιο 10 χρησιμοποιώντας ως συνδετικό μέσο στην πάστα νανοσωλήνων ορυκτό έλαιο και τη μέθοδο που αναπτύχθηκε σε αυτό το κεφάλαιο χρησιμοποιώντας ως συνδετικό μέσο ιοντικό υγρό, για τον προσδιορισμό του dsDNA, πραγματοποιήθηκε μια σύγκριση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων.



**Σχήμα 12.13.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού dsDNA ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε διαφορετικά ηλεκτρόδια: α) CNTPE και β) IL- CNTPE. Οι υπόλοιπες συνθήκες μέτρησης όπως αναφέρονται στην παράγραφο 12.2.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω Σχήμα 12.13, η κορυφή οξείδωσης της γουανίνης εμφανίζεται αυξημένη κατά 333,3% σε σύγκριση με το CNTPE στις βέλτιστες συνθήκες για το κάθε ηλεκτρόδιο και για την ίδια συγκέντρωση dsDNA, καταδεικνύοντας ότι η αντικατάσταση του ορυκτού ελαίου από το 1-βουτυλο-4-

μεθυλοπυριδινικό εξαφθοροφωσφορικό ιοντικό υγρό ευνοεί την προσρόφηση του dsDNA ,επιτρέποντας την αύξηση του σήματος οξείδωσης των καταλοίπων γουανίνης [198].

## **12.10 ΕΦΑΡΜΟΓΗ**

DNA προερχόμενο από υγιή εθελοντή, έπειτα από γραπτή συγκατάθεση, χρησιμοποιήθηκε για να δοκιμαστεί η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε.

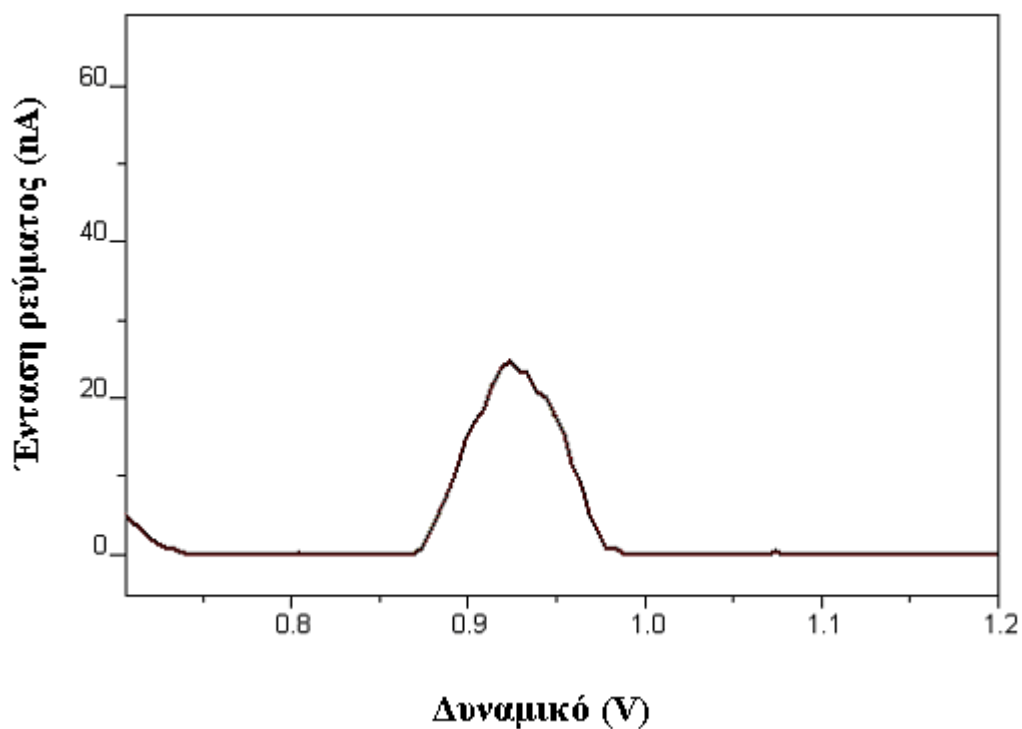
### **12.10.1 Προετοιμασία δείγματος**

Η προετοιμασία του δείγματος του DNA, το οποίο ήταν διαλυμένο σε  $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl +  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  EDTA, (pH 8,00) περιλάμβανε την αραίωση του με το φέροντα ηλεκτρολύτη ( $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00)). Η ακινητοποίηση του DNA και η μέτρηση πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στον πίνακα 12.1.

Για την αποφυγή των παρεμποδίσεων ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης πρότυπου διαλύματος dsDNA.

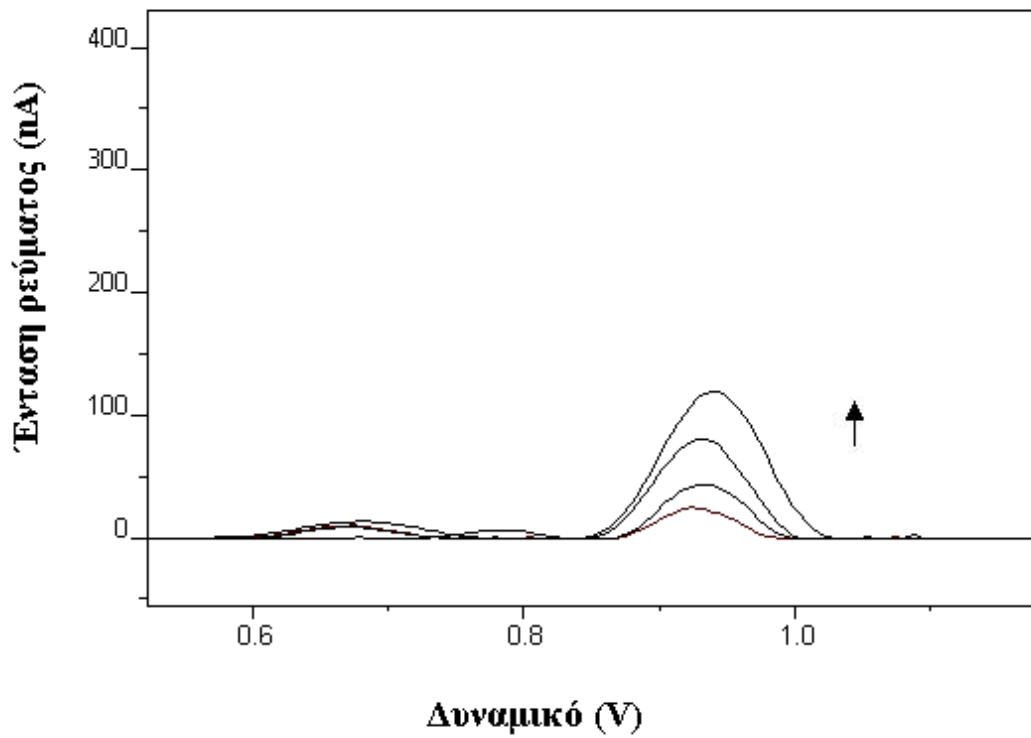
### **12.10.2 Προσδιορισμός DNA**

Στο Σχήμα 12.14 δίνεται το βολταμμογράφημα του δείγματος DNA που προκύπτει με εφαρμογή των παραπάνω συνθηκών. Όπως φαίνεται εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με 0,92 V.

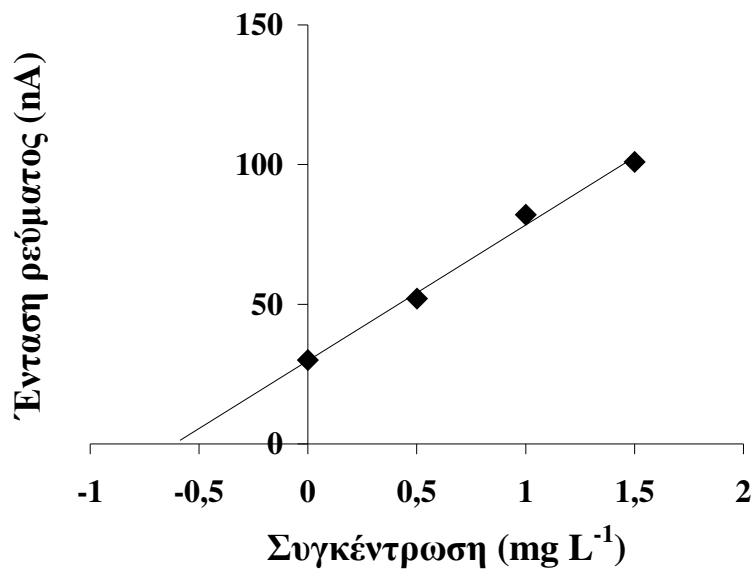


**Σχήμα 12.14.** Βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού δείγματος DNA απομονωμένου από υγιή εθελοντή. Συνθήκες όπως αναφέρονται στον Πίνακα 12.1.

Στο Σχήμα 12.15 δίνονται τα βολταμμογραφήματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA , ενώ στο Σχήμα 12.16 δίνεται η καμπύλη προσθήκης γνωστών ποσοτήτων σύμφωνα με την οποία η ποσότητα του DNA στο δείγμα προσδιορίστηκε ίση με  $0,61 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$  ( $n=3$ ).



**Σχήμα 12.15.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον προσδιορισμό απομονωμένου DNA από υγιή εθελοντή, Από κάτω προς τα πάνω: δείγμα και τρεις σταθερές προσθήκες  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA. Συνθήκες όπως αναφέρονται στον Πίνακα 12.1.



**Σχήμα 12.16.** Καμπύλη προσθήκης γνωστών ποσοτήτων. Συνθήκες όπως αναφέρονται στον Πίνακα 12.1.

## 12.11 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Συνοψίζοντας, διαπιστώθηκε ότι, με χρήση του 1-βουτυλο-4-μεθυλοπυριδινικού εξαφθοροφωσφορικού ιοντικού υγρού ως συνδετικού μέσου για την κατασκευή ηλεκτροδίου πάστας νανοσωλήνων άνθρακα μπορεί να επιτευχθεί άμεση ηλεκτροχημική μελέτη του dsDNA. Σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00), έπειτα από ακινητοποίηση του dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εμφανίστηκαν δυο πολύ καλά σχηματισμένες κορυφές, οι οποίες αποδόθηκαν στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης και της αδεΐνης του μορίου του dsDNA,. Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από σύντομο χρόνο ακινητοποίησης και με όριο ανίχνευσης ίσο με  $0,249 \text{ mg L}^{-1}$  χρησιμοποιώντας την τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (AdsDPV).

## **13. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ**

### **13.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ**

Το ηλεκτρόδιο εργασίας κατασκευάστηκε με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με τα εξής χαρακτηριστικά: διάμετρος 110-170 nm, μήκος 5-9 μm και καθαρότητα >90%.

Η προκατεργασία των MWNTs πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 11 (παράγραφος 11.1).

### **13.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Το ηλεκτρόδιο πάστας σκόνης γραφίτη άνθρακα (CPE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη, σε μια κάψα, σκόνης γραφίτη άνθρακα και ορυκτού ελαίου σε αναλογία 75:25 (w/w) μέχρι να σχηματιστεί μια ομογενοποιημένη πάστα.

Στη συνέχεια η ομογενοποιημένη πάστα μεταφερόταν μέσα στο ηλεκτρόδιο και η επιφάνεια του ηλεκτροδίου γυαλιζόταν με ειδικό χαρτί, για να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία.

Το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs / CPE) κατασκευάστηκε με εμποτισμό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου CPE με 3,0 μL εναιωρήματος MWNTs και εξάτμιση του διαλύτη.

### **13.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **13.2.1 Προκατεργασία του ηλεκτροδίου εργασίας**

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η προκατεργασία του ηλεκτροδίου περιλάμβανε την εφαρμογή σταθερού δυναμικού για ορισμένο χρόνο, χωρίς ανάδευση, σε καθαρό

ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}+20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\text{NaCl}$ , (pH 5,00).

- **Ακίνητοποίηση του DNA**

Μετά την προκατεργασία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, το ηλεκτρόδιο εργασίας μεταφέρονταν σε κυψελίδα που περιείχε το διάλυμα του dsDNA. Η ακίνητοποίησή του γινόταν με εφαρμογή σταθερού δυναμικού για ορισμένο χρόνο, με συνεχή ανάδευση.

- **Μετάλλαξη σήματος – Μέτρηση**

- **Κυκλική βολταμετρία**

Μετά την ακίνητοποίηση του dsDNA, το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εκπλύθηκε με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα για 10 s και μεταφέρθηκε σε κυψελίδα που περιείχε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόστηκε κυκλική βολταμετρία.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00-5,80),  $\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,00- 7,80) και Tris-EDTA pH 8,0. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 έως +1,4 V με διαφορετικές ταχύτητες σάρωσης ( $0,01-0,1 \text{ V s}^{-1}$ ) και βήμα δυναμικού ίσο με 0,005 V. Το δυναμικό προσυγκέντρωσης ήταν 0,5 V, ενώ ο χρόνος προσυγκέντρωσης ήταν 300 s.

- **Βολταμετρία διαφορικού παλμού**

Μετά την ακίνητοποίηση του dsDNA, το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εκπλύθηκε με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα για 10 sec και μεταφέρθηκε σε κυψελίδα που περιείχε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόστηκε βολταμετρία διαφορικού παλμού με σάρωση του δυναμικού από 0 V έως +1,4 V, ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού  $0,050 \text{ V s}^{-1}$ , δυναμικό παλμού 0,025 V, βήμα δυναμικού 0,005 V.

Στο συγκεκριμένο εύρος δυναμικού γίνεται οξείδωση των καταλοίπων γουανίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με +1,009V [258]. Η κορυφή οξείδωσης της γουανίνης χρησιμοποιήθηκε ως το υπό παρακολούθηση αναλυτικό σήμα.

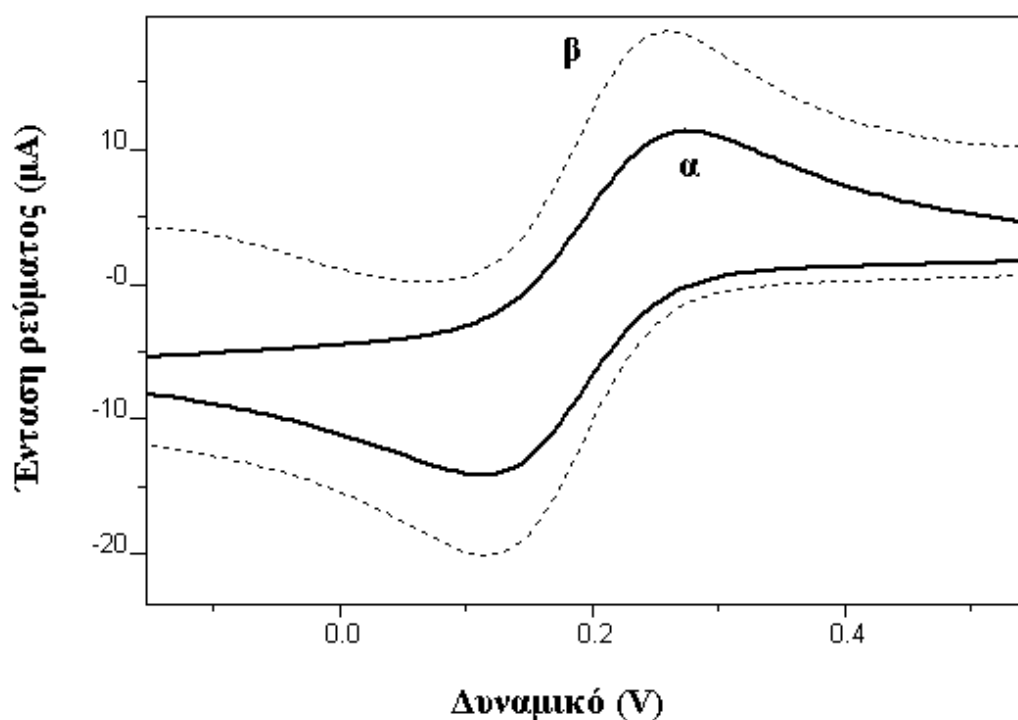
Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με αναγέννηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με κοπή και λείανσή της σε ένα ειδικό χαρτί. Η



παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν πριν από κάθε μέτρηση. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

### 13.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ MWNTS / CPE

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου CPE και του ηλεκτροδίου MWNTs / CPE διερευνήθηκε σε διάλυμα  $K_3[Fe(CN)_6]$  με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας (Σχήμα 13.1). Ως φέρων ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ . Η συγκέντρωση του  $K_3[Fe(CN)_6]$  ήταν  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από  $-0,6 \text{ V}$  έως  $+1,0 \text{ V}$ , ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .

