



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Ανάπτυξη τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροχημικού αισθητήρα  
τροποποιημένου με νανοσωματίδια για τον προσδιορισμό βιοδεικτών σε  
βιολογικά υγρά**

**ΠΟΛΥΖΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2024**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Ανάπτυξη τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροχημικού αισθητήρα  
τροποποιημένου με νανοσωματίδια για τον προσδιορισμό βιοδεικτών σε  
βιολογικά υγρά**

**ΠΟΛΥΖΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**A.M.:7111112200013**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Χρήστος Κόκκινος**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Χρήστος Κόκκινος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

**Αναστάσιος Οικονόμου**, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

**Αθηνά Μάρκου**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 13/06/2024**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας, η ανίχνευση ποικίλων βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία έχει γίνει όλο και πιο σημαντική. Οι βιοδείκτες αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την εντοπισμό πολλών ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευρολογικές διαταραχές, καθώς και οι παθήσεις των νεφρών. Γι' αυτό και είναι επιτακτική ανάγκη η ανίχνευσή τους να γίνεται με γρήγορες, απλές και εύκολες τεχνικές. Τέτοιες τεχνικές αποτελούν οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι με την χρήση αισθητήρων, οι οποίες έχουν αρχίσει να θεωρούνται από τις πιο ελπιδοφόρες προσεγγίσεις.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η κατασκευή τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροχημικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά. Συγκεκριμένα, οι βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν η αδενίνη, η γουανίνη και η κρεατινίνη, με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Οι τρισδιάστατοι εκτυπωμένοι αισθητήρες αιθάλης/πολυγαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης, ενώ για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης χρησιμοποιήθηκαν τρισδιάστατοι εκτυπωμένοι αισθητήρες αιθάλης/πολυγαλακτικού οξέος τροποποιημένοι με οξείδιο του χαλκού. Και στις δύο περιπτώσεις, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι της κάθε βολταμμετρικής μεθόδου και έπειτα, εφαρμόστηκαν σε πραγματικά δείγματα. Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν ήταν απλές, ταχείες, φιλικές προς το περιβάλλον και παρείχαν χαμηλά όρια ανίχνευσης ίσα με 0,19  $\mu\text{M}$  για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης, και 1,5  $\mu\text{M}$  για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Αναλυτική Χημεία, ηλεκτροχημική μέθοδος, αισθητήρες, προσδιορισμός βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Τρισδιάστατος εκτυπωμένος ηλεκτροχημικός αισθητήρας, προσδιορισμός βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά, αδενίνη, γουανίνη, κρεατινίνη

## ABSTRACT

In recent years, with the advancement of science and technology, the detection of various biomarkers related to human health has gained increasingly importance. Biomarkers are a useful tool for the detection of many diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, neurological disorders, as well as kidney diseases. Therefore, it is crucial to detect such diseases using fast, simple, and easy techniques. Electrochemical methods employing smart sensors have emerged as one of the most promising approaches.

The aim of this research is the fabrication of 3D printed electrochemical sensor for the determination of biomarkers in biological fluids. More specifically, the target biomarkers were adenine, guanine, and creatinine, using Differential Pulse Voltammetry (DPV). 3D printed carbon black/ polylactic acid sensors were used for the simultaneous determination of adenine and guanine, while 3D printed carbon black/ polylactic acid sensors modified with copper oxide were used for the determination of creatinine. In both cases, the parameters of each voltammetric method were studied and optimized, and then, the 3D printed sensors were successfully applied to the determination of target biomarkers in real samples. The developed methods were straightforward, rapid, environmentally friendly and provided low limits of detection equal to 0.19  $\mu\text{M}$  for the simultaneous determination of adenine and guanine, and 1.5  $\mu\text{M}$  for the determination of creatinine.

**SUBJECT AREA:** Analytical Chemistry, electrochemical method, sensors, determination of biomarkers in biological fluids

**KEYWORDS:** 3D printed electrochemical sensor, determination of biomarkers in biological fluids, adenine, guanine, creatinine

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Χρήστο Κόκκινο για την ανάθεση της εργασίας αυτής καθώς επίσης και για το χρόνο που διέθεσε, την επίβλεψη και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Λεωνίδα Παπαγιαννακόπουλο για την συνεισφορά του στα πειράματα προσδιορισμού κρεατινίνης, καθώς και, το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας για την προσφορά της υλικοτεχνικής υποδομής.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024 στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) υπό την καθοδήγηση και επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Χ. Κόκκινου.

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

A (Adenine): Αδενίνη

AA (Ascorbic Acid): Ασκορβικό οξύ

AGAT (Arginine:glycine amidinotransferase): Αμιδινο τρανσφεράση αργινίνης γλυκίνης

ATP (Adenosine-5'-triphosphate): 5'-τριφωσφορική αδενοσίνη

C (Cytosine): Κυτοσίνη

CA (Creatinine Amidohydrolase): Αμιδοϋδρολάση της κρεατινίνης

CI (Creatine Amidinohydrolase): Αμιδοϋδρολάση της κρεατίνης

CV (Cyclic Voltammetry): Κυκλική βολταμμετρία

DA (Dopamine): Ντοπαμίνη

DNA (Deoxyribonucleic Acid): Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DPV (Differential-Pulse Voltammetry): Διαφορική παλμική βολταμμετρία

EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy): Φασματοσκοπία διασποράς ακτίνων X

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay): Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία

FDM (Fused Deposition Modeling): Συντηγμένη μοντελοποίηση με εναπόθεση

G (Guanine): Γουανίνη

GAMT (Guanidinoacetate N-methyltransferase): Γουανιδινοοξική N-μεθυλ τρανσφεράση

GCE (Glassy Carbon Electrode): Υάλινο ηλεκτρόδιο άνθρακα

GFR (GFR ρυθμός σπειραματικής διήθησης): Ρυθμός σπειραματικής διήθησης

GLU (Glucose): Γλυκόζη

GNPs (Gold Nanoparticles): Νανοσωματίδια χρυσού

GQDs (Graphene Quantum Dots): Κβαντικές κουκκίδες γραφενίου

HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode): Ηλεκτρόδια κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου

LOD (Limit Of Detection): Όριο ανίχνευσης

LOQ (Limit Of Quantification): Όριο ποσοτικοποίησης

MFEs (Mercury-Film Electrodes): Ηλεκτρόδια λεπτού στρώματος υδραργύρου

MWCNT (Multi-Walled Carbon Nanotubes): Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων

PLA (Poly-Lactic Acid): Πολυγαλακτικό οξύ



R (Recovery): Ανάκτηση  
RE (Reference Electrode): Ηλεκτρόδιο αναφοράς  
RNA (Ribonucleic acid): Ριβονουκλεϊκό οξύ  
RSD (Relative Standard Deviation): Σχετική τυπική απόκλιση  
SCE (Saturated Calomel Electrode): Ηλεκτρόδιο καλομέλινα  
SEM (Scanning Electron Microscope): Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης  
SO<sub>x</sub> (Sarcosine Oxidase): Οξειδάση της σαρκοζίνης  
SWCNT (Single-Walled Carbon Nanotubes): Νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος  
SWV (Square-Wave Voltammetry): Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού  
T (Thymine): Θυμίνη  
U (Urea): Ουρία  
UA (Uric Acid): Ουρικό οξύ  
UCR (Urea-Creatinine): Κρεατινίνη ούρων  
WE (Working Electrode): Ηλεκτρόδιο εργασίας  
XNN: Χρόνια νεφρική νόσος

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ DNA</b> .....	<b>18</b>
1.1 Εισαγωγή στους βιοδείκτες.....	18
1.2 Αδενίνη – Γουανίνη.....	19
1.2.1 Δομή και βασικά συστατικά του DNA.....	19
1.2.2 Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός πουρινών και πυριμιδινών DNA.....	21
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ</b> .....	<b>24</b>
2.1 Εισαγωγή στη κρεατινίνη .....	24
2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού κρεατινίνης .....	26
2.2.1 Χρωματομετρική μέθοδος .....	27
2.2.2 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι .....	28
2.2.2.1 Ενζυματικοί αισθητήρες κρεατινίνης .....	28
2.2.2.2 Μη ενζυματικοί αισθητήρες κρεατινίνης .....	30
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ</b> .....	<b>32</b>
3.1 Εισαγωγή στην ηλεκτροχημεία .....	32
3.2 Εισαγωγή στη βολταμμετρία .....	34
3.3 Δυναμικό ηλεκτροδίου .....	35
3.4 Ηλεκτροδιακές διεργασίες.....	38
3.5 Τρόποι μεταφοράς μάζας .....	39
3.6 Βολταμμογράφημα.....	40
3.7 Οργανολογία βολταμμετρίας.....	41
3.8 Κυκλική βολταμμετρία.....	43
3.9 Παλμική βολταμμετρία .....	44
3.9.1 Διαφορική παλμική βολταμμετρία .....	44
3.9.2 Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού .....	45
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ</b> .....	<b>47</b>
4.1 Εισαγωγή.....	47
4.2 Ηλεκτρόδια υδραργύρου.....	48
4.3 Ηλεκτρόδια άνθρακα.....	49
4.4 Ηλεκτρόδια μετάλλων .....	51
4.4.1 Ηλεκτρόδιο χαλκού .....	52
4.5 Τρισδιάστατα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια.....	53
4.5.1 Εισαγωγή στην τρισδιάστατη εκτύπωση.....	53
4.5.2 Αρχή τεχνικής 3D εκτύπωσης με συντηγμένη μοντελοποίηση εναπόθεσης	54
4.5.3 Αγώγιμα πολυμερή υλικά για παραγωγή 3D ηλεκτροδίων .....	55
4.5.4 Πλεονεκτήματα 3D εκτύπωσης με συντηγμένη μοντελοποίηση	56
εναπόθεσης .....	56

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>57</b>
------------------------------	-----------

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ..... 58**

5.1 Αντιδραστήρια.....	58
5.2 Οργανολογία.....	59
5.3 Κατασκευή αισθητήρα με τρισδιάστατη εκτύπωση.....	60
5.3.1 Σύνθεση πολυμερικών αγώγιμων νηματίων.....	60
5.3.2 Οργανολογία και υλικά για την 3D εκτύπωση.....	61
5.3.3 Διαδικασία σχεδιασμού και εκτύπωσης αισθητήρα.....	62

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ..... 64**

6.1 Αρχή μεθόδου και πειραματική διαδικασία προσδιορισμού.....	64
6.2 Πειραματικά αποτελέσματα.....	65
6.2.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων.....	65
6.2.1.1 Επίδραση φέροντος ηλεκτρολύτη.....	65
6.2.1.2 Επίδραση δυναμικού προσυγκέντρωσης.....	66
6.2.1.3 Επίδραση χρόνου προσυγκέντρωσης.....	67
6.2.1.4 Κυκλικό βολταμμετρικό προφίλ.....	68
6.2.1.5 Σύγκριση με εμπορικά ηλεκτρόδια.....	69
6.2.2 Καμπύλη αναφοράς και αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου.....	70
6.2.2.1 Προσδιορισμός αδενίνης.....	70
6.2.2.2 Προσδιορισμός γουανίνης.....	72
6.2.2.3 Ταυτόχρονος προσδιορισμός αδενίνης και γουανίνης.....	73
6.2.3 Μελέτη παρεμποδίσεων.....	75
6.2.3.1 Μελέτη παρεμπόδισης ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης, ντοπαμίνης και κυτοσίνης.....	75
6.2.3.2 Μελέτη παρεμπόδισης θυμίνης.....	76
6.2.4 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.....	77
6.2.4.1 Επιμολυσμένο δείγμα ούρων.....	77
6.2.4.2 Επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος.....	79

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΟΞΕΙΔΙΟ ΧΑΛΚΟΥ..... 81**

7.1 Αρχή μεθόδου προσδιορισμού.....	81
7.2 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού.....	81
7.3 Πειραματικά αποτελέσματα.....	82
7.3.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων.....	82
7.3.1.1 Επίδραση φέροντος ηλεκτρολύτη.....	82
7.3.1.2 Επίδραση δυναμικού εναπόθεσης.....	84
7.3.1.3 Επίδραση χρόνου εναπόθεσης.....	85
7.3.1.4 Κυκλικό βολταμμετρικό προφίλ.....	86
7.3.2 Καμπύλη αναφοράς.....	87

7.3.3 Μελέτη παρεμπόδισης ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, ντοπαμίνης και γλυκόζης .....	89
7.3.4 Εφαρμογές σε πραγματικά δείγματα – Ανακτήσεις.....	90
7.3.4.1 Προσδιορισμός κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα.....	90
7.3.4.2 Προσδιορισμός κρεατινίνης σε δείγμα ούρων .....	92
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>94</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>96</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Χημικές δομές βάσεων DNA. [τροπ. [7] ].....	19
Εικόνα 2: Μηχανισμοί οξειδωσης της γουανίνης και της αδενίνης. [τροπ. [13] ].....	23
Εικόνα 3: Μηχανισμός οξειδωσης της κρεατινίνης. [49].....	25
Εικόνα 4: α)Εναρξη βιοσύνθεσης κρεατίνης στους νεφρούς, μέσω της αντίδρασης της γλυκίνης και L-αργινίνης παρουσία AGAT (αμιδινο τρανσφεράση αργινίνης γλυκίνης), παράγοντας γουανιδινοξικό οξύ, β)Το GAMT (γουανιδινοοξική N-μεθυλ τρανσφεράση) καταλύει τη μεθυλίωση του γουανιδινοξικού οξέος στο ήπαρ για να δώσει κρεατίνη, γ) Η κρεατίνη τυπικά μεταβολίζεται στους μύες και τον εγκέφαλο για να δημιουργήσει την κρεατινίνη ως απόβλητο προϊόν, ενώ η μυϊκή κρεατίνη ή φωσφοκρεατίνη (η οποία παράγεται από την κρεατίνη παρουσία κινάσης κρεατινίνης και ATP) μετατρέπεται σε κρεατινίνη και, δ) Κλινική ευελιξία της κρεατινίνης, υπογραμμίζοντας τη σχέση της με τις νεφρικές λειτουργίες και την ανίχνευση καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών [τροπ. [47] ].....	25
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της πυρηνόφιλης προσβολής της ενεργής ομάδας μεθυλενίου της κρεατινίνης στη μετα-θέση του πικρικού οξέος σε αλκαλικό μέσο για να δώσει το κόκκινο-κίτρινο χρωμογόνο. [47] .....	27
Εικόνα 6: α) Υδρόλυση κρεατινίνης με χρήση CA (αμιδοϋδρολάση της κρεατινίνης) και Cl (την αμιδοϋδρολάση της κρεατίνης) στον αντιδραστήρα διενζύμου, β) υδρόλυση ουρίας και, γ) σχηματισμός H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> από το σχήμα τριών σταδίων που καταλύεται από ένζυμο μέσω της SO <sub>x</sub> (οξειδάση της σαρκοζίνης). [τροπ. [59] ].....	29
Εικόνα 7: Η αμμωνία απελευθερώνεται κατά την ενζυματική αντίδραση της απιμινάσης της κρεατινίνης, η οποία μετατρέπει την κρεατινίνη σε N-μεθυλ υδαντοΐνη παρουσία νερού και απελευθερώνει NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> το οποίο ανιχνεύεται είτε με pH/ποτενσιομετρικό αισθητήρα. [τροπ. [60] ].....	29
Εικόνα 8: Υπολογιστικά βελτιστοποιημένη δομή (αριστερά) και απλή 2D χημική δομή (δεξιά) του Cu(II) σε σύμπλοκο με την κρεατινίνη. [63].....	31
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των 3 τρόπων μεταφοράς μάζας: διάχυση, μετανάστευση και μεταγωγή. [67] .....	39
Εικόνα 10: Τυπική μορφή βολταμμογραφήματος. [69] .....	41
Εικόνα 11: Οργανολογία βολταμμετρικών μετρήσεων. [τροπ. [70] ].....	42
Εικόνα 12: Α)Τριγωνικό σήμα διέγερσης που χρησιμοποιείται στην κυκλική βολταμμετρία και Β) Απεικόνιση κυκλικού βολταμμογραφήματος. [71] .....	44