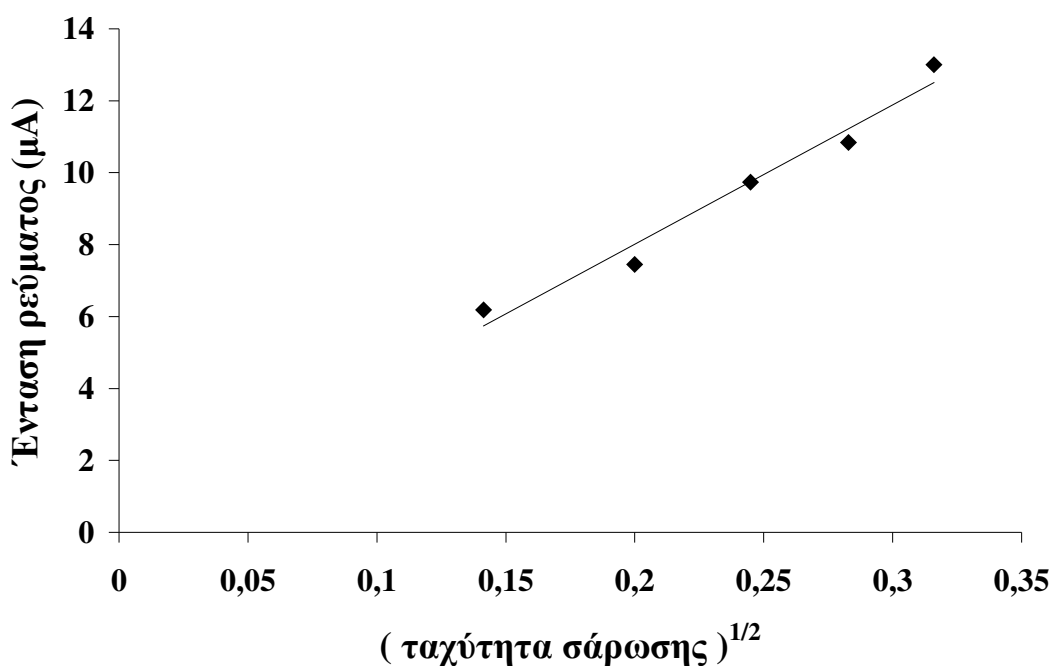


**Σχήμα 13.1.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα των ηλεκτροδίων: α) CPE και, β) MWNTs/CPE διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ . Ταχύτητα σάρωσης δυναμικού:  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ .

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα.13.1 ένα καλά καθορισμένο ζεύγος οξειδοαναγωγικών κορυφών του  $K_3 [Fe(CN)_6]$  λαμβάνεται και στα δύο ηλεκτρόδια,

όπως υποδεικνύεται από τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της ανοδικής και της καθοδικής κορυφής ( $\Delta E_p$ ), η οποία είναι 145 και 120 mV για τα ηλεκτρόδια CPE και MWNTs/CPE, αντίστοιχα. Με τη χρήση του ηλεκτροδίου MWNTs /CPE (καμπύλη β) οι εντάσεις των ρευμάτων των αντίστοιχων κορυφών αυξήθηκαν, γεγονός που δείχνει την αύξηση της γεωμετρικής επιφάνειας.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης Randles-Sevcik (σχέση 10.1) προσδιορίστηκε η γεωμετρική επιφάνεια του ηλεκτροδίου CPE και του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE αντικαθιστώντας τις τιμές των  $D$ ,  $n$ ,  $\nu$  και  $C$ . Για το οξειδοαναγωγικό σύστημα που μελετήθηκε, ( $K_3 [Fe(CN)_6]$ ),  $n = 1$ ,  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , ενώ ο λόγος του ρεύματος κορυφής προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού ( $I_p / \nu^{1/2}$ ), για το ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης που δίνεται στο Σχήμα 13.2. Ο αντίστοιχος λόγος για το ηλεκτρόδιο CPE υπολογίστηκε στο κεφάλαιο 10 (Σχήμα 10.3).



**Σχήμα 13.2** Μεταβολή της έντασης της ανοδικής κορυφής του διαλύματος  $10^{-6} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} KCl$  ηλεκτροδίου MWNTs/CPE με την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω οι γεωμετρικές επιφάνειες των ηλεκτροδίων CPE και MWNTs/CPE υπολογίστηκαν σε 0,029 και 0,052 cm<sup>2</sup>, αντίστοιχα.

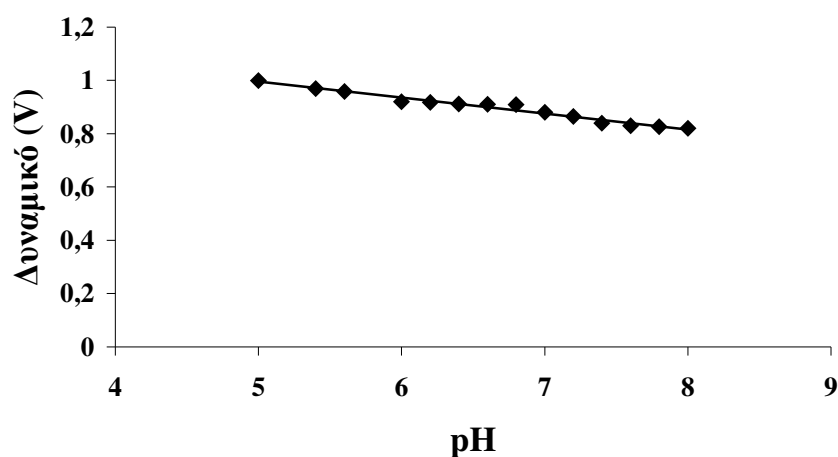
### 13.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

Η επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA στο ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE μελετήθηκε με κυκλική βολταμετρία. Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν 50 mg L<sup>-1</sup>. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 V έως +1,4V, ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν 0,05 V s<sup>-1</sup>.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 13.3, όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αυξάνεται, τα δυναμικά κορυφής οξείδωσης των καταλοίπων της γουανίνης στο μόριο του dsDNA μετατοπίζονται προς την αρνητική κατεύθυνση, υποδεικνύοντας ότι στη διεργασία μεταφοράς ηλεκτρονίων του dsDNA συμμετέχουν και πρωτόνια.

Η γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης μεταξύ της κορυφής του δυναμικού οξείδωσης και του pH του ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορίστηκε ως :

$E_{pa} \text{ (V)} = -0,0600 \text{ pH} + 1,293$  (n=16,  $r^2 = 0,965$ ) για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης.



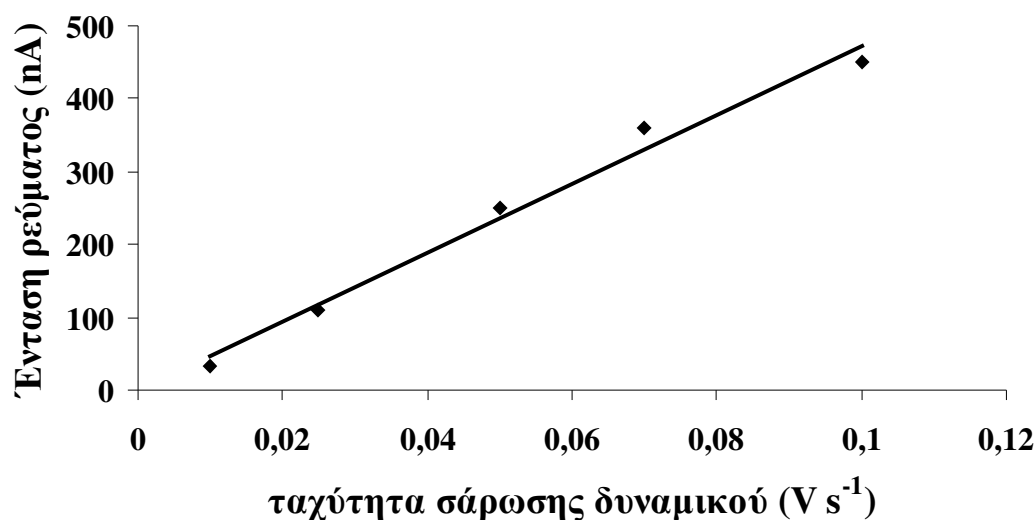
**Σχήμα 13.3.** Επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στα δυναμικά κορυφής οξείδωσης της γουανίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης :300 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

Η κλίση των 60,0 mV / pH έδειξε ότι δύο πρωτόνια έλαβαν μέρος στο πρώτο στάδιο της οξειδωσης της γουανίνης [199].

Εφόσον, η μέγιστη κορυφή οξειδωσης της γουανίνης ελήφθη σε pH 5,00, το pH αυτό λαμβάνεται ως βέλτιστο για τα επόμενα πειράματα.

### 13.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Η επίδραση της ταχύτητας σάρωσης στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA στο ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE αξιολογήθηκε με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 V έως +1,4V και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού κυμάνθηκε από 0,01 έως  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .



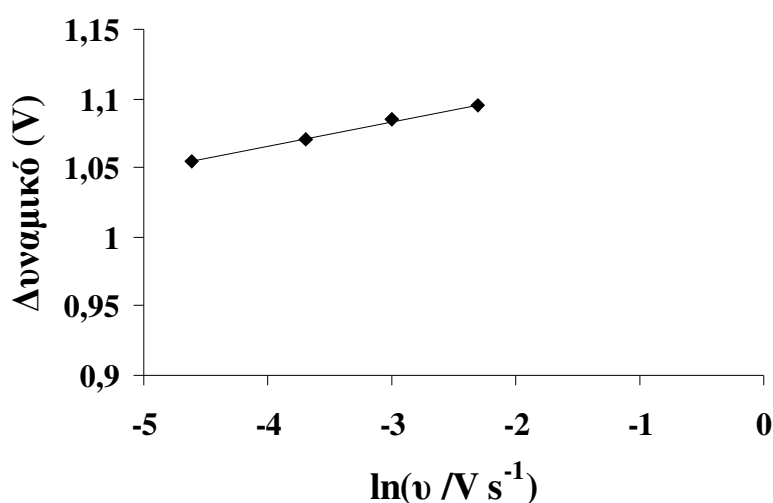
**Σχήμα 13.4.** Επίδραση της ταχύτητας σάρωσης στο ύψος της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 13.4, η ένταση του ανοδικού ρεύματος κορυφής που οφείλεται στην οξειδωση της γουανίνης αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού, αποδεικνύοντας ότι η οξειδωση της γουανίνης στο ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE είναι μια διεργασία ελεγχόμενη από την προσρόφιση.

Η αντίστοιχη γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης προσδιορίστηκε ως :

$I_{pa} \text{ (nA)} = 4748,0 v \text{ (V s}^{-1}) - 2,114 \text{ (n=5, } r^2=0,998)$  για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης,

Επιπλέον το δυναμικό κορυφής οξείδωσης μετατοπίζεται προς θετικότερες τιμές καθώς αυξάνεται η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (Σχήμα 13.5). Γραμμικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ του ανοδικού δυναμικού κορυφής ( $E_p$ ) και του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης ( $\ln(v)$ ) που περιγράφεται από την ακόλουθη γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης:  
 $E_{pa} \text{ (V)} = 0,018 \ln(v/V \text{ s}^{-1}) + 1,14 \text{ (n=4, } r^2=0,995)$  για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης



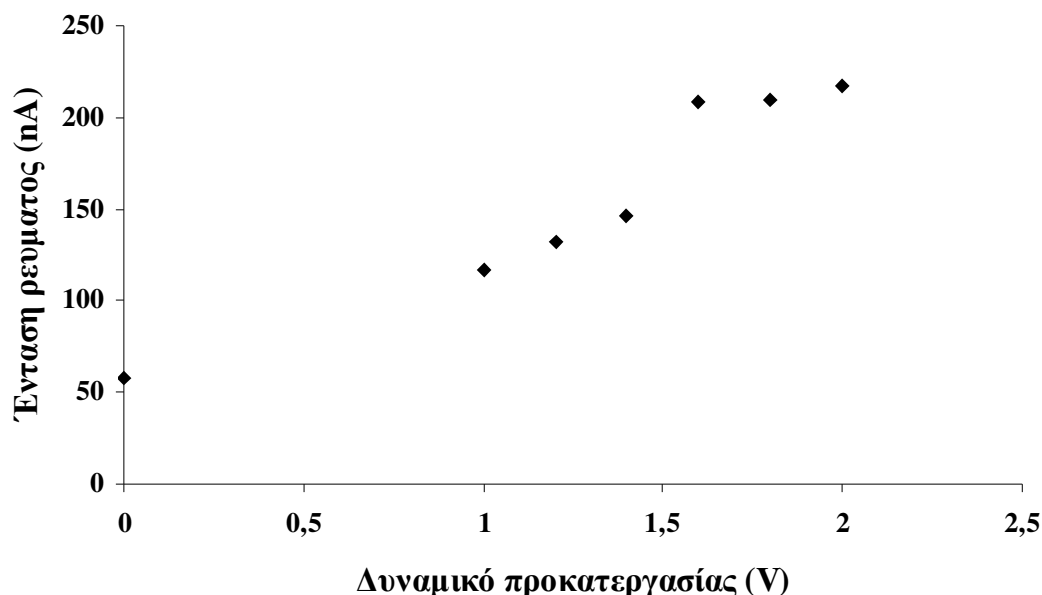
**Σχήμα 13.5.** Επίδραση του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης στο δυναμικό της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V.

Σύμφωνα με την εξίσωση 12.2, η ετερογενής σταθερά μεταφοράς ηλεκτρονίων ( $k_s$ ) υπολογίστηκε ίση με  $0,89 \text{ s}^{-1}$ . Οι τιμές των  $\alpha$  και του  $E^0$  υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση 12.1 και βρέθηκαν ίσα με 0,30 και 1,136 V, αντίστοιχα.

### 13.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟΥ

Το Σχήμα 13.6 δείχνει την επίδραση του δυναμικού προκατεργασίας στην κορυφή οξείδωσης της γουανίνης του dsDNA, το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του προκατεργασμένου ηλεκτροδίου, με χρήση βολταμετρίας διαφορικού παλμού. Εφαρμόζοντας την ποτενσιοστατική μέθοδο προκατεργασίας το ύψος της κορυφής

οξειδωσης της γουανίνης αυξάνεται σε πιο θετικά δυναμικά. Με βάση, λοιπόν, τα χαρακτηριστικά της κορυφής της γουανίνης, τα δυναμικά προκατεργασίας επιλέχθηκε να είναι ίσο με + 1,6 V.



**Σχήμα 13.6.** Επίδραση του δυναμικού προκατεργασίας στο ύψος της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Φέρων ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00), χρόνος προσυγκέντρωσης : 120 s, δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,5 V. Η προκατεργασία πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό για 30 s στο καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα.

Διαφορετικοί χρόνοι ενεργοποίησης που κυμάνθηκαν από 10 έως 240 s μελετήθηκαν εφαρμόζοντας τα παραπάνω επιλεγμένα δυναμικά. Το dsDNA ακινητοποιήθηκε επί των προκατεργασμένων ηλεκτροδίων με εφαρμογή ενός δυναμικού 0,5 V επί 300 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00) που περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA, με συνεχή ανάδευση (λεπτομέρειες στην παράγραφο 13.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ο βέλτιστος χρόνος προκατεργασίας είναι τα 180s.

## 13.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

### 13.8.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του δυναμικού ακινητοποίησης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης του dsDNA αξιολογήθηκε και παρουσιάζεται στον πίνακα 13.1. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa } 0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00). Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 13.1, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης, όταν το δυναμικό ακινητοποίησης μεταβάλλεται από 0 έως 0,6 V. Αυτό συνεπάγεται ότι το δυναμικό ακινητοποίησης δεν επηρεάζει ιδιαίτερα την προσρόφιση του dsDNA στο ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα επιλέχθηκε δυναμικό προσυγκέντρωσης ίσο με 0,2 V.

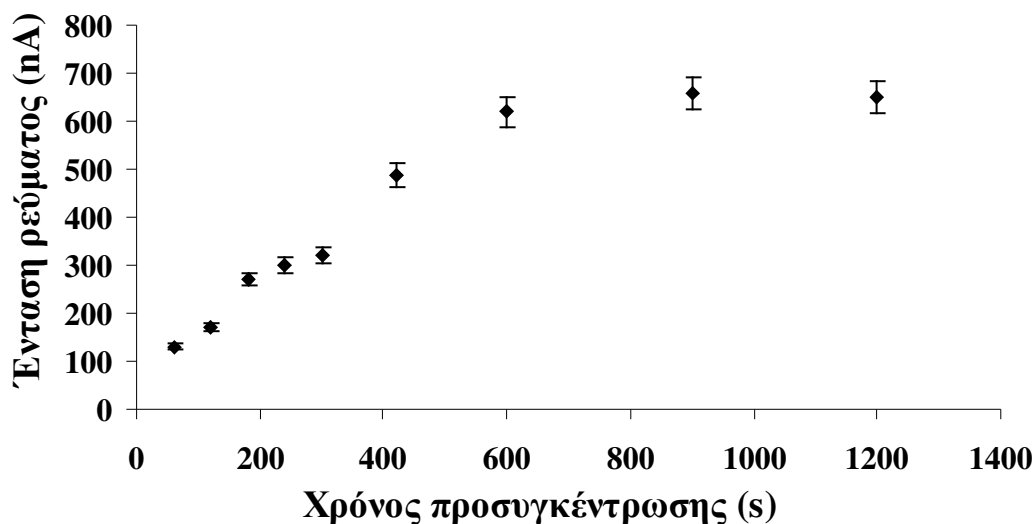
**Πίνακας 13.1:** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa } 0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00), χρόνος προσυγκέντρωσης : 180 s, προκατεργασία: 1,6 V για 180 s στο φέροντα ηλεκτρολύτη.

Δυναμικό προσυγκέντρωσης (V)	Ένταση ρεύματος (nA)
0	273
0,1	220
0,2	281
0,3	263
0,4	245
0,5	274
0,6	207

### 13.8.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα οξείδωσης της γουανίνης μελετήθηκε στο διάστημα 0 – 1200 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-$

$\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00) που περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA (Σχήμα 13.7). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 13.7, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, από 0-600 s, το ύψος της κορυφής του dsDNA αυξάνεται. Σε χρόνους προσυγκέντρωσης μεγαλύτερους των 600 s το ύψος της κορυφής μειώνεται και σταδιακά σταθεροποιείται. Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγονται τα 600 s.