Εικόνα 13: Α) Απεικόνιση της κυματομορφής δυναμικού (E)-χρόνου για τη βολταμμετρία διαφορικού παλμού, Β)Τυπική μορφή βολταμμογραφήματος στην διαφορική παλμική βολταμμετρία. [69].....	45
Εικόνα 14: Σήματα διέγερσης για την βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού. [65].....	46
Εικόνα 15: Περιοχές δυναμικών για 3 είδη υλικών ηλεκτροδίων (άνθρακα, υδραργύρου και λευκόχρυσου) σε διαφορετικούς φέροντες ηλεκτρολύτες. [67].....	48
Εικόνα 16: Απεικόνιση 3D εκτυπωτή για χρήση με FDM τεχνική. [τροπ. [87] ] .....	55
Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης των νηματίων και φωτογραφία του αγώγιμου νήματος. ....	61
Εικόνα 18: Απεικόνιση του 3D εκτυπωτή.....	62
Εικόνα 19: Α) Διαδικασία 3D εκτύπωσης ηλεκτροδίου και Β) Φωτογραφία και διαστάσεις ηλεκτροδίου. ....	63
Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροχημικής μεθόδου. ....	64
Εικόνα 21: Αντιδράσεις οξειδωσης γουανίνης και αδενίνης.....	65
Εικόνα 22: Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας διαλύματος μείγματος 20μM αδενίνη-γουανίνη σε διαφορετικούς ηλεκτρολύτες και σε διαφορετικές τιμές pH α) διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl 0,1M με pH=2 και pH=3, β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COONa 0,1M με pH 5, γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M με pH 7 και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών, NH <sub>3</sub> -NH <sub>4</sub> Cl 0,1 M με pH 10.....	66
Εικόνα 23: Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος των κορυφών οξειδωσης της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 5μM αδενίνη-γουανίνη.....	67
Εικόνα 24: Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος των κορυφών οξειδωσης της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 5μM αδενίνης- γουανίνης....	68
Εικόνα 25: Κυκλικό βολταμμογράφημα της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 0μM και 300μM αδενίνη- γουανίνη.....	69
Εικόνα 26: Βολταμμογραφήματα διαλύματος 5μM αδενίνης – γουανίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικό τύπο ηλεκτροδίου ως υπόστρωμα.....	70
Εικόνα 27: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αδενίνης. ....	71
Εικόνα 28: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού αδενίνης.....	71
Εικόνα 29: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης γουανίνης. ....	72
Εικόνα 30: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού γουανίνης. ....	73
Εικόνα 31: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αδενίνης – γουανίνης. ....	74

Εικόνα 32: Καμπύλη αναφοράς αδενίνης - γουανίνης. ....	74
Εικόνα 33: Επίδραση ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης, ντοπαμίνης και κυτοσίνης σε 5μM αδενίνης – γουανίνης.....	76
Εικόνα 34: Επίδραση παρουσίας θυμίνης στο ύψος κορυφών 5μM αδενίνης – γουανίνης.....	77
Εικόνα 35: Βολταμμογραφήματα προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα ούρων με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το βολταμμογράφημα των επιμολυσμένων ούρων και με μαύρο οι 3 σταθερές προσθήκες 2,5μM αδενίνης – γουανίνης. ....	78
Εικόνα 36: Καμπύλες γνωστής προσθήκης προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα ούρων. Με κόκκινο χρώμα η καμπύλη προσδιορισμούς της αδενίνης και με μαύρο χρώμα της γουανίνης.....	78
Εικόνα 37: Βολταμμογραφήματα προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το βολταμμογράφημα του επιμολυσμένου πλάσματος και με μαύρο οι 3 σταθερές προσθήκες 2,5μM αδενίνης – γουανίνης. ....	79
Εικόνα 38: Καμπύλες γνωστής προσθήκης προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος. Με κόκκινο χρώμα η καμπύλη προσδιορισμούς της αδενίνης και με μαύρο χρώμα της γουανίνης. ....	80
Εικόνα 39: Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας διαλύματος μείγματος 20μM κρεατινίνης και 0μM κρεατινίνης σε διαφορετικούς ηλεκτρολύτες με διαφορετικές τιμές pH α) διάλυμα HCl με pH=2, β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών CH <sub>3</sub> COOH- CH <sub>3</sub> COONa 0,1M με pH 4,5, γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M με pH 7 και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών, NH <sub>3</sub> -NH <sub>4</sub> Cl 0,1 M με pH 9,5.....	83
Εικόνα 40: Γράφημα που απεικονίζει την πτώση του σήματος κορυφής οξειδωσης του χαλκού παρουσία 20μM κρεατινίνης σε διάφορους ηλεκτρολύτες με διαφορετικό pH. ....	83
Εικόνα 41: Επίδραση του δυναμικού εναπόθεσης στο υψός κορυφής του χαλκού παρουσία 20μM κρεατινίνης. ....	84
Εικόνα 42: Επίδραση του χρόνου εναπόθεσης στον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε διάλυμα 20μM αδενίνης- γουανίνης. ....	85
Εικόνα 43: Κυκλικό βολταμμογράφημα της κρεατινίνης σε 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια Cu/CB/PLA. ....	87

Εικόνα 44: Κυκλικό βολταμμογράφημα της κρεατινίνης σε 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια CB/PLA.....	87
Εικόνα 45: Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις 0μM 5μM 10μM 15μM 20μM 25μM 30μM 35μM και 40 μM.....	88
Εικόνα 46: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης. ....	89
Εικόνα 47: Επίδραση 100μM ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης και ντοπαμίνης στον προσδιορισμό 20μM κρεατινίνης.....	90
Εικόνα 48: Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν σε συνθετικά ούρα παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις από 0-25μM.....	91
Εικόνα 49: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα. ....	92
Εικόνα 50: Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν σε δείγμα ούρα παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις από 0-25μM.....	93
Εικόνα 51:Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα. ....	93



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Υγιή και επιβλαβή επίπεδα κρεατινίνης σε βιολογικά υγρά. [τροπ. [47] ]	26
Πίνακας 2: Ταξινόμηση ηλεκτροχημικών τεχνικών. [64] .....	34
Πίνακας 3: Αναλογία μαζών και περιεκτικότητα wt% των αγώγιμων πολυμερικών νηματίων. ....	61

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ DNA

## 1.1 Εισαγωγή στους βιοδείκτες

Με τη συνεχή πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας, η ανίχνευση βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία έχει γίνει όλο και πιο κρίσιμη. [1] Οι βιοδείκτες είναι βιολογικά μόρια που εντοπίζονται στα υγρά ή στους ιστούς του σώματος και μπορούν να δείξουν την φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού ή την ύπαρξη κάποιας ασθένειας. Πιθανοί βιοδείκτες είναι διάφορα ανόργανα ιόντα όπως το  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  αλλά και οργανικά μόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA), σακχαρίτες κ.α. [2] Οι βιοδείκτες αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την εντοπισμό πολλών ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευρολογικές διαταραχές, [1] καθώς και οι παθήσεις των νεφρών και άλλες σχετικές. [3]

Οι κλασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό βιοδεικτών περιλαμβάνουν την ενζυμική ανοσοπροσοφορική δοκιμασία (ELISA), τη φασματομετρία μάζας, τη χρωματογραφία και άλλες τεχνικές. Παρόλο που αυτές οι τεχνικές έχουν παρουσιάσει σημαντικά αποτελέσματα στη βιοϊατρική έρευνα και την κλινική διάγνωση, έχουν ωστόσο αρκετούς περιορισμούς με κυριότερους τον εξειδικευμένο εξοπλισμό, το κόστος και το χρόνο ανάλυσης. Τελευταία, οι επιστημονικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη νέων, ευαίσθητων και αποτελεσματικών μεθόδων για την ανίχνευση των βιοδεικτών με τη χρήση αισθητήρων, οι οποίοι θεωρούνται μία από τις πιο ελπιδοφόρες προσεγγίσεις. [1]

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ιατρική διαγνωστική, τη βιοϊατρική έρευνα και βιοπαρακολούθηση, παρουσιάζοντας πολλαπλά πλεονεκτήματα. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα, καθώς και ικανότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, φορητότητα και επιπλέον παρέχουν τη δυνατότητα για πολυστοιχειακή ανάλυση. [1]

## 1.2 Αδενίνη – Γουανίνη

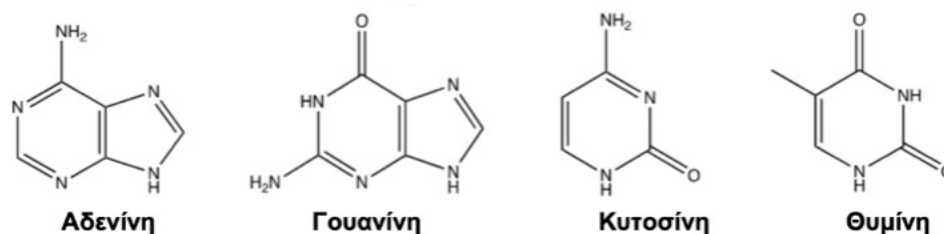
Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες για την ανίχνευση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) με τη χρήση αισθητήρων έχουν αυξηθεί. Η χρήση αυτών των τεχνολογιών για την ανίχνευση των πουρινών και πυριμιδινών του DNA, είναι σημαντική στην κλινική διάγνωση, τη φαρμακολογική έρευνα, καθώς και στην κατανόηση του βασικού μηχανισμού της γενετικής πληροφορίας. [4]

### 1.2.1 Δομή και βασικά συστατικά του DNA

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) αποτελούν γενετικά μόρια που αποτελούνται από βάσεις και νουκλεοτίδια. Αυτά τα μόρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία του κύκλου ζωής και μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Οι βάσεις και τα νουκλεοτίδια αποτελούν τα δομικά στοιχεία αυτών των γενετικών μορίων, έχοντας ιδιαίτερη σημασία στον τομέα των φαρμακευτικών βιομηχανιών, της ιατρικής χημείας και της μελέτης των νουκλεϊκών οξέων. [5]

Το DNA κωδικοποιεί γενετικές πληροφορίες μέσω μοναδικών συνδυασμών των τεσσάρων βάσεων: γουανίνη (G), αδενίνη (A), θυμίνη (T) και κυτοσίνη (C). [6]

Η γουανίνη (G) και η αδενίνη (A) ανήκουν στις πουρίνες και η δομή τους περιλαμβάνει έναν αρωματικό δακτύλιο πυριμιδίνης, που συνδέεται με έναν δακτύλιο ιμιδαζόλης. Από την άλλη πλευρά, η κυτοσίνη (C) και η θυμίνη (T) ανήκουν στις πυριμιδίνες, που περιέχουν μόνο έναν αρωματικό δακτύλιο πυριμιδίνης στη δομή τους. [7]



Εικόνα 1: Χημικές δομές βάσεων DNA. [τροπ. [7] ]

Αυτές οι τέσσερις βάσεις, η γουανίνη (G), η αδενίνη (A), η κυτοσίνη (C) και η θυμίνη (T), αποτελούν τα βασικά δομικά στοιχεία της τρισδιάστατης δομής της διπλής έλικας

του DNA. Σε αυτήν την δομή, η γουανίνη (G) σχηματίζει συμπληρωματικό ζεύγος με την κυτοσίνη (C) και η αδενίνη (A) σχηματίζει συμπληρωματικό ζεύγος με την θυμίνη (T). Αυτή η συμπληρωματική αλληλουχία των βάσεων είναι καθοριστική για την αντιγραφή και την μετάδοση της γενετικής πληροφορίας. [8]

Η γουανίνη (G) και η αδενίνη (A), είναι σημαντικά συστατικά του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος και παίζουν θεμελιώδεις ρόλους στη διαδικασία της ζωής. [9] Συγκεκριμένα, η αδενίνη (A) έχει τεράστια βιολογική σημασία, καθώς αποτελεί αζωτούχα βάση, που βρίσκεται στο DNA και το RNA, συμβάλλοντας στη σύνθεση των γενετικών πληροφοριών. Είναι, επίσης, ένα συστατικό της τριφωσφορικής αδενοσίνης, ένα βασικό μόριο απελευθέρωσης ενέργειας στα κύτταρα. Η αδενίνη συμμετέχει ενεργά στον κυτταρικό μεταβολισμό, την κυτταρική αναπνοή, καθώς και ως συστατικό των νουκλεϊκών οξέων στη σύνθεση πρωτεϊνών. [10] Από την άλλη πλευρά, η γουανίνη (G) είναι αζωτούχα βάση που μπορεί να οξειδωθεί πιο εύκολα από τις άλλες, της οποίας ο χημικός μηχανισμός οξειδωσής της έχει μελετηθεί λεπτομερώς. [11] Η γουανίνη (G) συμμετέχει σε ποικίλες και ευέλικτες βιολογικές λειτουργίες, καθιστώντας την σημαντική. [12]

Το DNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες όπως ένζυμα ή αντισώματα. Ο άθικτος συνδυασμός των βάσεων DNA είναι κρίσιμος για τη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας και τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Επιπλέον, ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι βλάβη στο DNA συνδέεται με τη γήρανση, το άγχος του τρόπου ζωής, την έκθεση σε υπεριώδη ή υπέρυθρη ακτινοβολία, καθώς και την κατανάλωση καρκινογόνων χημικών ουσιών και συντηρητικών τροφίμων. [6]

Οι παράγοντες που αναφέρθηκαν, μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA μέσω εισαγωγών, διαγραφών ή μεταφράσεων των βάσεων του DNA, οι οποίες οδηγούν σε μεταλλάξεις. Αυτές οι μεταλλάξεις, στη συνέχεια μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων, βλάπτοντας την υγεία του οργανισμού μέσω κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης, απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ογκογένεσης. Για να κατανοήσουμε αυτές τις αλλαγές, έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες μελέτες που εξετάζουν τις βάσεις του DNA χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές. [6]

Σύμφωνα με τον μηχανισμό Watson-Crick, η γουανίνη (G) συνδυάζεται με την κυτοσίνη (C) μέσω τριών δεσμών υδρογόνου και ισχύει ότι  $[G] = [C]$ , ενώ η αδενίνη (A) συνδέεται με την θυμίνη (T) με δύο δεσμούς υδρογόνου και ισχύει ότι  $[A] = [T]$ . Η

αναλογία  $(G+C)/(A+T)$  είναι σταθερή και αναγνωρίζεται ως διακριτική παράμετρος μεταξύ διαφορετικών πηγών DNA/οργανισμών. Ως αποτέλεσμα, οι συγκεντρώσεις των βάσεων γουανίνης και αδενίνης στα βιολογικά υγρά σχετίζονται με διάφορους παράγοντες, όπως ο καταβολισμός των νουκλεϊνικών οξέων, οι διατροφικές συνήθειες και οι ενζυματικές δυσλειτουργίες. Επιπλέον, οι μεταβολές στη συγκέντρωση και στην αναλογία των πουρινών, είναι ενδεικτικές για ανωμαλίες και μεταλλάξεις του DNA που προκαλούνται από διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο ιός HIV, η επιληψία [13], και το αλτσχάιμερ. [14] Η γουανίνη και η αδενίνη παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία της ζωής και έχουν σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την στεφανιαία και εγκεφαλική κυκλοφορία, την αναστολή απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, το καρδιαγγειακό σύστημα και τη διατήρηση του καρδιακού ρυθμού. [15] Επιπλέον, το επίπεδο συγκέντρωσης γουανίνης ή αδενίνης σχετίζεται με γενετικές διαταραχές, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (σχετιζόμενο με την αδενίνη) και σύνδρομο Lesh-Nyhan (σχετιζόμενο με την γουανίνη). [13]