**Σχήμα 13.7.** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφή οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (pH 5,00), δυναμικό προσυγκέντρωσης : 0,2 V, προκατεργασία: 1,6 V για 180 s στο φέροντα ηλεκτρολύτη.

### 13.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Στις επιλεγόμενες συνθήκες διερευνήθηκε η αναλυτική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 13.2.



**Πίνακας 13.2:** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV).

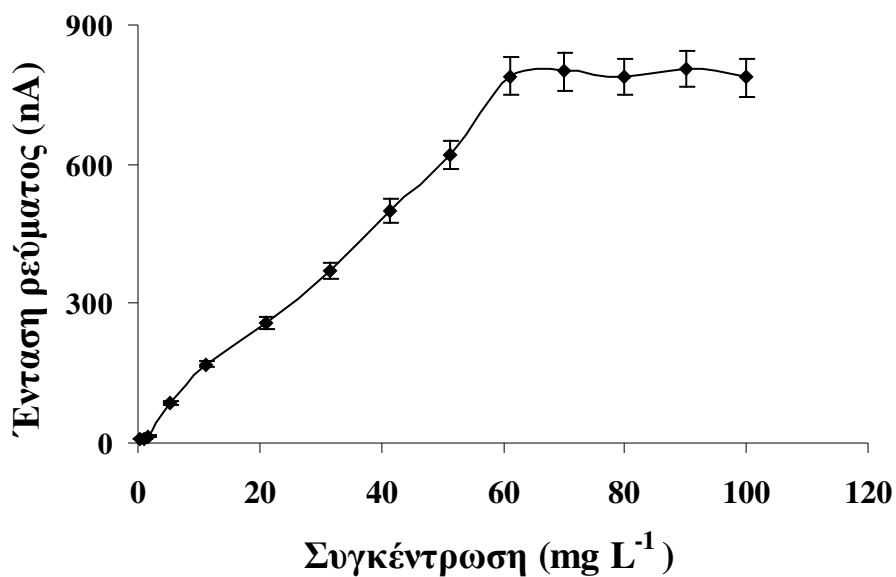
Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού αλλαγής μέσου (AdsTDPV)	
Παράμετροι μέτρησης	Επιλεγόμενες συνθήκες
$E_{\text{cond}}$ (δυναμικό προκατεργασίας)	1,600 V
$t_{\text{cond}}$ (χρόνος προκατεργασίας)	180 s
$E_{\text{dep}}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0,200 V
$t_{\text{dep}}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	600 s
$E_{\text{begin}}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{\text{end}}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{\text{step}}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{\text{pulse}}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{\text{pulse}}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,05 V s <sup>-1</sup>

Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 13.8. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 13.8 η ένταση του ρεύματος οξειδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA, μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 61,0 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μια σταθεροποίηση της κορυφής λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

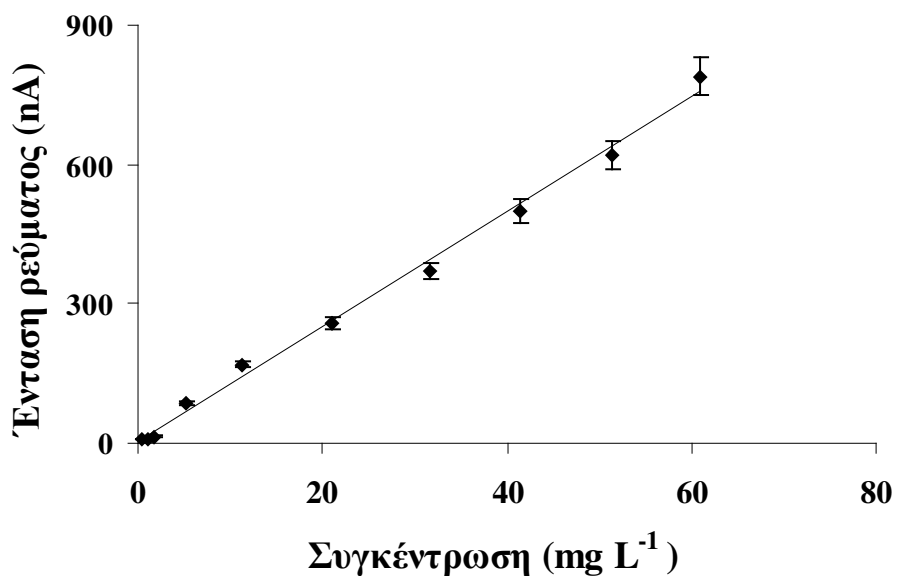
Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από 0,35 έως 61,0 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 13.9) εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 12,34(\pm 0,31) \gamma \text{ (dsDNA)} + 3,47 (\pm 9,79), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,995.

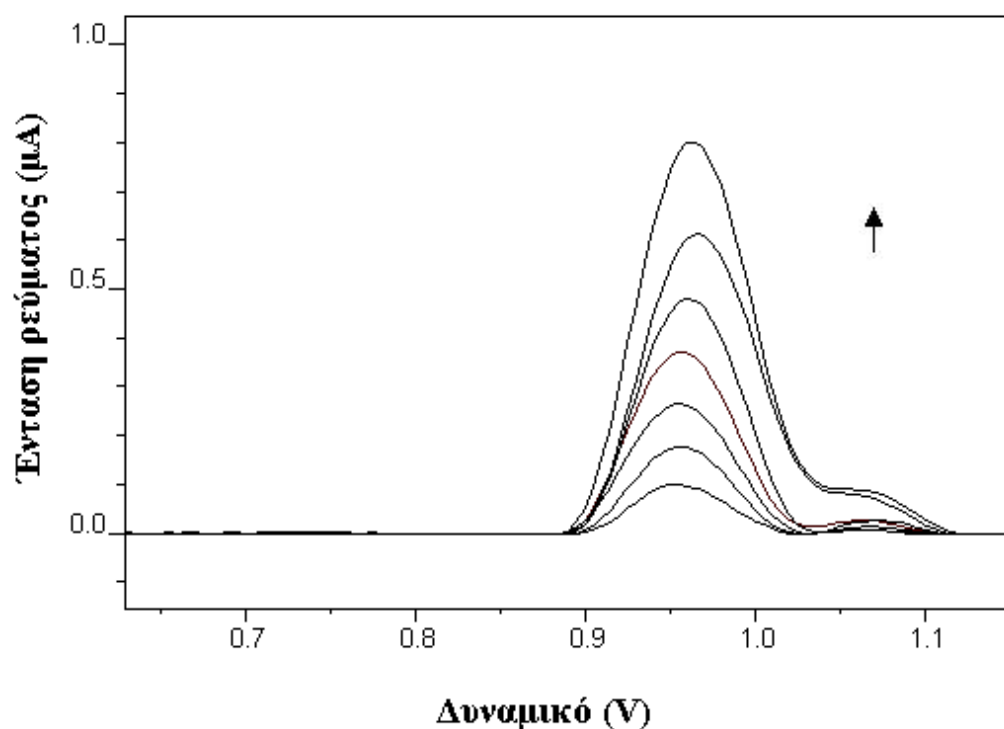


Σχήμα 13.8. Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 13.2 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



Σχήμα 13.9. Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 13.2 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες

Στο Σχήμα 13.10 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 13.10.** Σειρά βολταμμογραφημάτων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης dsDNA. Ο Πίνακας 13.2 περιέχει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $2,38 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $7,93 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίστηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 13.3.

**Πίνακας 13.3** Μετρήσεις επαναληψιμότητας ( $n=6$ ).

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	5,22	20,97	51,35
$s_r(\%)$	6,63	4,09	3,24

### 13.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Στο κεφάλαιο αυτό, χρησιμοποιήθηκε, ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ένα ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα μορφοποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/CPE), σε συνδυασμό με την αναδιαλυτική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdSTV), για τον προσδιορισμό του dsDNA. Διαπιστώθηκε αύξηση του σήματος οξείδωσης της γουανίνης σε σύγκριση με εκείνο που λαμβάνεται με τα συμβατικά ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPEs). Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, αρκετά χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν, έπειτα από σύντομο χρόνο ακινητοποίησης με όριο ανίχνευσης ίσο με  $2,38 \text{ mg L}^{-1}$ . Το όριο ανίχνευσης που λαμβάνεται με αυτό το ηλεκτρόδιο βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτό που επιτεύχθηκε με το ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (MWNTPE<sub>2</sub>) στο Κεφάλαιο 10. Το πλεονέκτημα, που παρουσιάζει το ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE, έγκειται στο γεγονός της χρήσης πολύ μικρότερης ποσότητας νανοσωλήνων άνθρακα κατά την προετοιμασία του ηλεκτροδίου.

## **14. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ dsDNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΤΑΣΕΝΕΡΓΩΝ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ**

### **14.1 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ**

Το ηλεκτρόδιο εργασίας κατασκευάστηκε με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) με τα εξής χαρακτηριστικά : διάμετρος 110-170 nm, μήκος 5-9 μm και καθαρότητα >90%.

Η προκατεργασία των MWNTs πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 11 (παράγραφος 11.1).

### **14.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

#### **14.2.1 Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/CPE)**

Το ηλεκτρόδιο MWNTs / CPE κατασκευάστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 13 (παράγραφος 13.2).

#### **14.2.2 Υμένιο κατιονικών τασενεργών ουσιών σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE)**

Το βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (DTAB) προσροφήθηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE από ένα διάλυμα 5μL ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) για 120 s, ενώ το βρωμιούχο τετραδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (TTAB) από ένα διάλυμα 5 μL ( $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>).

Στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια ξεπλένονται με διπλά απεσταγμένο H<sub>2</sub>O για την απομάκρυνση των μη προσροφημένων κατιονικών τασενεργών ουσιών'ν.

Η συγκέντρωση των διαλυμάτων των κατιονικών τασενεργών ουσιών από τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσρόφησή τους διερευνήθηκε μελετώντας την επίδραση της συγκέντρωσής τους στην αλληλεπίδρασή τους με το dsDNA και το  $K_3 [Fe (CN)_6]$ . Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, όταν η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών αυξανόταν παραπάνω από τις τιμές που προαναφέρθηκαν η προσρόφηση των DTAB και TTAB αυξανόταν επίσης με αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας του σχηματιζόμενου πάλω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια υμενίου εμποδίζοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων [256].

### **14.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **14.3.1 Κυκλική βολταμετρία**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $CH_3COOH-CH_3COONa$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00-5,80),  $KH_2PO_4-Na_2HPO_4$  (pH 6,00- 7,80) και Tris-EDTA pH 8,0. Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 έως +1,4 V με διαφορετικούς ρυθμούς σάρωσης ( $0,01-0,1 \text{ V s}^{-1}$ ) και το βήμα δυναμικού  $0,005 \text{ V}$ . Ο χρόνος προσυγκέντρωσης ήταν  $300 \text{ s}$ .

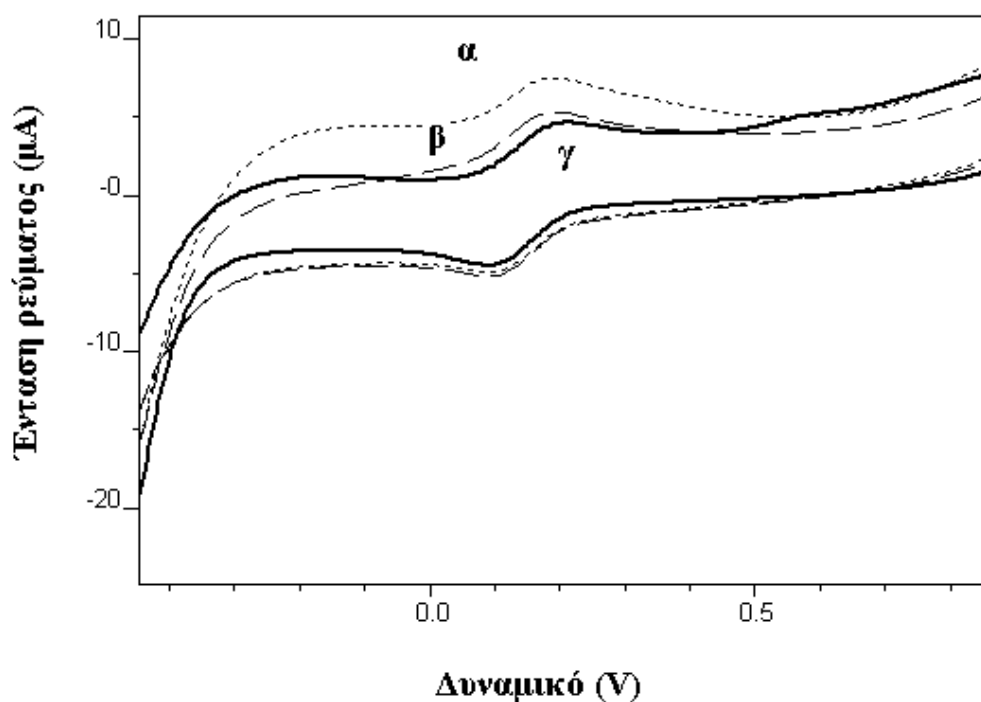
#### **14.3.2 Βολταμετρία διαφορικού παλμού**

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα  $CH_3COOH-CH_3COONa$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 έως +1,4 V, η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ , το δυναμικό παλμού  $0,025 \text{ V}$ , και το βήμα δυναμικού  $0,005 \text{ V}$ . Το δυναμικό προσυγκέντρωσης κυμαινόταν από 0 έως  $0,6 \text{ V}$ , ο χρόνος προσυγκέντρωσης κυμαινόταν από 0 έως  $600 \text{ s}$ , ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε χωρίς την εφαρμογή δυναμικού.

### **14.4 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ DTAB/MWNTS/CPE ΚΑΙ TTAB/MWNTS/CPE**

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του οξειδοαναγωγικού συστήματος  $K_3[Fe (CN)_6]$  στα ηλεκτρόδια MWNTs/CPE, DTAB/ MWNTs/CPE και TTAB/ MWNTs/CPE ερευνήθηκε με κυκλική βολταμετρία (Σχήμα 14.1). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα

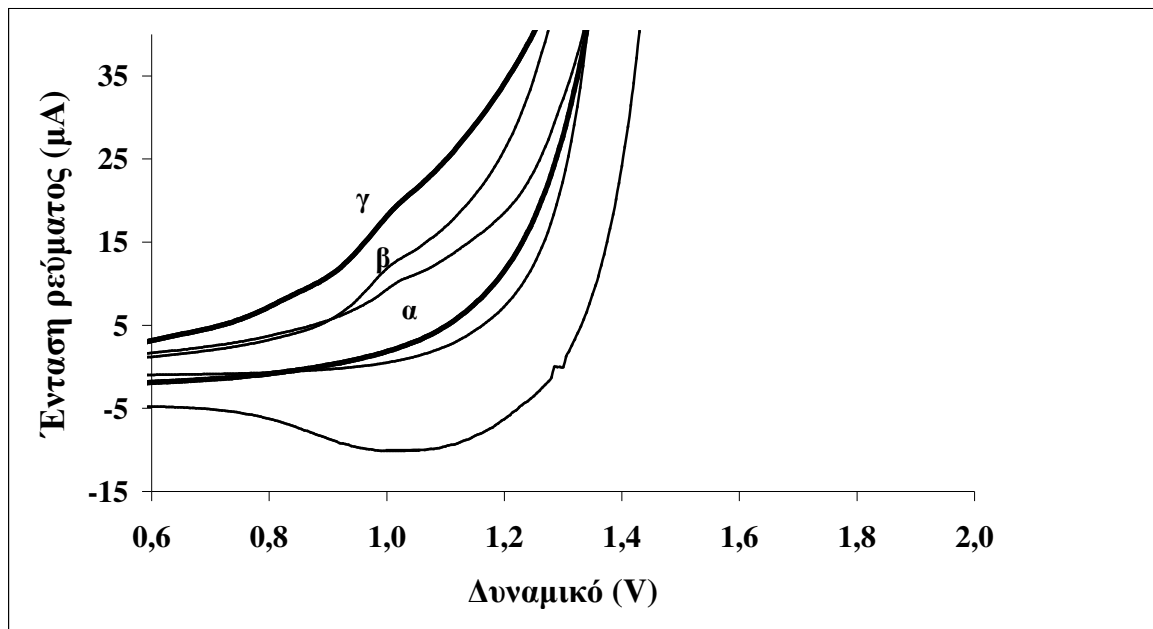
14.1, ένα καλά καθορισμένο ζεύγος οξειδοαναγωγικών κορυφών του  $K_3 [Fe(CN)_6]$  λαμβάνεται σε όλους τους τύπους των ηλεκτροδίων όπως υποδεικνύεται από την διαφορά δυναμικού μεταξύ της ανοδικής και της καθοδικής κορυφής ( $\Delta E_p$ ), η οποία είναι 100 , 95 και 85 mV για τα ηλεκτρόδια MWNTs/CPE, DTAB/ MWNTs/CPE και TTAB/ MWNTs/CPE, αντίστοιχα.



**Σχήμα 14.1.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος  $10^{-7} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$  σε  $0,2 \text{ mol L}^{-1} KCl$  χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδια εργασίας: α) MWNTs/CPE, β) DTAB/MWNTs/CPE και γ) TTAB/ MWNTs/CPE . Ταχύτητα σάρωσης δυναμικού :  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ .

Στο Σχήμα 14.2 απεικονίζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) στα ηλεκτρόδια MWNTs/CPE, DTAB/ MWNTs/CPE και TTAB/ MWNTs/CPE. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 14.2, μια κορυφή οξείδωσης εμφανίζεται και στα τρία ηλεκτρόδια, η οποία αποδίδεται στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης στο μόριο του dsDNA. Στο ηλεκτρόδιο MWNTs/CPE η ένταση της κορυφής οξείδωσης είναι 457 nA, στο ηλεκτρόδιο DTAB/ MWNTs/CPE 600 nA και στο ηλεκτρόδιο TTAB/ MWNTs/CPE 620 nA.

Σύμφωνα λοιπόν με τα πειραματικά αποτελέσματα, η ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA βελτιώνεται σημαντικά με την τροποποίηση των ηλεκτροδίων με τα κατιονικά τασενεργά.



**Σχήμα 14.2.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδια εργασίας: α) MWNTs/CPE<sub>1</sub>, β) DTAB/MWNTs/CPE και γ) TTAB/ MWNTs/CPE . Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , χρόνος προσογκέντρωσης :  $300 \text{ s}$  και ταχύτητα σάρωσης δυναμικού :  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ .

#### 14.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH

Η επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA των ηλεκτροδίων που μελετώνται, μελετήθηκε με κυκλική βολταμμετρία. Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από  $0 \text{ V}$  έως  $+1,4\text{V}$ , ενώ η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ήταν  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ .

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 14.3, όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αυξάνεται , τα δυναμικά κορυφής οξείδωσης των καταλοίπων της



γουανίνης στο μόριο του dsDNA μετατοπίζονται προς την αρνητική κατεύθυνση, υποδεικνύοντας ότι στη διεργασία μεταφοράς ηλεκτρονίων του dsDNA συμμετέχουν και πρωτόνια.

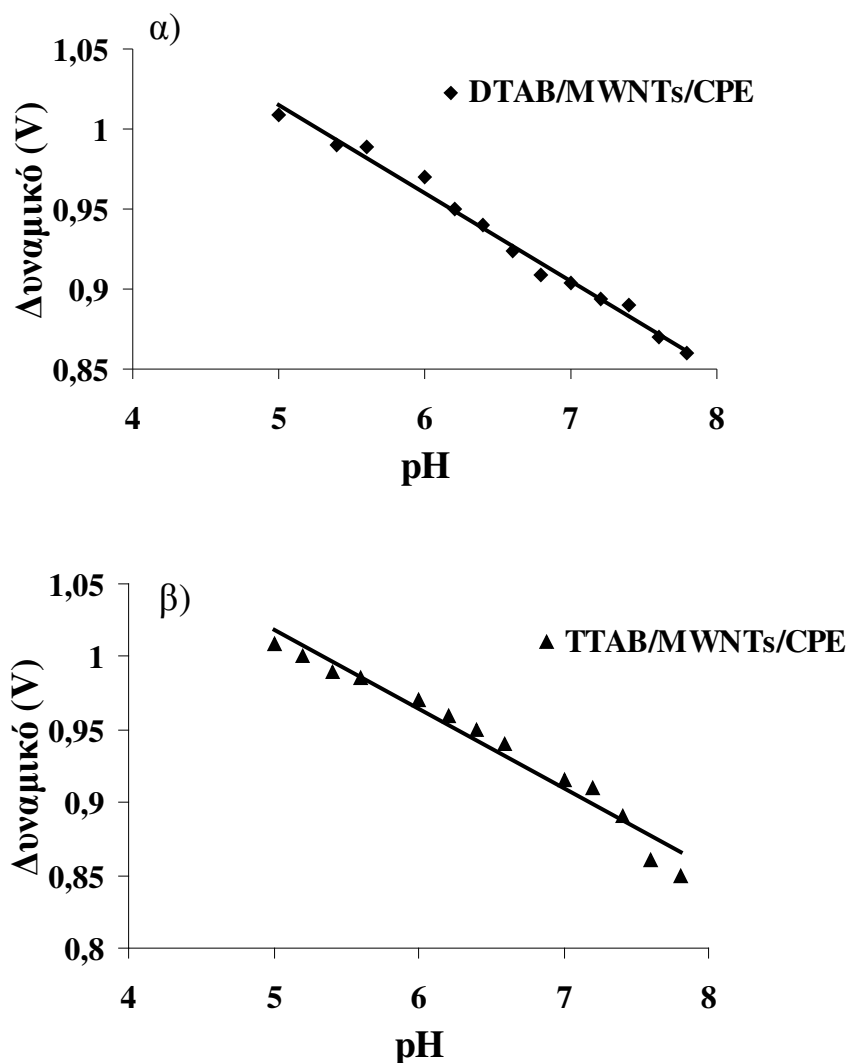
Η γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης μεταξύ της κορυφής του δυναμικού οξείδωσης και του pH του ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορίστηκε ως:

$E_{pa} \text{ (V)} = -0,0550 \text{ pH} + 1,290$  (n=16,  $r^2 = 0,988$ ) για το ηλεκτρόδιο DTAB/MWNTs/CPE και

$E_{pa} \text{ (V)} = -0.0544 \text{ pH} + 1.291$  (n=16,  $r^2=0.966$ ) για το ηλεκτρόδιο TTAB/MWNTs/CPE.

Οι κλίσεις των 55,5 mV / pH και 54,4 mV / pH δείχνουν ότι δύο πρωτόνια έλαβαν μέρος στο πρώτο στάδιο της οξείδωσης της γουανίνης και στα δύο ηλεκτρόδια [199].

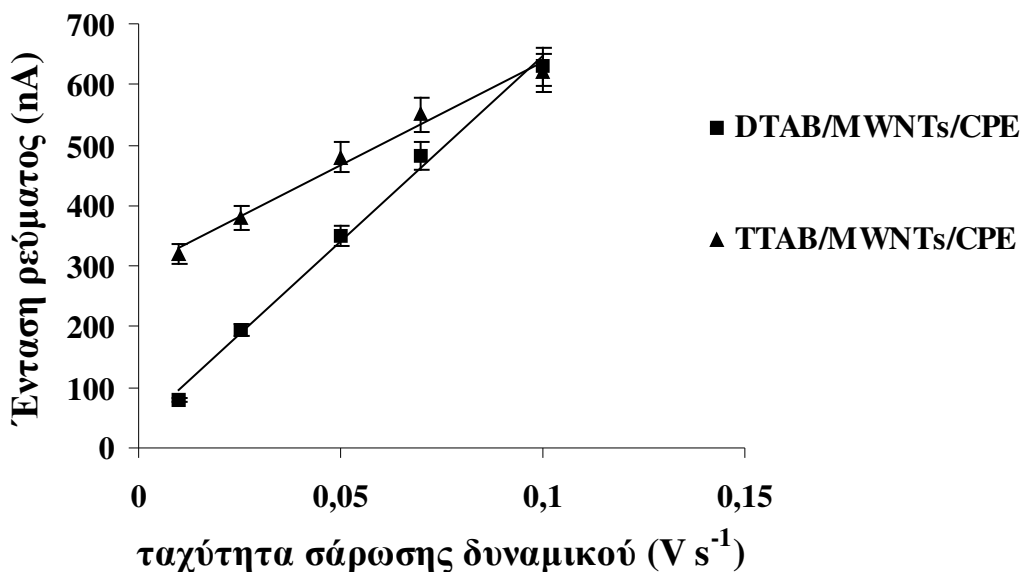
Εφόσον, η μέγιστη κορυφή οξείδωσης της γουανίνης ελήφθη σε pH 5,00 και για τα δύο ηλεκτρόδια, το pH αυτό λαμβάνεται ως βέλτιστο για τα επόμενα πειράματα.



**Σχήμα 14.3.** Επίδραση του pH του φέροντα ηλεκτρολύτη στα δυναμικά της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης στα ηλεκτρόδια: α)DTAB/MWNTs/CPE και β)TTAB/MWNTs/CPE. Χρόνος προσυγκέντρωσης :300 s.

#### 14.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Η επίδραση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA στα ηλεκτρόδια που μελετώνται αξιολογήθηκε με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμμετρίας σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Η συγκέντρωση του dsDNA ήταν  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , η σάρωση του δυναμικού πραγματοποιήθηκε από 0 V έως +1,4V και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού κυμάνθηκε από 0,01 έως  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .



**Σχήμα 14.4.** Επίδραση της ταχύτητας σάρωσης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω Σχήμα, η ένταση του ανοδικού ρεύματος κορυφής, που οφείλεται στην οξείδωση της γουανίνης αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της ταχύτητας σάρωσης, αποδεικνύοντας ότι η οξείδωση της γουανίνης στα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE είναι μια διεργασία ελεγχόμενη από την προσρόφιση.

Οι αντίστοιχες γραμμικές εξισώσεις παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν ως :

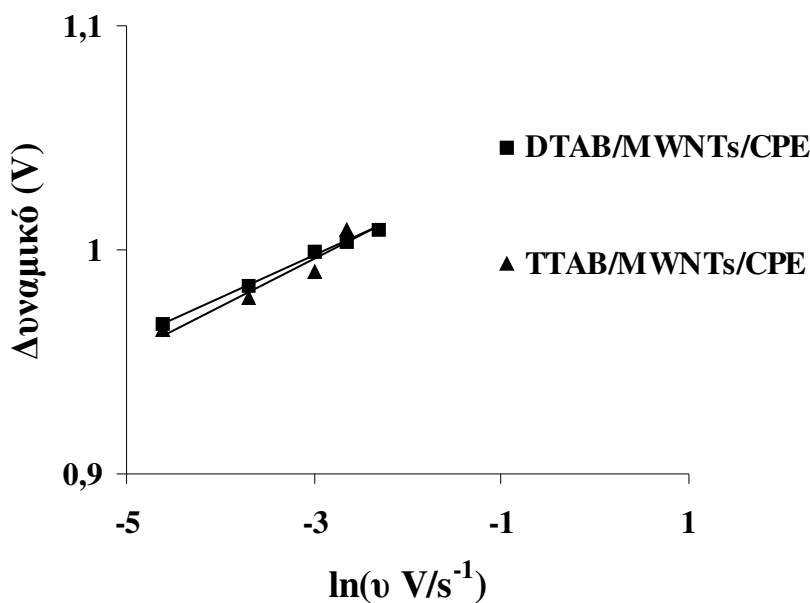
$I_{pa}$  (nA) = 6123,8 υ(V s<sup>-1</sup>) + 34,86 (n=5, r<sup>2</sup>=0,995) για το ηλεκτρόδιο DTAB/MWNTs/CPE και

$I_{pa}$  (nA) = 3388,7 υ(Vs<sup>-1</sup>) + 297,56 (n=5, r<sup>2</sup>=0,987) για το ηλεκτρόδιο TTAB/MWNTs/CPE.

Επιπλέον, το δυναμικό κορυφής οξείδωσης μετατοπίζεται προς θετικότερες τιμές, καθώς αυξάνεται η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (Σχήμα 14.5). Γραμμικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ του ανοδικού δυναμικού κορυφής (E<sub>p</sub>) και του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης (ln(υ)) που περιγράφονται από τις ακόλουθες γραμμικές εξισώσεις παλινδρόμησης:

$E_{pa}$  (V) = 0,019 ln(υ/V s<sup>-1</sup>) + 1,05 (n=5, r<sup>2</sup>=0,996) για το ηλεκτρόδιο DTAB/MWNTs/CPE και

$E_{pa}$  (V) = 0,018 ln(υ/V s<sup>-1</sup>) + 1,14 (n=4, r<sup>2</sup>=0,995) για το ηλεκτρόδιο TTAB/MWNTs/CPE.



**Σχήμα 14.5.** Επίδραση του λογαρίθμου της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού στο δυναμικό της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης. Χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s.

Σύμφωνα με την εξίσωση 12.2, η ετερογενής σταθερά μεταφοράς ηλεκτρονίων ( $k_s$ ) υπολογίστηκε ίση με  $0,67 \text{ s}^{-1}$  και  $0,74 \text{ s}^{-1}$  για τα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE, αντίστοιχα.. Οι τιμές των  $\alpha$  και του  $E^0$  υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση 12.1 και βρέθηκαν ίσες με 0,45 και 1,053 V, για το ηλεκτρόδιο DTAB/MWNTs/CPE, 0,41 και 1,059 V για το ηλεκτρόδιο TTAB/MWNTs/CPE.

#### 14.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΟΣ

Η επίδραση άλατος στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά του dsDNA στα ηλεκτρόδια που μελετώνται μελετήθηκε με τη χρήση της βολταμετρίας διαφορικού παλμού. Στο διάλυμα μέτρησης, το οποίο περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00), πραγματοποιήθηκε προσθήκη δύο διαφορετικών αλάτων: α)  $\text{NaCl}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  και β)  $\text{HCOONH}_4$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προσθήκη άλατος στο διάλυμα του φέροντα ηλεκτρολύτη δεν επιδρά θετικά στην ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του ύψους της κορυφής οξειδωσης της γουανίνης.

Δοκιμάστηκε, επίσης, η τεχνική της ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας αλλαγής μέσου, όπου η μετάλλαξη του σήματος πραγματοποιείται σε καθαρό διάλυμα του φέροντα ηλεκτρολύτη. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα η αλλαγή μέσου δεν ευνοεί την ηλεκτροχημική απόκριση του dsDNA.

## 14.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

### 14.8.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του δυναμικού ακινητοποίησης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης του dsDNA αξιολογήθηκε και παρουσιάζεται στον πίνακα 14.1. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00). Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 14.1, τα ύψη των κορυφών οξείδωσης της γουανίνης μειώνονται σημαντικά με την εφαρμογή δυναμικού ακινητοποίησης. Αυτό συνεπάγεται ότι το δυναμικό ακινητοποίησης επηρεάζει αρνητικά την προσρόφηση του dsDNA στα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα η ακινητοποίηση του dsDNA στα μελετώμενα ηλεκτρόδια θα πραγματοποιείται χωρίς την εφαρμογή δυναμικού.

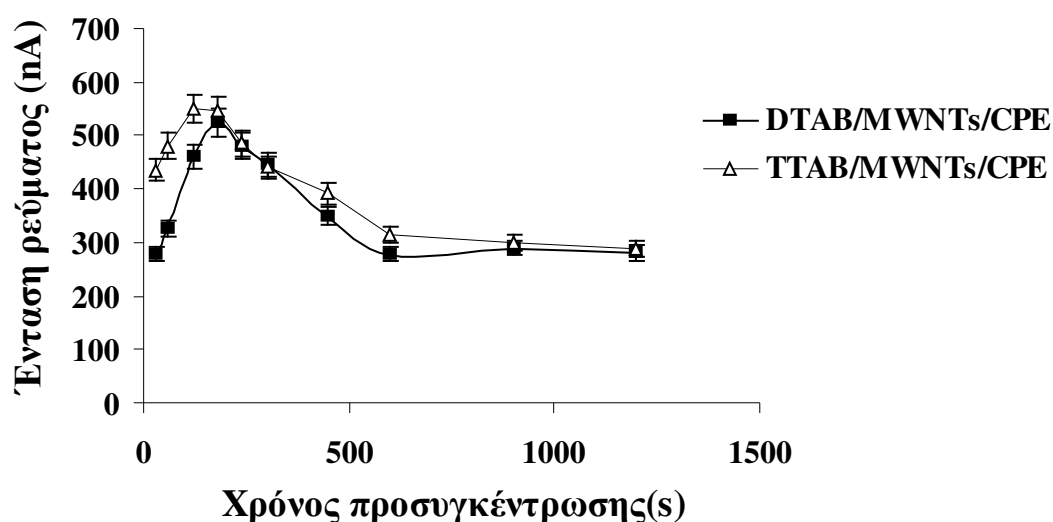
**Πίνακας 14.1:** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , χρόνος προσυγκέντρωσης : 300 s.

Δυναμικό (V)	DTAB/MWNTs/CPE	TTAB/MWNTs/CPE
	$I_p$ (nA)	$I_p$ (nA)
-	445	440
0	168	254
0.1	141	278
0.2	93	230
0.3	108	248
0.4	88	222
0.5	90	252
0.6	80	230

### 14.8.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης

Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ρεύμα οξείδωσης της γουανίνης μελετήθηκε στο διάστημα 0 – 1200 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,00) που περιείχε  $50 \text{ mg L}^{-1}$  dsDNA (Σχήμα 14.7). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 14.6, στην περίπτωση του ηλεκτροδίου DTAB/MWNTs/CPE, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, από 0-180 s, το ύψος της κορυφής του dsDNA αυξάνεται. Σε χρόνους προσυγκέντρωσης μεγαλύτερους των 180 s, το ύψος της κορυφής μειώνεται και σταδιακά σταθεροποιείται. Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου TTAB/MWNTs/CPE, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, από 0-120 s, το ύψος της κορυφής του dsDNA αυξάνεται. Σε χρόνους προσυγκέντρωσης μεγαλύτερους των 120 s το ύψος της κορυφής μειώνεται και σταδιακά σταθεροποιείται.

Επομένως, για τα επόμενα πειράματα επιλέγονται τα 180 s και τα 120 s για τα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE, αντίστοιχα.



**Σχήμα 14.6.** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος της κορυφής οξείδωσης της γουανίνης σε διάλυμα dsDNA ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ηλεκτρολύτης: ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , δυναμικό προσυγκέντρωσης:  $0,0 \text{ V}$ .