### **1.2.2 Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός πουρινών και πυριμιδινών DNA**

Η ανίχνευση πουρινών και πυριμιδινών του DNA είναι κρίσιμη για την κλινική διάγνωση καθώς και για την κατανόηση θεμελιωδών μηχανισμών γενετικής πληροφορίας. Η δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στο DNA είναι σημαντική για τον εντοπισμό, την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών. [14]

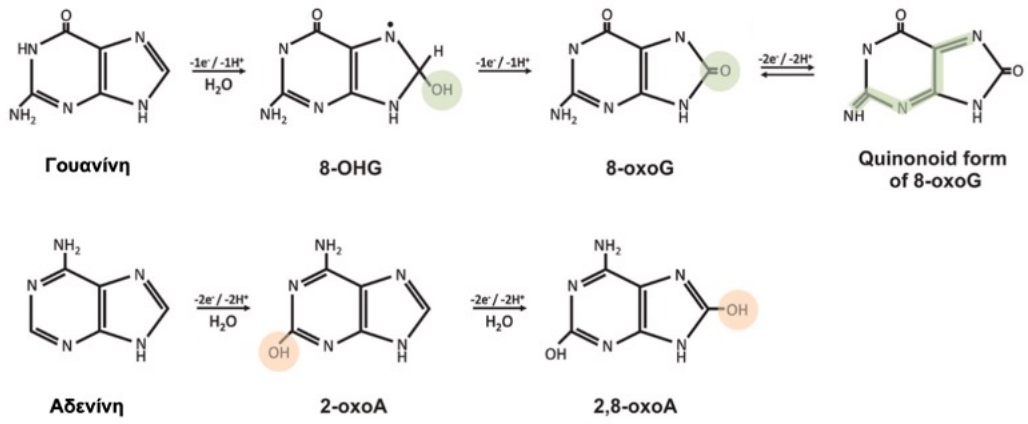
Έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μεθοδολογίες για τον προσδιορισμό των πουρινών και πυριμιδινών του DNA, συμπεριλαμβανομένης της υγρής χρωματογραφίας, της αέριας χρωματογραφίας, του φθορισμού, της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, και των ηλεκτροχημικών μεθόδων. Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι ακριβείς και επιλεκτικές, αλλά απαιτούν πολύπλοκα στάδια κατεργασίας δείγματος, όπως ο εμπλουτισμός του DNA ή η παραγωγοποίησή του, που είναι χρονοβόρα. Αντίθετα, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι είναι γρήγορες, απλές και πολύ ευαίσθητες, ιδιότητες που καθιστούν αυτές τις μεθόδους κατάλληλες για κλινική έρευνα και εφαρμογές. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές ηλεκτροχημικές μέθοδοι για ανάλυση του DNA, οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση των πουρινών και πυριμιδινών του, όπου αξιολογείται το πλήρες γονιδίωμα του DNA, ενώ άλλες

επικεντρώνονται στην υβριδοποίηση και την ανίχνευση του μονοκλωνικού DNA για συγκεκριμένα γονίδια. [16] Κατά τη διάρκεια των ηλεκτροχημικών αναλύσεων του DNA, οι πυριμιδίνες (T και C) είναι δύσκολο να οξειδωθούν καθώς απαιτούν υψηλό θετικό εφαρμοζόμενο δυναμικό και η κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων των βάσεων αυτών είναι αργή, και έτσι, εμποδίζεται η ανίχνευσή τους. [6] Επιπλέον, τα υψηλά δυναμικά οξειδωσης προκαλούν μεγάλα ρεύματα υποβάθρου, τα οποία επικαλύπτουν τα μέγιστα ρεύματα και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανίχνευσή τους. Τέλος, η ηλεκτροχημική οξείδωση των βάσεων πυριμιδίνης είναι μη αναστρέψιμη. [16]

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό της γουανίνης και της αδενίνης. Ωστόσο, η πρόκληση παραμένει στις χαμηλές συγκεντρώσεις τους στα βιοδείγματα και την πολυπλοκότητα των μητρών τους. Γι' αυτό τον λόγο, είναι πολύ σημαντικό να διερευνηθεί μια νέα μέθοδος για την ενίσχυση του σήματος, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της ανίχνευσης. Έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για την ενίσχυση του σήματος, όπως η ενζυμική επισήμανση, και η χρήση νανοϋλικών. Η εφαρμογή νανοϋλικών έχει κερδίσει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω των εγγενών πλεονεκτημάτων τους, όπως το χαμηλό κόστος, την καλή θερμική σταθερότητα και την μεγάλη επιφάνεια. [17]

Ο ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της γουανίνης και της αδενίνης βασίζεται στην οξείδωση τους προς 8-oxoG και 2-oxoA, αντίστοιχα. Διάφοροι τύποι ηλεκτροχημικών αισθητήρων για την γουανίνης (G) και αδενίνης (A) έχουν αναπτυχθεί. Μερικά παραδείγματα περιλαμβάνουν ηλεκτρόδια διαμαντιών με βόριο σε πυρίτιο [18,19], νανοσύνθετα σε υαλώδη ηλεκτρόδιο άνθρακα (GCE) πολυπυρρόλης/γραφένιου [20], πολυανιλίνη/νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNT) σε πλάκα πυριτίου [21], MWCNT/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/πολυντοπαμίνη σε υαλώδη ηλεκτρόδιο άνθρακα. [22]

Επίσης τροποποιημένα ηλεκτρόδια με Ni [23,24,25], Ti [26,27], Mn [14,28], Ag [29], Mo [30,31], λανθανίδες [32,33] ή σύνθετα υλικά με βάση την πολυανιλίνη [14], β-κυκλοδεξτρίνη [11,34,35] και νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, όπως νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) [8,23,25,30,32,33,34,35,36], γραφένιο [27,29,37], οξειδίο του γραφένιου (GO) [8,26,38], πυρολυτικό γραφίτη [37,39] και μικροϊνες γραφίτη έχουν εφαρμοστεί. [40,41]



Εικόνα 2: Μηχανισμοί οξείδωσης της γουανίνης και της αδενίνης. [τροπ. [13] ]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ

### 2.1 Εισαγωγή στη κρεατινίνη

Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) ορίζεται ως η μειωμένη νεφρική λειτουργία για τρεις μήνες ή περισσότερο. Επειδή η ΧΝΝ συνδέεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, 41,5% [42], είναι επιτακτικός ο έγκαιρος έλεγχος σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως οι διαβητικοί, οι υπερτασικοί και τα άτομα με οικογενειακό ιστορικό ΧΝΝ. Ωστόσο, η έλλειψη συστημάτων που είναι αφιερωμένα στην ανίχνευση κρεατινίνης αποτελεί πρόκληση για συχνές δοκιμές και αξιολόγηση στο σπίτι. [43]

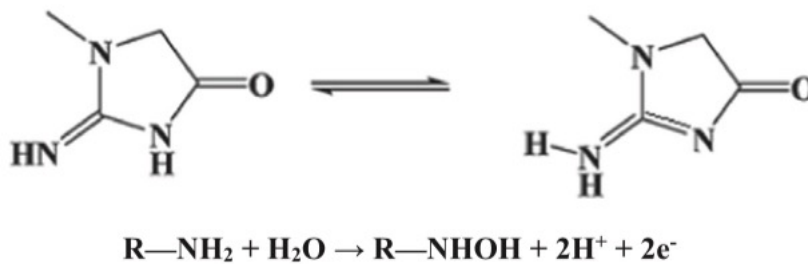
Η κρεατινίνη (2-αμινο-1-μεθυλ-ιμιδασολιδινόνη) ( $C_4H_7N_3O$ ) είναι ένα αζωτούχο προϊόν του μεταβολισμού που παράγεται σε καθημερινή βάση και αποβάλλεται από τον ανθρώπινο οργανισμό, διαδικασία που προϋποθέτει την καλή λειτουργία των νεφρών. Βρίσκεται στο αίμα και στους μυϊκούς ιστούς και απομακρύνεται από το σώμα μέσω των νεφρών με σπειραματική διήθηση. [44] Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR), αποτελεί σημαντικό δείκτη της νεφρικής λειτουργίας και σχετίζεται αντιστρόφως με τα επίπεδα της κρεατινίνης του πλάσματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της κρεατινίνης στα σωματικά υγρά χρησιμοποιείται για να εντοπιστεί η επάρκεια της νεφρικής λειτουργίας, η σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης και η εξέλιξη της νεφρικής νόσου. [44] Επιπλέον, η κρεατινίνη αποτελεί χρήσιμο βιοϊατρικό δείκτη για τη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς και για την ποσοτική αξιολόγηση της αιμοκάθαρσης. [45]

Η κρεατινίνη ορού εξαρτάται από τη σπειραματική διήθηση και συνήθως διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: την εξωγενή και την ενδογενή. Η εξωγενής κρεατινίνη προέρχεται από την κατανάλωση κρέατος, ενώ η ενδογενής κρεατινίνη είναι προϊόν του μεταβολισμού του μυϊκού ιστού. Ο μεταβολισμός του μυϊκού ιστού του ανθρώπινου οργανισμού είναι σταθερός λόγω του αυστηρού ελέγχου της ποσότητας κατανάλωσης κρέατος, με αποτέλεσμα η παραγωγή κρεατινίνης να διατηρείται σταθερή. Συνεπώς, η ενδογενής κρεατινίνη είναι η μοναδική πηγή κρεατινίνης ορού. [46]

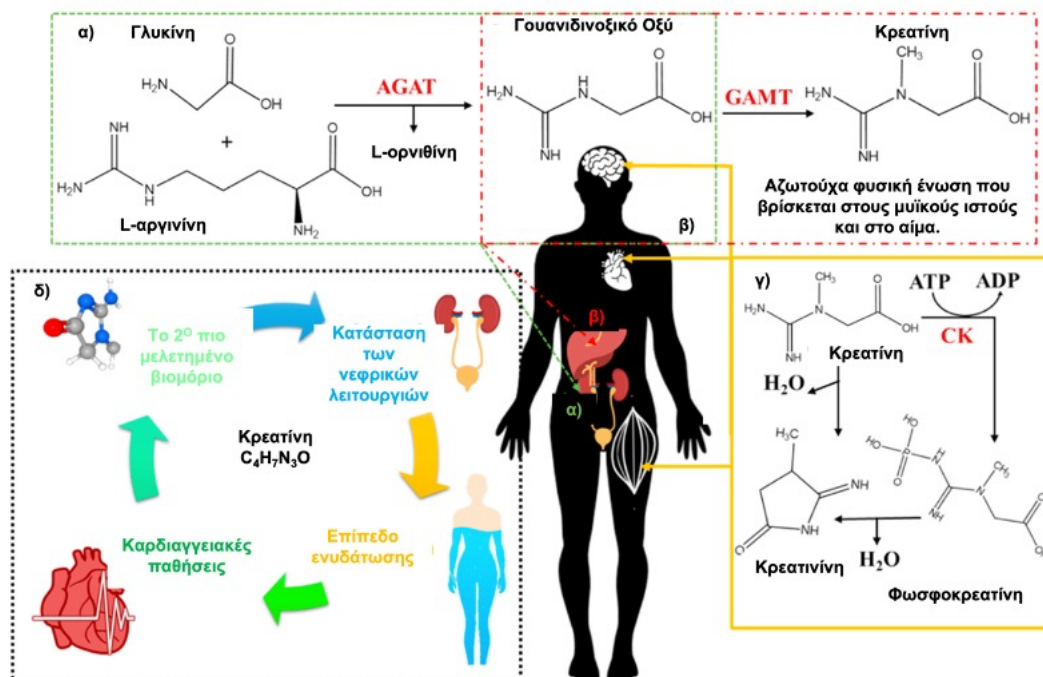
Η έκκριση κρεατινίνης μέσω των ούρων έχει μέτρια σταθερότητα από μέρα σε μέρα και αντικατοπτρίζει την ποσότητα του μυϊκού ιστού στο σώμα. Ο μηχανισμός και η διαδικασία μετατροπής της κρεατίνης σε κρεατινίνη και αντίστροφα δεν έχουν ακόμα



κατανοηθεί πλήρως. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι ο μεταβολισμός της κρεατίνης σε κρεατινίνη είναι κυρίως μια αυθόρμητη, μη ενζυματική, μονομοριακή διαδικασία, όπως περιγράφεται και στην παρακάτω εικόνα 3. [47] Το ανθρώπινο σώμα περιέχει την υψηλότερη συγκέντρωση κρεατίνης σε δύο διακριτές μορφές: 60% στη φωσφορυλιωμένη μορφή και 40% στην ελεύθερη μορφή. [48]



Εικόνα 3: Μηχανισμός οξειδωσης της κρεατίνης. [49]



Εικόνα 4: α) Έναρξη βιοσύνθεσης κρεατίνης στους νεφρούς, μέσω της αντίδρασης της γλυκίνης και L-αργινίνης παρουσία AGAT (αμιδίοιο τρανσφεράση αργινίνης γλυκίνης), παράγοντας γουανιδινοξικό οξύ, β) Το GAMT (γουανιδινοοξική N-μεθυλ τρανσφεράση) καταλύει τη μεθυλίωση του γουανιδινοξικού οξέος στο ήπαρ για να δώσει κρεατίνη, γ) Η κρεατίνη τυπικά μεταβολίζεται στους μύες και τον εγκέφαλο για να δημιουργήσει την κρεατινίνη ως απόβλητο προϊόν, ενώ η μυϊκή κρεατίνη ή φωσφοκρεατίνη (η οποία παράγεται από την κρεατίνη παρουσία κινάσης κρεατινίνης και ATP) μετατρέπεται σε κρεατινίνη και, δ) Κλινική ευελιξία της κρεατινίνης, υπογραμμίζοντας τη σχέση της με τις νεφρικές λειτουργίες και την ανίχνευση καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών [τροπ. [47] ]

Συνήθως, οι άνδρες έχουν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα κρεατινίνης σε σύγκριση με τις γυναίκες, καθώς οι γυναίκες έχουν μικρότερο σωματικό όγκο. [50] Η κρεατινίνη ορού σε υγιή άτομα κυμαίνεται μεταξύ 60 έως 110  $\mu\text{M}$  για τους άνδρες και 45 έως 90  $\mu\text{M}$  για τις γυναίκες, ενώ οι τιμές αυτές μπορεί να ξεπεράσουν και τα 1000 M σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. [43] Επιπλέον, το φυσιολογικό εύρος συγκέντρωσης της κρεατινίνης στα ανθρώπινα ούρα είναι 1,8–28,8 mM ενώ υψηλά ή χαμηλά επίπεδα κρεατινίνης μπορεί να υποδηλώνουν χρόνια νεφρική νόσο, νεφρική στένωση, μυϊκή δυστροφία, φλεγμονώδης μυϊκή νόσος, κακή λειτουργία του ήπατος και απώλεια σωματικών υγρών. [51] Ανάλογα με το βιολογικό υγρό, τα υγιή και επιβλαβή επίπεδα κρεατινίνης ποικίλλουν όπως περιγράφεται στον Πίνακα 1. [47] Επομένως, η ανίχνευση της κρεατινίνης είναι απαραίτητη σε δείγματα ανθρώπινων ούρων και ορού αίματος για κλινική παρακολούθηση. [42]

Συμπερασματικά, η ανίχνευση κρεατινίνης στο ανθρώπινο αίμα και ούρα αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη απλής, γρήγορης και χαμηλού κόστους μεθόδου για την ποσοτική μέτρηση της κρεατινίνης σε τέτοια βιολογικά, χωρίς περίπλοκη κατεργασία δείγματος παραμένει ένας σημαντικός στόχος για την πρόληψη ασθενειών παγκοσμίως. [52]

Πίνακας 1: Υγιή και επιβλαβή επίπεδα κρεατινίνης σε βιολογικά υγρά. [τροπ. [47] ]

Βιολογικά υγρά	pH	Υγιή επίπεδα κρεατινίνης	Επιβλαβή επίπεδα κρεατινίνης
Ούρα	4-8	4,4-18mM	>20 και <3mM
Πλάσμα αίματος	7,4±5	(Ανδρες) 60-110 $\mu\text{M}$ (Γυναίκες) 45-90 $\mu\text{M}$	<40 $\mu\text{M}$ και >150 $\mu\text{M}$