## 14.9 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Στις επιλεγόμενες συνθήκες διερευνήθηκε η αναλυτική συμπεριφορά των ηλεκτροδίων DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA με το ηλεκτρόδιο DTAB/MWNTs/CPE σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 14.2.

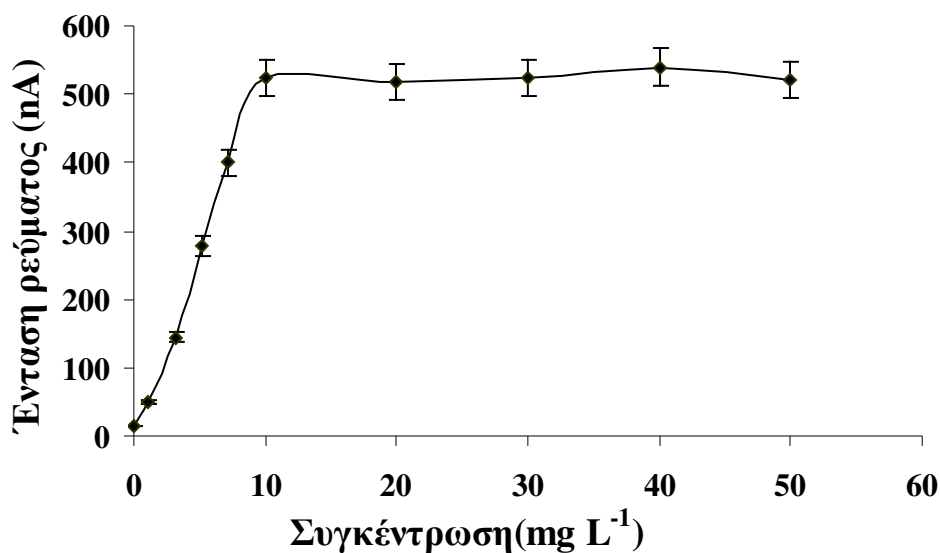
**Πίνακας 14.2.** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού (AdsDPV).

Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού (AdsDPV)	
Παράμετροι μέτρησης	Επιλεγόμενες συνθήκες
$E_{dep}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0 V
$t_{dep}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	120 s
$E_{begin}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{end}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{step}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{pulse}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{pulse}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
Scan rate (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 V s <sup>-1</sup>

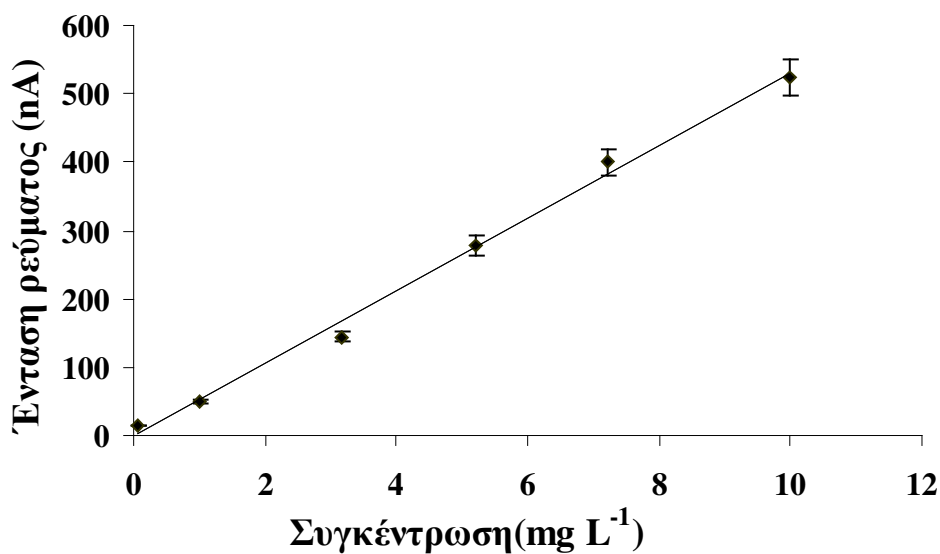
Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA, που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 14.7. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 14.7, η ένταση του ρεύματος οξείδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA, μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης, για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης, κυμάνθηκε από 0,05 έως 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 14.8) εκφράζεται από την εξίσωση:

$I_p = 52,70 (\pm 2,03) \gamma (\text{dsDNA}) + 1,80 (\pm 11,42), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$   
 με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,995.



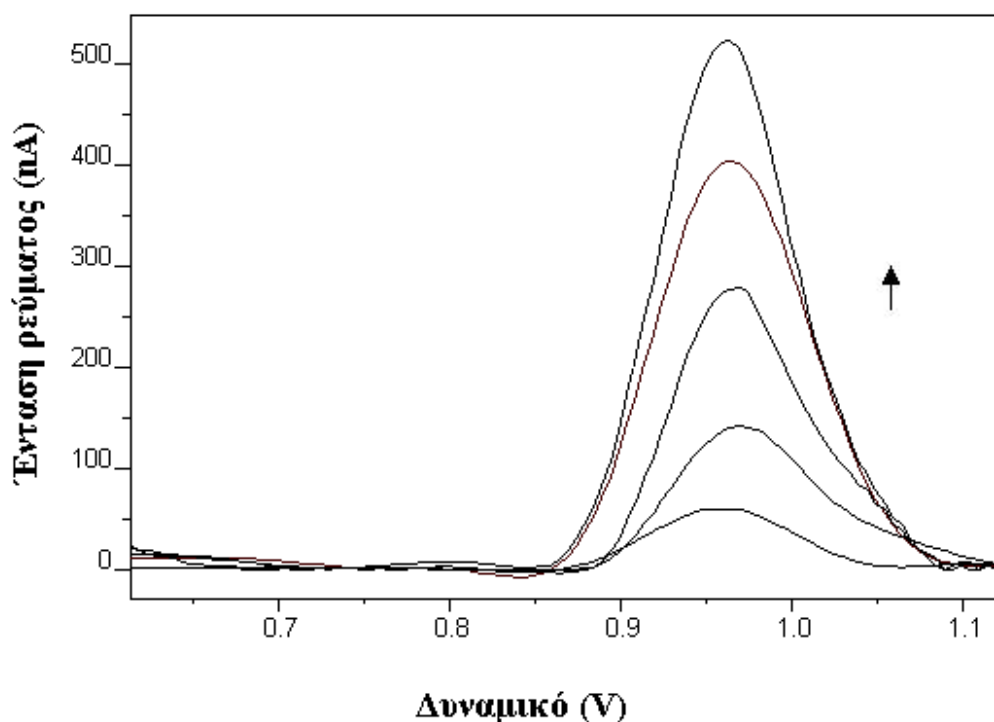
Σχήμα 14.7. Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 14. 2 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



Σχήμα 14.8. Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 14.2 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



Στο Σχήμα 14.9 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα βολταμογραφήματα με αύξηση των συγκεντρώσεων του dsDNA.



**Σχήμα 14.9.** Σειρά βολταμογραφημάτων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης dsDNA. Ο Πίνακας 14.2 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $2,17 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίσθηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 14.3.

**Πίνακας 14.3.** Μετρήσεις επαναληψιμότητας

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,50	5,00	10,00
$s_r(\%)$	7,48	6,08	4,37

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό του dsDNA με το ηλεκτρόδιο TTAB/MWNTs/CPE σχεδιάστηκε με τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 14.4.

**Πίνακας 14.4.** Συνθήκες μέτρησης με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού(AdsDPV).

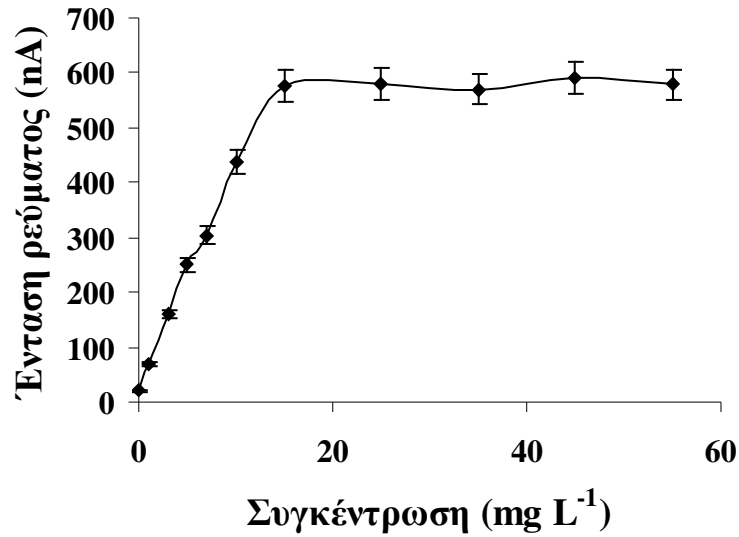
<b>Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού (AdsDPV)</b>	
<b>Παράμετροι μέτρησης</b>	<b>Επιλεγόμενες συνθήκες</b>
$E_{dep}$ (δυναμικό προσυγκέντρωσης)	0 V
$t_{dep}$ (χρόνος προσυγκέντρωσης)	180 s
$E_{begin}$ (δυναμικό εκκίνησης της σάρωσης)	0 V
$E_{end}$ (δυναμικό τερματισμού της σάρωσης)	1,400 V
$E_{step}$ (βήμα δυναμικού)	0,005 V
$E_{pulse}$ (δυναμικό παλμού)	0,025 V
$t_{pulse}$ (χρονική διάρκεια παλμού)	0,070 s
<b>Scan rate</b> (ταχύτητα σάρωσης)	0,050 V s <sup>-1</sup>

Η καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA, που προέκυψε για τις παραπάνω συνθήκες δίνεται στο Σχήμα 14.10. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 14.10, η ένταση του ρεύματος οξειδωσης της γουανίνης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του dsDNA, μέχρι η τελική συγκέντρωση του dsDNA να γίνει ίση με 15,00 mg L<sup>-1</sup>. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σταθεροποίηση της κορυφής, λόγω της πλήρους κάλυψης της ηλεκτροδιακής επιφάνειας.

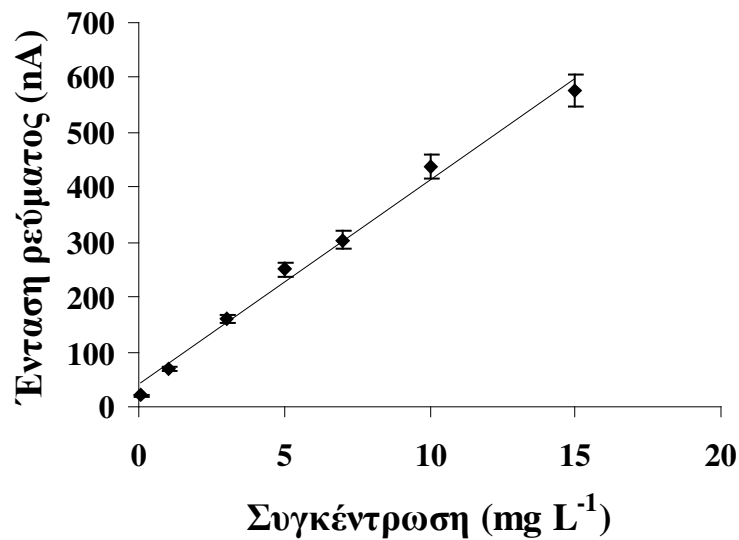
Η γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης για την κορυφή οξειδωσης της γουανίνης κυμάνθηκε από 0,05 έως 15,00 mg L<sup>-1</sup>. Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων (Σχήμα 14.11) εκφράζεται από την εξίσωση:

$$I_p = 46,00 (\pm 0,62) \gamma \text{ (dsDNA)} + 20,83 (\pm 1,84), I_p: \text{nA}, \gamma: \text{mg L}^{-1}$$

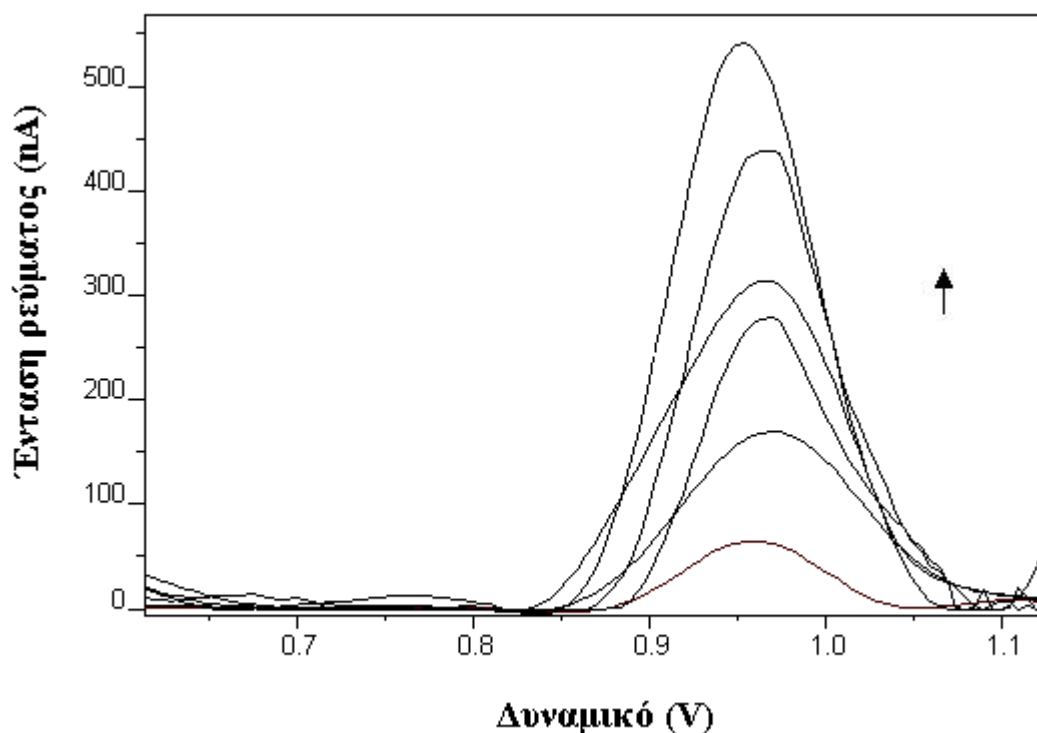
με συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ) ίσο με 0,990.



**Σχήμα 14.10.** Καμπύλη βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 14.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες..



**Σχήμα 14.11.** Γραμμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης του dsDNA για την κορυφή οξείδωσης της γουανίνης. Ο Πίνακας 14.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες.



**Σχήμα 14.12.** Σειρά βολταμογραφημάτων διαφορικού παλμού με αύξηση της συγκέντρωσης dsDNA. Ο Πίνακας 14.4 περιλαμβάνει τις υπόλοιπες συνθήκες..

Το όριο ανίχνευσης ( $c_L$ ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε για το dsDNA υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.2, ως  $0,119 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ το όριο ποσοτικής αποτίμησης ( $c_q$ ) υπολογίστηκε, από τη σχέση 10.3, ως  $0,390 \text{ mg L}^{-1}$ .

Προσδιορίστηκε επίσης η σχετική τυπική απόκλιση ( $s_r$ ) σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ο αριθμός των μετρήσεων ήταν 6 και οι μετρήσεις έγιναν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 14.5.

**Πίνακας 14.5.** Μετρήσεις επαναληψιμότητας ( $n=6$ ).

Συγκέντρωση ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2,50	7,50	15,00
$s_r(\%)$	8,33	7,34	5,21

#### 14.10 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Συνοψίζοντας, διαπιστώθηκε ότι, με τη χρήση ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/CPE), το οποίο αποτέλεσε τη βάση για την περαιτέρω τροποποίηση με δύο διαφορετικές κατιονικές τασενεργές ουσίες· το βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (DTAB) και το βρωμιούχο τετραδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (TTAB) επιτεύχθηκε άμεση ηλεκτροχημική μελέτη του dsDNA. Συγκρίνοντας, την απόδοση των ηλεκτροδίων αυτών (DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE) και του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE, όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, διαπιστώθηκε μεγάλη βελτίωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρουσία των κατιονικών τασιενεργών ουσιών μπορεί να ενισχύσει την προσρόφηση του dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE, λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ αυτών και του dsDNA. Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, υπό τις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από σύντομο χρόνο ακινητοποίησης και με όρια ανίχνευσης ίσα με  $0,650 \text{ mg L}^{-1}$  και  $0,119 \text{ mg L}^{-1}$ , χρησιμοποιώντας την τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας διαφορικού παλμού (AdsDPV), για τα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE, αντίστοιχα

## 15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry J., Οργανική Χημεία, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2000.
2. Σημειώσεις από το μάθημα : Επισκόπηση σε βασικές αρχές μοριακής βιολογίας και βιοπληροφορικής, Καθ.Δ.Κουτσούρης, Δρ.Ι.Μακρής Ε.Μ.Π.
3. Γεωργάτσος Ι.Γ., Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Δ' Έκδοση, Εκδόσεις: Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1993.
4. Thomas R., *Gene*, 135 (1993) 77.
5. Παμπαλάκης Γ., Μελέτη του μηχανισμού φαρμακολογικής ρύθμισης του γονιδίου της καλλικρεΐνης 6 και ανάλυση της μεθυλίωσης DNA για ανάπτυξη διαγνωστικών, Διδακτορική Διατριβή, Πάτρα, 2005.
6. Holliday R., Grigg G.W., *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 285 (1993) 61.
7. Αναστασιάδου Β.-Χ., Συσχέτιση επιγενετικών μηχανισμών και εναλλακτικού ματίσματος σε γονιδιακές θέσεις που έχουν αναλυθεί από το Human Epigenome Project, Διπλωματική Εργασία, Θεσσαλονίκη, 2010.
8. Dahl C., Guldborg P., *Biogerontology*, 4 (2003) 233.
9. Rein T., DePamphilis M.L., Zorbas H., *Nucleic Acids Res.*, 26 (1998) 2255.
10. Oakeley E.J., *Pharmacol. Ther.*, 84 (1999) 389.
11. Havliš J., Trbušek M., *J. Chromatogr. B Biomed. Anal. Technol. Biomed. Life Sc.*, 781 (2002) 373.
12. Herman J., Graff J., Myöhänen S., Nelkin B., Baylin S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 9821.
13. Ioannou A., Alexiadou D., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A., *Electroanalysis*, 21 (2009) 2685.
14. Heath J. C., *Nature*, 158 (1946) 23.
15. Smith D. L., Elving P. J. J., *Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 1412.
16. Smith D. L., Elving P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 2741.
17. Paleček E., Janik B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 98(1962) 527.
18. Cummings T. E., Jensen M. A., Elving P., *J. Bioelectrochem. Bioenerg.*, 4 (1977) 425.
19. Janik B., Elving P. J., *Chem. Rev.*, 689 (1968) 295.
20. Paleček E., Jelen F., Trnkova L. *Gen. Physiol. Biophys.*, 5 (1986) 315.