## 2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού κρεατινίνης

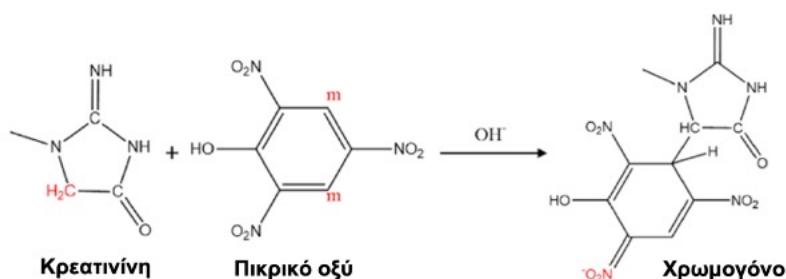
Χρωματογραφικές μέθοδοι [53], ποτενσιομετρικές [54], χρωματομετρικές [55] καθώς και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση [56] έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση κρεατινίνης. [57] Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν σύνθετη προκατεργασία δειγμάτων και χρήση εξελιγμένου εργαστηριακού εξοπλισμού, περιορίζοντας, έτσι, την εφαρμογής τους για ταχεία παρακολούθηση των επιπέδων κρεατινίνης σε

βιολογικά υγρά. [52] Αντίθετα, διάφορες ηλεκτροχημικές μέθοδοι χάρη του χαμηλού κόστους, της υψηλής εκλεκτικότητας, της ταχύτητας ανάλυσης και του φθηνού και φορητού εξοπλισμού έχουν κερδίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον. [42,44]

### 2.2.1 Χρωματομετρική μέθοδος

Από το 1886, όταν ο Max Jaffe ανέπτυξε για πρώτη φορά μια χρωματομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί αρκετές τροποποιημένες τεχνικές του Jaffe. Αυτές οι μέθοδοι συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα σε πολλά ιατρικά εργαστήρια. [58] Η χρωματομετρική ανίχνευση της κρεατινίνης με τη μέθοδο Jaffe περιλαμβάνει τον σχηματισμό του συμπλόκου της κρεατινίνης με το πικρικό οξύ για τη δημιουργία μιας ερυθροκίτρινης ένωσης που ανιχνεύεται με την χρήση φασματοφωτόμετρου. [43] Συγκεκριμένα, κατά την αντίδραση αυτή, ακολουθείται ένας πυρηνόφιλος μηχανισμός, όπου η ενεργή ομάδα μεθυλενίου της κρεατινίνης δρα ως πυρηνόφιλος δότης και ενώνεται στη μετα-θέση του αλκαλικού πικρατικού νατρίου, δημιουργώντας ένα κόκκινο-κίτρινο χρωμογόνο. Αυτό το χρωμογόνο, στη συνέχεια, αναλύεται φασματοφωτομετρικά για να ποσοτικοποιηθεί η συγκέντρωση της κρεατινίνης. [47]

Παρόλο που η μέθοδος Jaffe χρησιμοποιείται αρκετά συχνά, υπάρχουν ορισμένα βασικά μειονεκτήματα. Ένα από αυτά, είναι η έλλειψη εξειδίκευσης και η ευαισθησία της μεθόδου, που επηρεάζεται από το pH και τη θερμοκρασία. [43] Επιπλέον το πικρικό οξύ που χρησιμοποιείται στη διαδικασία είναι τοξικό και μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα ασφάλειας στο εργαστήριο. [47]



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της πυρηνόφιλης προσβολής της ενεργής ομάδας μεθυλενίου της κρεατινίνης στη μετα-θέση του πικρικού οξέος σε αλκαλικό μέσο για να δώσει το κόκκινο-κίτρινο χρωμογόνο. [47]

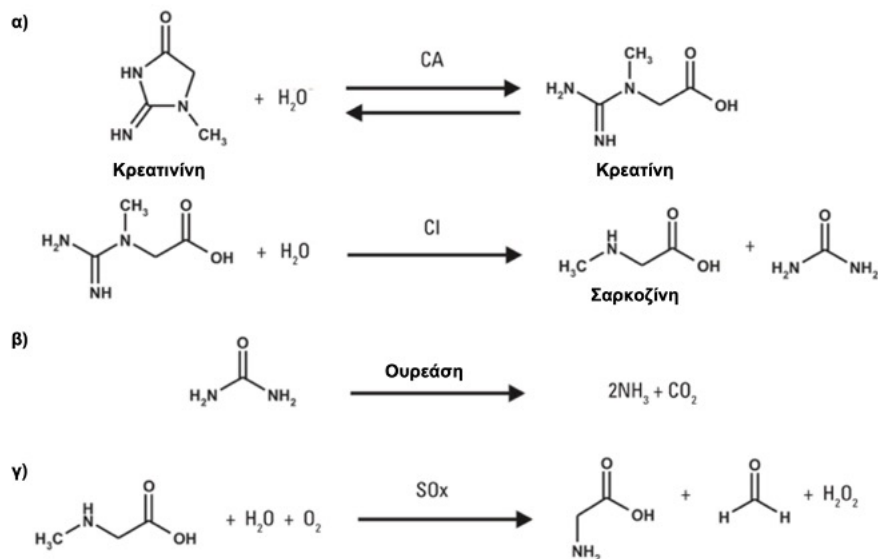
Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μέθοδος Jaffe δεν είναι κατάλληλη για την απευθείας ανίχνευση της κρεατινίνης σε δείγματα αίματος εξαιτίας του κόκκινου χρώματος που έχει το αίμα. [47] Επιπλέον, η παρουσία διαφόρων συστατικών στο αίμα, όπως σάκχαρα, ουρία, ουρικό οξύ, πυροσταφυλικό, ντοπαμίνη, ακετόνη, ακετοξικό οξύ, φρουκτόζη, γλυκόζη, ασκορβικό οξύ κλπ, επηρεάζει την ακρίβεια της μεθόδου. Ως αποτέλεσμα, χρησιμοποιείται ο ορός. [44] Αντιθέτως, τα δείγματα ούρων δεν αντιμετωπίζουν προβλήματα καθώς δεν έχουν χρωματισμό. [47]

## **2.2.2 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι**

Η ανίχνευση της κρεατινίνης γίνεται και ηλεκτροχημικά με τη χρήση κατάλληλων ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Οι αισθητήρες αυτοί κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους ενζυματικούς και τους μη ενζυματικούς. [47]

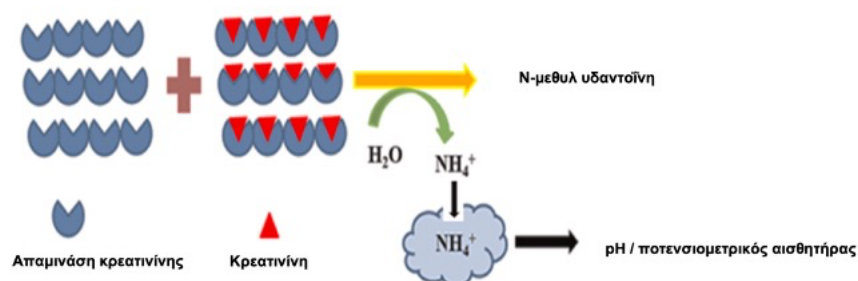
### **2.2.2.1 Ενζυματικοί αισθητήρες κρεατινίνης**

Η ενζυματική ανίχνευση της κρεατινίνης γίνεται με τη χρήση ενζύμων, όπως την αμιδοϋδρολάση της κρεατινίνης, την αμιδοϋδρολάση της κρεατίνης. Σε αυτήν την διαδικασία, η κρεατινίνη μετατρέπεται σε κρεατίνη, η κρεατίνη με τη σειρά της σε σαρκοζίνη και τέλος η σαρκοζίνη σε γλυκίνη. [47] Η συγκεκριμένη ανίχνευση περιλαμβάνει την ακινητοποίηση των ενζύμων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και την ανίχνευση του  $H_2O_2$  που παράγεται από την ενζυματική αντίδραση, χρησιμοποιώντας είτε βολταμμετρία είτε αμπερομετρία. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα των ενζυματικών αισθητήρων κρεατινίνης αφορούν το υψηλό κόστος των ενζύμων και την χαμηλή σταθερότητα των ενζύμων που επηρεάζεται από το pH, την ιονική ισχύ και τη θερμοκρασία. [44,47]