21. Cummings T. E., Elving P. J. J., *Electroanal. Chem.*, 94 (1978) 123.
22. Cummings T. E., Elving P. J., *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, 102 (1979) 237.
23. Zanoni M.V. B., Rogers E. I., Hardacre C., Compton R. G., *Anal. Chim. Acta*, 659 (2010) 115.
24. Dryhurst G., Pace G. F., *J. Electrochem. Soc.*, 117 (1970) 1259.
25. Dryhurst G., Elving P. J., *J. Electrochem. Soc.*, 115 (1968) 1014.
26. Brett A. M. O., Matysik F. M., *J. Electroanal. Chem.*, 429 (1997) 95.
27. Oliveira-Brett A. M., Piedade J. A. P., Silva L. A., Diculescu V. C., *Anal. Biochem.*, 332 (2004) 321.
28. Stempkowska I., Liga M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M., *Bioelectrochem.*, 70 (2007) 488.
29. Zhou M., Zhai Y. M., Dong S., *J. Anal. Chem.*, 81 (2009) 5603.
30. Kato D., Sekioka N., Ueda A., Kurita R., Hirono S., Suzuki K., Niwa O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 (2008) 6681.
31. Erdem A., Pividori M. I., del Valle M., Alegret S., *J. Electroanal. Chem.*, 567 (2004) 29.
32. Fojt L., Hason S., *J. Electroanal. Chem.*, 586 (2006) 136.
33. Hason S., Fojt L., Sebest P., Fojta M., *Electroanalysis*, (2009) 666.
34. Abbaspour A., Noori A., *Analyst*, 133 (2008) 1664.
35. Ivandini T. A., Honda K., Rao T. N., Fujishima A., Einaga Y. *Talanta*, 71 (2007) 648.
36. Hason S., Pivonkova H., Vetterl V., Fojta M., *Anal. Chem.*, 80 (2008) 2391.
37. Singhal P., Kuhr W. G., *Anal. Chem.*, 69(1997) 3552.
38. Xie H., Yang D. W., Heller A., Gao Z. Q., *Biophys. J.*, 92 (2007) L70.
39. Ferapontova E., Dominguez E., *Electroanalysis*, 15 (2003) 629.
40. Paleček E., *Anal. Chim. Acta*, 174 (1985) 103.
41. Farias P. A. M., Wagener A. D., Castro A. A., *Talanta*, 55 (2001) 281.
42. Farias P. A. M., Wagener A. D. R., Bastos M. B. R., da Silva A. T., Castro A. A., *Talanta*, 61 (2003) 829.
43. Jelen F., Yosypchuk B., Kourilova A., Novotny L., Palecek E., *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4788.
44. Yosypchuk B., Heyrovsky M., Palecek E., Novotny L., *Electroanalysis*, 14 (2002) 1488.

45. Fadrna R., Yosypchuk B., Fojta M., Navratil T., Novotny L., *Anal. Lett.*, 37 (2004) 399.
46. Aladag N., Trnkova L., Kourilova A., Ozsoz M., Jelen F., *Electroanalysis*, 22 (2010) 1675.
47. Trnkova L., Zerzankova L., Dycka F., Mikelova R., Jelen F., *Sensors*, 8 (2008) 429.
48. Wang J., Kawde A. B., *Analyst*, 127 (2002) 383.
49. Brabec V., Glezers V. Gen., *Physiol. Biophys.*, 2 (1983) 193.
50. Paleček E., *J. Electroanal. Chem.*, 22 (1969) 347.
51. Paleček E. ,In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Davidson J. N. Cohn W. E. Eds, Academic Press: New York 1969, Vol. 9, p 31.
52. Brabec V., *Biophys. Chem.*, 11(1980) 1.
53. Trnkova L., Kizek R., Dracka O., *Bioelectrochem.* 55 (2002) 131.
54. Trnkova L., *Talanta*, 56 (2002) 887.
55. Eskiocak U., Ozkan-Ariksoysal D., Ozsoz M., Oktem H. A., *Anal. Chem.*, 79 (2007) 8807.
56. Wang J., Rivas G., Ozsoz M., Grant D. H., Cai X., Parrado C., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1457.
57. Honeychurch K. C., O'Donovan M. R., Hart J. P., *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 2057.
58. Oliveira S. C. B., Oliveira-Brett A. M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 1633.
59. de la Fuente E., Villagra G., Bollo S., *Electroanalysis*, 19 (2007) 1518.
60. Paleček E., *Nature*, 188 (1960) 656.
61. Brabec V., Dryhurst G. J., *Electroanal. Chem.*, 91 (1978) 219.
62. Brabec V., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8 (1981) 437.
63. Wang J., Cai X., Wang J. Y., Jonsson C., Palecek E., *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4065.
64. Cai X., Rivas G., Farias P. A. M., Shirashi H., Wang J., Fojta M., Palecek E., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, (1996) 401.
65. Wang J., Lin Y. H., *Tr.AC*, 27 (2008) 619.
66. Ajayan P. M., *Chem. Rev.*, 99 (1999) 1787.
67. Wang J., Kawde A.-N., Musameh M., *Analyst*, 128 (2003) 912.
68. Pedano M. L., Rivas G. A., *Electrochem. Commun.*, 6 (2004) 10.



69. Wang J. X., Li M. X., Shi Z. J., Li N. Q., Gu Z. N., *Electroanalysis*, 16 (2004) 140.
70. Erdem A., Papakonstantinou P., Murphy H., McMullan M., Karadeniz H., Sharma S., *Electroanalysis*, 22 (2010) 611.
71. Karadeniz H., Erdem A., Caliskan A., *Electroanalysis*, 20 (2008) 1932.
72. Kerman K., Morita Y., Takamura Y., Ozsoz M., Tamiya E., *Electroanalysis*, 16 (2004) 1667.
73. Zhang X., Jiao K., Liu S., Hu Y., *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6006.
74. Lim C. X., Hoh H. Y., Ang P. K., Loh K. P., *Anal. Chem.*, 82 (2010) 7387.
75. Yin H. S., Zhou Y. L., Ma Q. A., Ai S. Y., Chen Q. P., Zhu L. S., *Talanta*, 82 (2010) 1193.
76. Du M., Yang T., Jiao K., *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) 9253.
77. Dubuisson E., Yang Z. Y., Loh K. P., *Anal. Chem.*, 83 (2011) 2452.
78. Park S., Ruoff R. S., *Nat. Nanotechnol.*, 4 (2009) 217.
79. Geim A. K., *Science*, 324 (2009) 1530.
80. Paleček E., *Naturwiss.*, 45 (1958) 186.
81. Jelen F., Palecek E., *Biophys. Chem.*, 24 (1986) 285.
82. Jelen F., Tomschik M., Palecek E., *J. Electroanal. Chem.*, 423 (1997) 141.
83. Vojtiskova M., Lukasova E., Jelen F., Palecek E., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, (1981) 487.
84. Paleček E., Dosekocil J., *Anal. Biochem.*, 60 (1974) 518.
85. Paleček E., Postbieglova I., *J. Electroanal. Chem.*, 214 (1986) 359.
86. Bartosik M., Palecek E., *Electroanalysis*, 23 (2011) 1311.
87. Paleček E., Jelen F., Teijeiro C., Fucik V., Jovin T. M., *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 175.
88. Mikkelsen O., Schroder K. H., *Electroanalysis*, 15 (2003) 679.
89. Yosypchuk B., Berek J., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 39 (2009) 189.
90. Yosypchuk B., Fojta M., Berek J., *Electroanalysis*, 22 (2010) 1967.
91. Hason S., Simonaho S. P., Silvennoinen R., Vetterl V., *J. Electroanal. Chem.*, 568 (2004) 65.
92. Hason S., Vetterl V., *Talanta*, 69 (2006) 572.
93. Fadrná R., Cahova-Kucharikova K., Havran L., Yosypchuk B., Fojta M., *Electroanalysis*, 17 (2005) 452.

94. Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovsky M., Palecek E., *Electroanalysis*, 18 (2006) 186.
95. Kucharikova K., Novotny L., Yosypchuk B., Fojta M., *Electroanalysis*, 16 (2004) 410.
96. Fadrná R., *Chemicke Listy*, 97 (2003) 964.
97. Brabec V., Palecek E., *Biopolymers*, 11 (1972) 2577.
98. Nielsen P. E., Egholm E., *Curr. Iss. Mol. Biol.*, 1 (1999) 89.
99. Fojta M., Vetterl V., Tomschik M., Jelen F., Nielsen P., Wang J., Palecek E., *Biophys. J.*, 721 (1997) 2285.
100. Tomschik M., Jelen F., Havran L., Trnkova L., Nielsen P. E., Palecek E., *J. Electroanal. Chem.*, 476 (1999) 71.
101. Paleček, E. In *Encyclopedia of Analytical Science*; Townshend, A., Ed; Academic Press: London, 1995; Vol. 6; p 3600.
102. Girousi S., Serpi C., Karastogianni S., Ioannou A., *Curr.Org. Chem.*,14 (2010) 2300.
103. Peng H., Meiju J., Cunwang G., Jiayao S., Song L., Nongyue H., *Nucleic Acid Res.*, 31 (2003) 92.
104. Kato D., Sekioka N., Ueda A., Kurita R., Hirono S., Suzuki K., Niwa O., *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 3716.
105. Ioannou A., Alexiadou D., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A., *Anal. Chim. Acta*, 657 (2009) 163.
106. Alexiadou D., Ioannou A., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A., *Anal Bioanal Chem.*, 392 (2008) 533.
107. Wang P., Mai Z., Dai Z., Zou X., *Chem.Comm.*, 46 (2010) 7781.
108. Σωτηροπούλου Σ., Ακτινοποίηση ακετυλοχολινεστεράσης σε νανοπορώδη υλικά για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα οραγοανοφοσφορικών παρασιτοκτόνων, Διδακτορική Διατριβή, Ηράκλειο, 2005.
109. De la Guardia M., *Microchim. Acta*, 120 (1995) 73.
110. Gopel W., Hesse J., Zemel J.N. (Eds.), *Sensor, A comprehensive survey*, Volume 3, VCH Publishers Inc.,New York 1992.
111. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., *Principles of instrumental analysis*, Saunders College Publishing 1988.
112. Eggins B., in *Biosensors: An Introduction*, Wiley & Sons, 1996.
113. Davis J., Vaugman D.H., Cardosi M.F., *Enz. Microb. Tech.*, 17 (1995) 1030.

114. Heidz, F., Van Mau, N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1597 (2002) 1.
115. Diamond D.(Ed.) in *Chemical and Biological Sensors*, Willey and Sons, Inc.1998.
116. Scouten W.H., Luong, J.H.T., Brown R.S., *TiBiTech*, 131(1995) 178.
117. Cosnier S., *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1999) 443.
118. Poole C.P., Owenw, F.J., *Wiley and Sons*, 2003.
119. Losche M., *Curr. Op.Sol. St. Mat. Sci.*, 2 (1997) 546.
120. Erdem A., Ozsoz M., *Anal. Chim. Acta*, 437 (2001) 107.
121. Moser I., Schalkhammer T., Pittner F., Urban, G., *Biosens. Bioelectron.*, 12 (1997) 729.
122. Χατζηγιάννου Θ.Π., Κουπάρη Μ.Α., *Ενόργανη Ανάλυση, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 1997.*
123. Γηρούση Σ., *Μελέτη και ανάπτυξη μεθόδων βολταμμετρικού προσδιορισμού βιοστοιχείων (χαλκός-μολυβδαίνιο), Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, 1996.*
124. Sawyer D.T.W, Roberts J.L., “*Experimental electrochemistry for chemists*”, John Wiley & Sons, Inc, Toronto, 1979.
125. Nicholson R.S., Shain, I., *Anal. Chem.*, 37 (1965) 178.
126. Wang J., *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, VCH Publishers Inc., New York, 1988.
127. Vanýsek P., in: *Chemical Analysis: Modern Techniques in Electroanalysis*, Vol. 139, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996.
128. Αλούπης Γ., *Κατασκευή ηλεκτροδίων με ανάπτυξη υμενίων νανοσωλήνων άνθρακα σε αγώγιμο υπόστρωμα –χρήση σε φωτοβολταϊκά κελιά, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα, 2012.*
129. Αργυριάδης Β., *Νανοσωλήνες: Είδη, Τρόποι παρασκευής, Ιδιότητες , Εφαρμογές, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα, 2012.*
130. Κορομηλάς Ν., *Τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα με πολυμερή που παρουσιάζουν βιοστατικές ιδιότητες, Μεταπτυχιακή Εργασία, Πάτρα, 2012.*
131. Pedano M.L., Rivas, G.A., *Electrochem. Comm.*, 6 (2004) 10.
132. Qi H., Li X., Chen P., Zhang C, *Talanta* 72 (2007) 1030.
133. Jiang C., Yang T., Jiao, K. Gao H., *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 2917.
134. Yang T., Zhou N., Zhang Y., Zhang, W., Jiao K., Li G., *Biosens. Bioelectr.*, 24 (2009) 2165.

135. Young Ly S., Yoo H.-S., Hoon Choa S., *J. Microb. Methods*, 87 (2011) 44.
136. Du M., Yang T., Jiao K., *J. Solid State Electrochem.*, 14 (2010) 2261.
137. Balan I., David I. G., David V., Stoica A.I, Mihailciuc C., Stamatina I, Ciucu A.A., *J. Electroanal. Chem.*, 654 (2011) 8.
138. Zhou N., Yang T., Jiang C., Du M., Jiao K., *Talanta*, 77 (2009) 1021.
139. Young Ly S., Sun Chob N., *J. Clinic. Virol.*, 44 (2009) 43.
140. Cai H., Cao X., Jiang Y., He P., Fang Y., *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 287.
141. Chang Z., Fan H., Zhao K., Chen M., He P., Fang, Y., *Electroanalysis*, 20 (2008) 131.
142. Gong M., Han T., Cai C., Lu T., Du J., *J. Electroanal. Chem.* 623 (2008) 8.
143. Liu H., Wang G., Chen D., Zhang W., Li C., Fang B., *Sensors and Actuators B*, 128 (2008) 414.
144. Zhang Y., Zhang K., Ma H., *Anal. Biochem.*, 387 (2009) 13.
145. Yang T., Zhang W., Du M., Jiao K., *Talanta*, 75 (2008) 987.
146. Tang C., Yogeswaran U., Chen S.-M., *Anal. Chim. Acta*, 636 (2009) 19.
147. Zeng X., Li X., Liu X., Liu Y., Luo S., Kong B., Yang S., Wei W., *Biosens. Bioelect.*, 25 (2009) 896.
148. Ran X.-Q., Yuan R., Chai Y.-Q., Hong C.-L., Qian X.-Q., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79 (2010) 421.
149. Zhang Y., Wang J. , Xu M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (2010) 179.
150. Qiu Y., Fan H., Liu X., Ai S., Tang T., Han R., *Microchim. Acta*, 171 (2010) 363.
151. Chen Q., Ai S., Fan H., Cai J., Ma Q., Zhu X., Yin H., *J. Solid State Electrochem.*, 14 (2010) 1681.
152. Wang X., Jiao K., *Analytica Chimica Acta*, 664 (2010) 34.
153. Wang J., Li S., Zhang Y., *Electrochim.Acta*, 55 (2010) 4436.
154. Gutiérrez A., Gutiérrez S., García G., Galicia L., Rivas G. A., *Electroanalysis*, 23 (2011) 1221.
155. Weber J. E., Pillai S., Ram, M.K., Kumar A., Singh S. R., *Mater. Scienc. Engin. C*, 31 (2011) 821.
156. Deng K. Q., Li C. X., Ling Y. L., Xu G. R., Li X. F., *Chin. Chem. Letters*, 22 (2011) 981.

157. Zeng G., Li Z., Tang L., Wu M., Lei X., Liu Y., Liu B., Pang Y., Zhang Y., *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 4775.
158. Bian C.-L., Zeng Q.-X., Yang L.-J., Xiong H.-Y., Zhang X.-H., Wang S.-F., *Sensors and Actuators B*, 156 (2011) 615.
159. Yang K., Zhang C.-Y., *Biosens. Bioelectr.*, 28 (2011) 257.
160. Girousi S., Karastogianni S., Serpi C., *Sens. Electroanal.*, 6 (2011) 65.
161. Ye Y., Ju, H., *Biosens. Bioelectr.*, 21 (2005) 735.
162. Ovádeková R., Jantová S., Letašiová S., Štěpánek I., Labuda J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 2055.
163. Ziyatdinova G., Galandova J., Labuda J., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3 (2008) 223.
164. Karadeniz H., Erdem A., Caliskan A., *Electroanalysis*, 20 (2008) 1932.
165. Labuda J., Ovádeková R., Galandová J., *Microchim. Acta*, 164 (2009) 371.
166. Galandova J., Trnkova L., Mikelova R., Labuda J., *Electroanalysis*, 21 (2009) 563.
167. Galandova J., Ovádeková R., Ferancová A., Labuda J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 855.
168. Wang Z., Xiao S., Chen Y., *J. Electroanal. Chem.*, 589 (2006) 237.
169. Tang H., Chen J., Cui J., Nie L., Kuang Y., Yao S., *J. Electroanal. Chem.*, 587 (2006) 269.
170. Caliskan A., Erdem A., Karadeniz H., *Electroanalysis*, 21 (2009) 2116.
171. Karadeniz H., Caliskan A., Uguz C., *Anal. Scienc.*, 26 (2010) 1065.
172. Goyal R. N., Bishnoi S., *Biosens. Bioelect.*, 26 (2010) 463.
173. Goyal R.N., Chatterjee S., Rana A.R.S., *Electroanalysis*, 23 (2010) 1383.
174. Yapasan E., Caliskan A., Karadeniz H., Erdem A., *Mater. Scienc. Engin. B*, 169 (2010) 169.
175. Canavar E., Kuralay F., Erdem A., *Electroanalysis*, 23 (2011) 2343.
176. Δούκα Α., Σύνθεση και μελέτη ιοντικών υγρών ως διαλύτες σε οργανικές αντιδράσεις και έλεγχος της βιοαποικοδομησιμότητάς τους, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα, 2012.
177. Μαρούλης Α. Ι, Χατζηαντωνίου Κ., Τσιτσιριδάκη Α., Εναλλακτικοί διαλύτες, Ιοντικοί διαλύτες, Α.Π.Θ., Τμήμα Χημείας, Θεσσαλονίκη.
178. Νταής Σ., Μελέτη του εγκλωβισμού ιοντικών υγρών σε ζεόλιθους: Φυσικοχημικός και ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πάτρα, 2011.

179. Renner R., *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 410A.
180. Yang Q., Dionysiou D. D., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 165 (2004) 229.
181. Bhatt A. I., Bond A. M., MacFarlane D. R., Zhang J., Scott J. L., Strauss C. R., Iotov P. I., Kalcheva S. V., *Green Chem.*, 8 (2006) 161.
182. Hapiot P., Lagrost C., *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2238.
183. Jacquemin J., Nancarrow P., Rooney D.W., Gomes M.F.C., Husson P., Majer V., Padua A.A.H., Hardacre C., *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 2133.
184. Carmichael A. J., Seddon K. R., *J. Phys. Org. Chem.*, 13 (2000) 591.
185. Aki S. N. V. K., Brennecke J. F., Samanta A., *Chem. Commun.*, (2001) 413.
186. L. Cammarata, S. G. Kazarian, P. A. Salter, T. Welton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 23 (2001) 5192.
187. Martino W., Fernandez de la Mora F., Yoshida Y., Saito G., Wilkes J., *Green Chem.*, 8 (2006) 390.
188. Zhan T., Xi M., Wang Y., Sun W., Hou W., *J. Coll. Int. Sc.*, 346 (2010) 188.
189. Girousi S., Stanić Z., *Curr. Anal. Chem.*, 7 (2011) 80.
190. Zhu Z., Sun Z., Wang Y., Zeng Y., Sun W., Huang X., *J. Electr. Chem.*, 650 (2010) 31.
191. Malekii N., Safavi A., Tajabadi F., *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3820.
192. Zhang, Y., Zheng J.B., *Electrochim. Acta*, 52 (2007) 7210.
193. Safavi A., Maleki N., Moradlou O., Sorouri M., *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 420.
194. Zhang Y.-M., Duan C.-Q., Gao Z.-N., *J. Serb. Chem. Soc.*, 78 (2013) 281.
195. Ji H., Zhu L., Liang D., Liu Y., Cai L., Zhang S., Liu S., *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 7429.
196. Zhang Y., Zheng J., *Talanta*, 77 (2008) 325.
197. Wang S. F., Xiong H.Y., Zeng Q.X., *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 807.
198. Sun W., Li Y., Yang M., Li J., Jiao K., *Sensors and Actuators B*, 133 (2008) 387.
199. Afsharmanesh E., Karimi-Maleh H., Pahlavan A. Vahedi J. J., *Molec. Liqu.*, 181 (2013) 8.
200. Bijad M., Karimi-Maleh H., Khalilzadeh M. A., *Food Anal. Methods* :DOI 10.1007/s12161-013-9585-9.
201. Zhang Y., Zheng J. B., *Electrochim. Acta*, 52 (2007) 7210.
202. Sun W., Zhai Z, Wang D., Liu S., Jiao K., *Bioelectrochem.*, 74 (2009) 295.

203. Zhu Z., Qu L., Guo Y., Zeng Y., Sun W., Huang X., *Sensors and Actuators B*, 151 (2010) 146.
204. Sun W., Li X., Wang Y., Li X., Zhao C., Jiao K., *Bioelectrochem.*, 75 (2009) 170.
205. Mazloum-Ardakani M., Khoshroo A., *Electrochim. Acta*, 103 (2013) 77.
206. Safavi A., Maleki N., Momeni S., Tajabadi F., *Anal. Chim. Acta*, 625 (2008) 8.
207. Babaeia A., Taheri A. R., Farahani I. K., *Sensors and Actuators B*, 183 (2013) 183, 265.
208. Hu S., Wang Y., Wang X., Xu L., Xiang J., Sun W., *Sensors and Actuators B*, 168 (2012) 27.
209. Sun W., Wang X., Zhu H., Sun X., Shi F., Li G., Sun Z., *Sensors and Actuators B*, 178 (2013) 443.
210. Sun W., Li X., Wang Y., Zhao, R., Jiao K., *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 4141.
211. Sun W., Wang Y., Zhang Y., Ju X., Li G., Sun Z., *Anal. Chim. Acta*, 751 (2012) 59.
212. Safavi A., Maleki N., Farjami F., Farjami, E., *J. Electroanal. Chem.*, 626 (2009) 75.
213. Malekia N., Safavi A., Farjami E., Tajabadi F., *Anal. Chim. Acta*, 611 (2008) 151.
214. Sun W., L Y.Z., Duan Y.Y., Jiao K., *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 994.
215. Sun W., Li Y.Z., Yang M.X., Liu S.F., Jiao K., *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 298.
216. Sun W., Duan Y., Li Y., Gao H., Jiao K., *Talanta* 78 (2009) 695.
217. Sun W., Li Y., Duan Y., Jiao K., *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 4105.
218. Sun W., Xi M., Zhang L., Zhan T., Gao H., Jiao K. J., *Electroanal. Chem.*, 56 (2010) 222.
219. Zhu Z., Sun Z., Wang Y., Zeng Y., Sun W., Huang X. J., *Electr. Chem.*, 650 (2010) 31.
220. Guo Y., Hu S., Qi X., Xiang J., Sun W., *Acta Chim. Slov.*, 59 (2012) 129.
221. Gao H., Xi M., Qi X., Lu M., Zhan T., Sun W. J., *Electroanal. Chem.*, 664 (2012) 88.
222. Zhang X., Jiao K., Wang X., *Electroanalysis*, 20 (2008) 1361.
223. Zhang W., Zheng X., Jiao K., *Sensors and Actuators B*, 162 (2012) 396.

224. Ξιάρχος Ι., Συμβολή στον χαρακτηρισμό των μεμβρανών: Εκτίμηση της υδροφοβικότητας με χρησιμοποίηση διαλυμάτων επιφανειακά ενεργών ουσιών., Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2006.
225. Κόνιαρη Α., Μελέτη προσρόφησης και σχηματισμού υμενίων, τασιενεργών ουσιών ή / και μιγμάτων τους, στη διεπιφάνεια υδραργύρου / ηλεκτρολυτικού διαλύματος., Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, 2012.
226. Atta F. N., Galal A., Ahmed R.A., *J. Electrochem. Soc.*, 4 (2011) 158.
227. Atta F. N., Galal A., Abu-Attia F.M., Azab S. M., *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 2510.
228. Abirama Sundari P.L., Manisankar P., *J. Appl Electrochem.*, 41 (2011) 29.
229. Corona-Avendaño S., Alarcón-Ángeles G., Ramírez-Silva M.T., Romero-Romo M., Cuán A., Palomar-Pardavéa M., *J. Electrochem. Soc.*, 12 (2009) 156.
230. Duan X., Ma F., Yuan Z., Chang L., Jin X., *J. Electroanal. Chem.*, 677 (2012) 90.
231. Goyal R. N., Bishnoi S., *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 77 (2010) 200.
232. Karthikeyan N., Giridhar V.V., Vasudevan D., *J. Solid State Electrochem.*, 14 (2010) 877.
233. Luo L.-Q., Li Q.-X., Ding Y.-P., Zhang Y., Shen X., *J. Solid State Electrochem.*, 14 (2010) 1311.
234. Rattanarat P., Dungchai W., Siangproh W., Chailapakul O., Henry Ch. S., *An. Chim. Act.*, 744 (2012) 1.
235. Salazar P., Martvn M., O'Neill R.D., Roche R., González-Mora J.L., *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 92 (2012) 180.
236. Sun Z., Ma L., Hu X., *J. Solid State Electrochem.*, 15 (2011) 493.
237. Zou W., Wang L., Lu B., Li H., Chen H., *J. Solid State Electrochem.*, 39 (2009) 2015.
238. Hayakawa K., Kwak J.C.T, *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 3866.
239. Hayakawa K., Kwak J.C.T., *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 506.
240. Hayakawa K., Santerre J.P., Kwak J.C.T., *Biophys.Chem.*, 17 (1983) 175.
241. Hayakawa K., Santerre J.P., Kwak J.C.T., *Macromolecules*, 16 (1983) 1642.
242. Mel'nikov S.M., Sergeyev V.G., Yoshikawa K.. *J. Am.Chem. Soc.*, 117 (1995) 2401.
243. Mel'nikov S.M., Sergeyev V.G., Yoshikawa K.. *J. Am.Chem. Soc.*, 117 (1995) 9951.



244. Spink C.H., Chaires J.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 10920.
245. Gorelov A.V., Kudryashov E.D., Jacquier J.C., McLoughlin D.M., Dawson K.A., *Physica A*, 249 (1998) 216.
246. McLoughlin D.M., O'Brien J., McManus J.J., Gorelov A.V., Dawson K.A., *Bioseparation*, 9 (2000) 307.
247. McLoughlin D.M., Gorelov A.V., Dawson K.A., *Progr. Colloid. Polym. Sci.*, 118 (2001) 226.
248. Morrissey S., Kudryashov E., Dawson K., Buckin V., *Biophys. J.*, 76 (1999) A321.
249. Buckin V., Morrissey S., Craig E., *Biophys. J.*, 78 (2000) 269.
250. Craig B.M., Dunne C., Kudryashov E.D., Morrissey S., Buckin V., *Biophys. J.*, 80 (2001) 2057.
251. Smith P., Lynden-Bell R.M., Smith W., *Phys. Chem.*, 2 (2000) 1305.
252. Dias R., Mel'nikov S., Lindman B., Miguel M.G., *Langmuir*, 16 (2000) 9577.
253. Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 7331.
254. Manning G.S., *Rev Q. Biophys.*, 11 (1978) 179.
255. Diamant H., Andelman D., *Phys. Rev. E*, 61 (2000) 6740.
256. Liu Q., Li J., Tao W., Zhu Y., Yao Sh., *Bioelectrochem.*, 70 (2007) 301.
257. Vagin M.Y., Karyakin A. A., Hianik T., *Bioelectrochem.*, 56 (2002) 91.
258. Brabec V., Koudelka J., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7 (1980) 793.
259. Rivas G.A., Rubianes M. D., Rodríguez M. C., Ferreyra N. F., Luque G. L., Pedano M. L., Miscoria S.A., Parrado C., *Talanta*, 74 (2007) 291.
260. Taft B.J., Lazareck A.D., Withey G.D., Yin A., Xu J.M., Kelley S.O., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 12750.
261. Yi H., *Anal. Bioanal.Chem.*, 377 (2003) 770.
262. Ajayan P.M., *Chem. Rev.*, 99 (1999) 1787.
263. Paleček E., Bartošík M., *Chem. Rev.*, 112 (2012) 3427.
264. Fojta M., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 6 (2004) 715.
265. Fojta M., Havran L., Horáková P., Pivoňková H., *Sens. Electroanalysis*, 6 (2011) 64.



## Περίληψη

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ

Τα νουκλεϊκά οξέα (ΝΑς), είναι τα μόρια –φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Στα μόρια των DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση του. Λόγω, λοιπόν, του τόσο σημαντικού τους ρόλου έχουν μελετηθεί εκτενώς με ένα πλήθος διαφορετικών τεχνικών.

Από τη στιγμή που ο Paleček ανακάλυψε την ηλεκτροδραστικότητα των νουκλεϊκών οξέων (ΝΑς), ξεκίνησε μια εκτενής έρευνα της ηλεκτροχημείας των φυσικών και χημικώς τροποποιημένων νουκλεϊκών οξέων (ΝΑς). Η έρευνα αυτή οδήγησε σε μια σειρά από βολταμετρικές προσεγγίσεις, τόσο για το γρήγορο και ανέξοδο ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, όσο και για την ανίχνευση των αλλαγών στη δομή του. Έτσι οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες συγκέντρωσαν τεράστια προσοχή, καθώς συνδυάζουν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροχημικών μεθόδων, με την ικανότητα αναγνώρισης των αλληλουχιών του DNA.

Για τη βελτίωση της ευαισθησίας των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων DNA έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα νανοϊλικά, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs).

Από την ανακάλυψή τους το 1991 από τον Iijima, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) αποτέλεσαν αντικείμενο έντονης έρευνας και προσέλκυσαν μεγάλη προσοχή ως αναλυτικά εργαλεία, για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, λόγω των ιδιαίτερων χημικών, ηλεκτρικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα και των δύο τύπων νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs), όπως η μεγάλη επιφάνεια, η καλή αγωγιμότητα και η εξαιρετική βιοσυμβατότητα, γίνεται φανερό ότι προσφέρουν ένα περιβάλλον, το οποίο είναι κατάλληλο για την ακινητοποίηση βιολογικών συστατικών, ενώ επιπλέον ο υψηλός λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο συνεπάγεται και την αυξημένη συσσώρευση των βιομορίων. Γι' αυτό, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή αισθητήρων και βιοαισθητήρων.

Αρχικά, κατασκευάστηκαν τρία ηλεκτρόδια πάστας νανοσωλήνων άνθρακα (MWNTPEs), χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς τύπους νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs), αντίστοιχα, οι οποίοι διέφεραν ως προς τις

διαστάσεις τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι νανοσωλήνες άνθρακα σε συνδυασμό με την προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (AdSTV) είναι κατάλληλοι για τον προσδιορισμό του dsDNA. Διαπιστώθηκε αύξηση του σήματος οξειδωσης της γουανίνης σε σύγκριση με εκείνο που λαμβάνεται με τα συμβατικά ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPEs). Μεταξύ των τριών ηλεκτροδίων MWNTPEs, το ηλεκτρόδιο MWNTPE<sub>3</sub> παρουσίασε την καλύτερη ηλεκτροχημική συμπεριφορά, λόγω της καταλληλότερης δομής και μεγέθους των πόρων. Με βάση το σήμα οξειδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από σύντομους χρόνους ακινητοποίησης και με τα τρία ηλεκτρόδια MWNTPEs (MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, MWNTPE<sub>3</sub>) με όρια ανίχνευσης ίσα με 2,64 mg L<sup>-1</sup>, 2,02 mg L<sup>-1</sup> και 1,46 mg L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

Καθώς πολλές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί στον τομέα της ηλεκτροανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων (NAς) με σκοπό την αντικατάσταση των υγρών ηλεκτροδίων υδραργύρου (ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) και σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME)) με ηλεκτρόδια, τα οποία διατηρούν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υδραργύρου, αλλά ταυτόχρονα διαθέτουν και τα πλεονεκτήματα των στερεών ηλεκτροδίων (μη τοξικό υλικό, μηχανική αντοχή, εφαρμοσιμότητα σε απλές και φθηνές συσκευές αισθητήρων, κ.λπ.), το επόμενο βήμα περιελάμβανε την κατασκευή ενός ηλεκτροδίου με εναπόθεση υμενίου υδραργύρου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MF / MWNTs / GCE).

Το MF / MWNTs / GCE χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μονόκλωνου (ss) και δίκλωνου (ds) DNA, καθώς και για την ανάλυση ενζυμικά μεθυλιωμένου Jurkat DNA σε διαφορετικούς βαθμούς. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα και με βάση τη μέγιστη μείωση της καθοδικής κορυφής της κυτοσίνης και της αδενίνης (CA κορυφή), η οποία δείχνει υψηλή ευαισθησία στη δομή του DNA, εφόσον οι αναγόμενες περιοχές στην αδενίνη και την κυτοσίνη αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και κρύβονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας του μοντέλου Watson-Crick, το ηλεκτρόδιο MF / MWNTs / GCE μπορεί να ανιχνεύσει χαμηλά επίπεδα των μορίων του DNA, έπειτα από την *ex situ* προσρόφηση του, με τη βοήθεια της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας (AdS) τετραγωνικού παλμού (SWV). Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ηλεκτρόδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη

διάκριση του δίκλωνου (ds) από το μονόκλωνο (ss) DNA και για την ανίχνευση μεταβολών που προκύπτουν από την παρουσία μεθυλίωσης σε ένα μόριο DNA.

Τα ιοντικά υγρά (ionic liquids, ILs), των οποίων η δομή συνήθως περιλαμβάνει ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα μικρό ανόργανο ανιόν, παρουσιάζουν πολλά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως το μεγάλο ηλεκτροχημικό παράθυρο, την ικανότητα να προάγουν την μεταφορά ηλεκτρονίων, την υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα, τη σχετικά υψηλή αγωγιμότητα και την πολύ καλή βιοσυμβατότητα, με αποτέλεσμα να βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην ηλεκτροχημεία και στους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες.

Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, τα ILs μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως ηλεκτρολύτες είτε ως υλικό μορφοποίησης ηλεκτροδίων όπου η ανάμιξή τους με σκόνη άνθρακα (συνήθως γραφίτη) οδηγεί σε ένα νέο είδος χημικώς τροποποιημένων ηλεκτροδίων πάστας άνθρακα, που ονομάζονται ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (carbon paste ionic liquid, CILE) και τα οποία παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση από τα συμβατικά ηλεκτρόδια εργασίας.

Τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα ιοντικού υγρού (CILEs) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση διαφόρων ηλεκτροενεργών και μη ενώσεων είτε αυτούσια είτε ως βάση για περαιτέρω μορφοποίηση. Πρόσφατα, τα ηλεκτρόδια πάστας ιοντικού υγρού CILEs, άρχισαν να χρησιμοποιούνται με επιτυχία στο πεδίο της ηλεκτροχημείας των νουκλεϊκών οξέων (NAs).

Έτσι, στη συνέχεια της εργασίας, κατασκευάστηκε ένα ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα με τη χρήση του 1-βουτυλο-4-μεθυλοπυριδινικού εξαφθοροφωσφορικού ιοντικού υγρού, ως συνδετικού μέσου (IL-CNTPE). Με τη χρήση του ηλεκτροδίου αυτού επιτεύχθηκε άμεση ηλεκτροχημική μελέτη του dsDNA. Συγκεκριμένα, έπειτα από ακινητοποίηση του dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, εμφανίστηκαν δυο πολύ καλά σχηματισμένες κορυφές, οι οποίες αποδόθηκαν στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης και της αδενίνης του μορίου του dsDNA. Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από σύντομο χρόνο ακινητοποίησης και με όριο ανίχνευσης ίσο με  $0,249 \text{ mg L}^{-1}$ , χρησιμοποιώντας την τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (AdSDPV).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και των διαφόρων επιφανειοδραστικών χημικών οντοτήτων έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Πρόσφατα ένας μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων μελετών, σχετικά με το θέμα της σύνδεσης του DNA με τις επιφανειοδραστικές ουσίες, αναφέρουν ότι το DNA μπορεί να σχηματίσει σταθερά σύμπλοκα με τις τασενεργές ουσίες, μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Αξιοποιώντας λοιπόν, την ισχυρή αυτή αλληλεπίδραση, στο τελευταίο κομμάτι της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την περαιτέρω τροποποίηση με κατιονικές τασενεργές ουσίες · το βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (DTAB) και το βρωμιούχο τετραδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (TTAB), ένα ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένο με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs/CPE)). Τα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του dsDNA. Συγκρίνοντας, την απόδοση των ηλεκτροδίων αυτών και του ηλεκτροδίου MWNTs/CPE, αναφορικά με τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, διαπιστώθηκε μεγάλη βελτίωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρουσία των κατιονικών τασιενεργών μπορεί να ενισχύσει την προσρόφηση του dsDNA στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου MWNTs / CPE. Με βάση το σήμα οξείδωσης της γουανίνης, στις επιλεγόμενες αναλυτικές συνθήκες, πολύ χαμηλά επίπεδα του dsDNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από σύντομο χρόνο ακινητοποίησης και με όρια ανίχνευσης ίσα με  $0,650 \text{ mg L}^{-1}$  και  $0,119 \text{ mg L}^{-1}$ , χρησιμοποιώντας την τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού (DPASV), για τα ηλεκτρόδια DTAB/MWNTs/CPE και TTAB/MWNTs/CPE, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα ηλεκτρόδια που κατασκευάστηκαν αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων με διάφορες εφαρμογές, όπως η ανίχνευση του υβριδισμού και των διαφόρων τροποποιήσεων του DNA, σε φαρμακευτικές και περιβαλλοντικές αναλύσεις και στον ποιοτικό έλεγχο γενικότερα, αποφεύγοντας το υψηλό κόστος, τις χρονοβόρες και περίπλοκες διαδικασίες και τη χαμηλή ευαισθησία.

## Extended summary

### *Development of electrochemical DNA biosensors using carbon nanotubes*

During the recent years molecular genetics represent the new frontier. The genetic information required for the function and multiplication of the biological organism is stored, duplicated, and transformed by means of nucleic acids (NAs). So, because of their important role in life, nucleic acids (NAs) have been extensively studied with a number of different techniques.

Since Paleček discovered the electrochemical activity of NAs, a wide scale research into electrochemistry of natural and chemically modified nucleic acids has started. This research has led to a series of voltammetric approaches for rapid and inexpensive assays of DNA concentration and structure changes. So electrochemical biosensors have received enormous attention as they combine the analytical power of electrochemical methods with the specificity of NAs recognition process

To improve the sensitivity of DNA biosensor, nanomaterials, such as carbon nanotubes (CNTs), were used combined with electrochemical methods.

Since their discovery in 1991 by Iijima, carbon nanotubes (CNTs) have become the subject of intense investigation. CNTs have attracted much attention as analytical tools for a wide range of applications, due to their special chemical, electrical and mechanical properties. Considering the advantages of both single-walled (SW) and multi-walled (MW) CNTs, such as high surface area, good conductivity, favorable electronic properties and electrocatalytic effect, they present an impressive success for the construction of electrochemical sensors and biosensors.

In the beginning, the overall performance of three types of multi-walled carbon nanotubes paste electrodes (MWNTPEs) was studied and discussed in terms of optimal analytical conditions, such as the electrochemical pretreatment and the accumulation conditions of the dsDNA on the MWNTPEs. The results indicated that the electroactivity, inherent to carbon nanotubes paste electrodes, allowed a large enhancement of the guanine oxidation signal compared to that obtained at the conventional carbon paste electrodes (CPEs), moreover, the extent of the

enhancement depends on the type of MWNTs, incorporated into the paste. Also, using adsorptive transfer stripping voltammetry (AdSTV), the studied carbon nanotubes paste electrodes (CNTPEs) have been shown to be very suitable for the determination of the calf thymus dsDNA. Based on the signal of guanine, under the optimal conditions, very low levels of dsDNA can be detected following short accumulation times for all the types of MWNTPEs (MWNTPE<sub>1</sub>, MWNTPE<sub>2</sub>, MWNTPE<sub>3</sub>), with detection limits of 2.64 mg L<sup>-1</sup>, 2.02 mg L<sup>-1</sup> and 1.46 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Additionally, the dsDNA isolated from rat liver tissues is determined by use of the previously mentioned MWNTPEs.

As several efforts have been made in nucleic acids' (NAs) electroanalysis to replace the classical hanging mercury drop electrode (HMDE) or dropping mercury electrode (DME) by electrodes retaining electrochemical properties of the mercury surface but possessing advantages of solid electrodes (non-toxic material, mechanical resistance, applicability in simple and cheap sensor devices, etc.), the next step of this study was the fabrication of a new electrode by plating a mercury film on a glassy carbon electrode previously modified with multi walled carbon nanotubes (MF / MWNTs / GCE).

The MF / MWNTs / GCE was used for the analysis of single (ss) and double stranded (ds) DNA, as well as for Jurkat genomic DNAs methylated to different degree. The results indicated that the DNA molecules adsorbed quite strongly at the MF / MWNTs / GCE surface allowing the ex situ adsorption and produce well developed peaks (due to cytosine and adenine) by using adsorptive stripping (AdS, ex situ) square wave voltammetry (SWV). Also, SWV of Jurkat DNA mixtures methylated to different degrees revealed a linear decrease of the peak height with increasing methylation indicating an increase of structural rigidity.

Ionic liquids (ILs), which are ionic compounds composed of organic cations and various anions, exhibit many virtues such as high chemical and thermal stability, negligible vapor pressure, high conductivity and solubility and wide potential windows which make them to hold a great promise in many studies of electrochemistry and electrochemical sensors.

Due to these specific characteristics, ILs can be used as electrolytes, modifier on chemically modified electrode and can be mixed with graphite powder to obtain a new kind of chemically modified carbon paste electrode denoted as carbon ionic liquid electrode (CILE), which exhibits higher performance than the traditional



working electrodes. Thus CILE has been used for the detection of different electroactive molecules or as a basal electrode for further modification. Also, CILEs have begun to be used in the field of nucleic acids (NAs) electrochemistry with impressive success.

Thus, later to the study, combining the ability of CNTs to promote the adsorption and the electron-transfer reactions with the attractive remarks of the ILs, a paste electrode based on carbon nanotubes and room temperature ionic liquid has been prepared using MWNTs mixed with 1-Butyl-4-methylpyridinium hexafluorophosphate (IL-CNTPE) and used for the study of dsDNA. Electrochemical behavior of dsDNA on the IL-CNTPE was carefully investigated with the electrochemical parameters calculated. The prepared electrode showed the ability of ionic conductivity due the presence of IL layer on the CNTPE surface. DsDNA can be adsorbed on the electrode surface and an enhanced electrochemical oxidation with the increase of peak current was exhibited. Based on the oxidation peak of guanine, under the optimal conditions, very low levels of dsDNA can be detected following short accumulation time with detection limit of  $0.249 \text{ mg L}^{-1}$  by differential pulse voltammetry (DPV).

Interactions between DNA and surfactants have been studied extensively in recent years. Recently a number of papers published in the literature on the subject of DNA binding with surfactants, showing that DNA can form tight complexes with surfactants, through hydrophobic or electrostatic binding.

So, by exploiting this strong interaction, lately in our work, a CPE modified with MWNTs has been used as the platform for further modification with surface-confined films associated with cationic surfactants, such as dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB). These novel electrodes (DTAB/MWNTs/CPE and TTAB/MWNTs/CPE) have been applied for the determination of dsDNA with much success. A comparison of the electrochemical performance between these electrodes and the bare MWNTs/CPE showed the imperative electrochemical behavior of the dsDNA at the DTAB/MWNTs/CPE and TTAB/MWNTs/CPE with respect to the limit of detection and quantification. According to the results, an appropriate amount of the cationic surfactants can prompt the assembly of dsDNA on the MWNTs/CPE surface. The ability of the DTAB and TTAB to bind to polyelectrolyte chains bearing

electrical charges of opposite sign contributed to the enhanced adsorption of dsDNA on the electrode surface and led to improved sensitivity.

In conclusion, the above results suggest that the new fabricated dsDNA modified electrodes are a promising platform for the development of electrochemical biosensors with various applications, including direct quantification of DNA samples, for use in sequencing or polymerase chain reactions, or pharmaceutical testing, environmental and quality control, avoiding the high cost, time-consumption, low sensitivity and procedural complication.

**Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την εκπόνηση της διδακτορικής  
διατριβής**

**A. ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ**

**A.1. Ερευνητικές εργασίες**

**1. " Electrochemical study of dsDNA on carbon nanotubes paste electrodes applying cyclic and differential pulse voltammetry"**

Central of European Journal of Chemistry, Volume 11, Issue 3, 2013, Pages 413-423

**C.Serpi**, A.Voulgaropoulos, S.Girousi

**2. "Use of mercury film glassy carbon electrode modified with multi walled carbon nanotubes in electrochemical analysis of DNA"**

Electroanalysis, Volume 25, Issue 5, 2013,Pages 1256-1262

**C.Serpi**, A.Voulgaropoulos, S.Girousi

**3. "Electroanalytical quantification of total dsDNA extracted from human sample using, an ionic liquid modified, carbon nanotubes paste electrode"**

Analytica chimica acta, Volume 812, 2014,Pages 26-32

**C. Serpi**, L. Kovatsi, S. Girousi

**4. "Use of cationic surfactants film carbon paste electrodes modified with multi walled carbon nanotubes in electrochemical analysis of dsDNA"**

Electroanalysis, Volume 25, Issue 11, 2013, Pages 2493-2499

**C. Serpi**,A.Voulgaropoulos , S. Girousi

**A.2. Άρθρα επισκόπησης**

**1. " Recent Advances of Sensitive Electroanalytical Tools and Probes in the Study of DNA Structure"**

Current Organic Chemistry, 2010, Volume 14, No.19

S. Girousi, **C.Serpi**, S. Karastogianni and A. Ioannou

2. **"Innovative Configurations of Electrochemical DNA Biosensors"**

Sensing in Electroanalysis, 2011, Volume 6, Pages 65-87.

S.Girousi, S. Karastogianni, **C.Serpi**

3. **"Electrochemical Techniques as Promising Analytical Tools in the DNA Electrochemistry"** (Review article)

Sensing in Electroanalysis, 2012, Volume 7, Pages 107-140.

S.Girousi, S. Karastogianni, **C.Serpi**

**B. ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ**

1. **"Bioanalytical Applications of Oligonucleotides: Electrochemical Biosensors, Based on Oligonucleotides Hybridization Detection, as Promising Bioanalytical Tools "**

"Advances in Medicine and Biology, Edit. Leon V. Berhardt, Volume 59

S. Girousi, **C. Serpi** , S. Karastogianni

2. **" Voltammetry; A promising analytical technique in the study of compounds of biological importance"**

"Voltammetry: Theory, Types and Applications"

S. Girousi, **C. Serpi**, S. Karastogianni

## **Γ. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. **"Sensitive electroanalytical detection of dsDNA at carbon nanotubes paste electrodes"**

**C.Serpi**, S.Girousi (poster)

«Euroanalysis 2011» 16th European Conference on Analytical Chemistry:

Belgrade, Serbia, September 2011

2. **" Electroanalytical study of dsDNA using a carbon paste nanotubes electrode"**

**C.Serpi**, S.Girousi (poster)

«1st International Exhibition on Nanotechnologies & Organics

Electronics », July 2011

3. **" Electrochemical DNA biosensors based on carbon nanotubes "**

**C.Serpi**, S.Girousi, A,Voulagaropoulos (poster)

«2nd International Exhibition on Nanotechnologies & Organic Electronics»,

Thessaloniki, July 2012

4. **" Application of mercury film glassy carbon electrode modified with multi walled carbon nanotubes, in DNA electroanalysis"**

**C. Serpi**, A. Voulgaropoulos, S. Girousi (poster)

IMA 2013, September 2013 Thessaloniki, Greece

**Δημοσιεύσεις που πραγματοποιήθηκαν παράλληλα με την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής σε συναφή πεδίο με το αντικείμενο της διατριβής**

**A. ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ**

**A.1. Ερευνητικές εργασίες**

**1. " Electroanalytical study of the interaction between dsDNA and curcumin in the presence of copper(II) "**

Talanta, Volume 81, Issues 4-5, 15 June 2010, Pages 1731-1734

**C. Serpi, Z. Stanic, S. Girousi**

**2. "Adsorptive transfer voltammetry applied to the study of chromium-induced DNA damage in the presence of curcumin"**

International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Volume 93, Issue 5, March 2012, Pages 1-10

**C. Serpi, Z. Stanic, S. Girousi**

**B. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**1. " Electroanalytical study of the interaction between dsDNA and curcumin in the presence of copper(II) "**

**C. Serpi, Z. Stanic, S. Girousi (poster)**

IMA 2009, October 2009, Athens, Greece

## Συνοτομογραφίες

- CPE – Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (Carbon Paste Electrode)
- MWNTPEs-Ηλεκτρόδια πάστας νανοσωλήνων άνθρακα
- GCE- Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (Glassy Carbon Electrode)
- MF/MWNTs/GCE-Υμένιο υδραργύρου σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων
- IL-CNTPE-Ηλεκτρόδιο πάστας νανοσωλήνων άνθρακα ιοντικού υγρού
- MWNTs/CPE-Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων
- DTAB/MWNTs/CPE-Υμένιο βρωμιούχου δωδεκυλοτριμεθυλαμμωνίου σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων
- TTAB/MWNTs/CPE-Υμένιο βρωμιούχου τετραδεκυλοτριμεθυλαμμωνίου σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα τροποποιημένου με νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων
- DPV – Βολταμμετρία διαφορικού παλμού (Differential Pulse Voltammetry)
- SWV – Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (Square Wave Voltammetry)
- AdTSV – Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία αλλαγής μέσου (Adsorptive Transfer Stripping Voltammetry)
- DPASV-Ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία διαφορικού παλμού (Anodic Stripping Pulse Voltammetry)
- dsDNA – Δίκλωνο Δεοξυ-ριβονουκλεϊνικό οξύ (Double stranded Deoxyribonucleic Acid)
- ssDNA – Μονόκλωνο Δεοξυ-ριβονουκλεϊνικό οξύ (Single stranded Deoxyribonucleic Acid)