Εικόνα 6: α) Υδρόλυση κρεατινίνης με χρήση CA (αμιδοϋδρολάση της κρεατινίνης) και CI (την αμιδοϋδρολάση της κρεατίνης) στον αντιδραστήρα διενζύμου, β) υδρόλυση ουρίας και, γ) σχηματισμός H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από το σχήμα τριών σταδίων που καταλύεται από ένζυμα μέσω της SO<sub>x</sub> (οξειδάση της σαρκοζίνης). [τροπ. [59] ]

Ένας άλλος ενζυματικός αισθητήρας για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης είναι με την χρήση του ενζύμου απιμινάση κρεατινίνης, ο οποίος έχει αναφερθεί μέσω του επιπέδου ιόντων αμμωνίας με τη χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων αμμωνίας και συσκευής ευαίσθητης στο pH. Η ποσότητα αμμωνίας που απελευθερώνεται κατά την ενζυματική αντίδραση της απιμινάσης της κρεατινίνης, η οποία μετατρέπει την κρεατινίνη σε N-μεθυλ υδαντοΐνη παρουσία νερού και απελευθερώνει NH<sub>4</sub><sup>+</sup> που ανιχνεύεται είτε από αισθητήρες pH/ποτενσιομετρικά όπως αναφέρεται στην παρακάτω εικόνα. Το επίπεδο του NH<sub>4</sub><sup>+</sup> είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της κρεατινίνης. Ωστόσο, η ευαισθησία της αντίδρασης παρεμποδίζεται από το NH<sub>4</sub><sup>+</sup> που υπάρχει στο δείγμα αίματος και ούρων. [60]



Εικόνα 7: Η αμμωνία απελευθερώνεται κατά την ενζυματική αντίδραση της απιμινάσης της κρεατινίνης, η οποία μετατρέπει την κρεατινίνη σε N-μεθυλ υδαντοΐνη παρουσία νερού και απελευθερώνει NH<sub>4</sub><sup>+</sup> το οποίο ανιχνεύεται με pH/ποτενσιομετρικό αισθητήρα. [τροπ. [60] ]

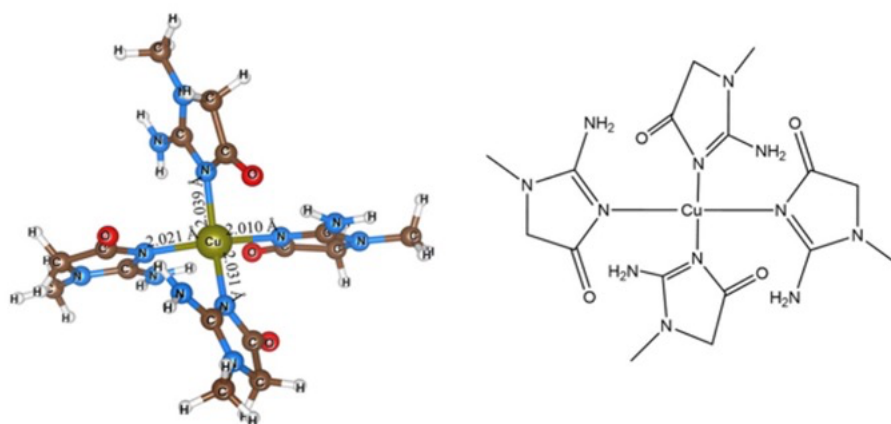
Η επιλεκτικότητα μπορεί να βελτιωθεί μέσω της χρήσης μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών, τα οποία μπορούν να παγιδεύσουν τον επιθυμητό στόχο μέσω των ειδικών κοιλοτήτων τους. [44] Μια άλλη προσέγγιση είναι η χρήση μιας μεθόδου παγίδευσης του ενζύμου μέσα σε ένα ειδικό υδατικό μέσο. [47]

Συμπερασματικά, οι προσεγγίσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας νέας κατηγορίας ηλεκτροχημικών αισθητήρων κρεατινίνης που έχουν ισχυρή σταθερότητα και δεν χρειάζονται ένζυμα, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα εξαιρετική εκλεκτικότητα και ευαισθησία. [47]

### **2.2.2.2 Μη ενζυματικοί αισθητήρες κρεατινίνης**

Για να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα των ενζυματικών αισθητήρων, υπάρχει ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων που βασίζονται σε μη ενζυματικούς ηλεκτροχημικούς αισθητήρες κρεατινίνης μέσω οξείδωσης σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια. Η ίδια η κρεατινίνη δεν εκδηλώνει ηλεκτροχημική δράση καθώς ταξινομείται ως ηλεκτροχημικά ανενεργή ουσία. [61] Διάφορα παραδείγματα μη ενζυματικών ηλεκτροχημικών αισθητήρων ανίχνευσης της κρεατινίνης βασίζονται στην εναπόθεση μετάλλων μεταπτώσεως ή οξειδία μετάλλων πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. [51] Η κρεατινίνη αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκα με διάφορα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, όπως Ag(I), Hg(II), Cd(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Pt(II) και Pd(II) καθώς διαθέτει αρκετές ομάδες δότες στην κύρια ταυτομερή της μορφή. [44] Έτσι, η δεσμευτική ιδιότητα της κρεατινίνης στις διάφορες μορφές της με οξειδοαναγωγικά ενεργά μεταλλικά κέντρα, από ευγενή μέταλλα έως μέταλλα μετάπτωσης, μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανίχνευσή της. [47] Στους περισσότερους μη ενζυμικούς ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, τα ενδοκυκλικά άτομα N στο μόριο της κρεατινίνης δρουν ως δότες ηλεκτρονίων κατά τη συμπλοκοποίηση με το μέταλλο μέσω χηλίωσης. Στη συνέχεια, αυτό το σύμπλοκο μπορεί να είναι είτε συσσωματωμένο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου είτε μπορεί να εκροφηθεί από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου για να σχηματιστεί ένα διαλυτό προϊόν αντίδρασης. [62] Ο σχηματισμός συμπλέγματος μετάλλου-κρεατινίνης οδηγεί σε αλλαγή στο ηλεκτροχημικό σήμα. Αυτή η αλλαγή στο σήμα, μπορεί να οφείλεται σε δύο εγγενώς διαφορετικές συμπεριφορές του συμπλέγματος κρεατινίνης-μετάλλου. Αρχικά, το σύμπλοκο μπορεί είτε να συσσωματωθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου,

με αποτέλεσμα να μειωθεί η ηλεκτροδραστική επιφάνειά του και άρα την μείωση του ρεύματος. [44] Δεύτερον, μπορεί να προκαλέσει μια ηλεκτροκαταλυτική αντίδραση, που περιλαμβάνει εκρόφηση ενός διαλυτού προϊόντος αντίδρασης, με αποτέλεσμα να εκθέτει φρέσκα στρώματα του μεταλλικού κέντρου στο ηλεκτρόδιο και να οδηγήσει σε αύξηση του ρεύματος. [47] Απλούστερα, το ρεύμα κορυφής μεταβάλλεται είτε αναλογικά είτε αντιστρόφως ανάλογα της τάσης του συμπλόκου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, είτε να αφήνει το ηλεκτρόδιο ως διαλυτό σύμπλοκο είτε να προκαλεί συσσωμάτωση μειώνοντας, έτσι, την ηλεκτροενεργή επιφάνεια. [47] Ωστόσο, αυτή η ηλεκτροκαταλυτική διαδικασία εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως οι ευνοϊκές ηλεκτρονικές καταστάσεις του οξειδοαναγωγικού κέντρου και η παρουσία μη συμπληρωμένων d-τροχιακών των κέντρων των μετάλλων μετάπτωσης. Γενικά η συγγένεια του συμπλόκου μετάλλου-κρεατινίνης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόβλεψη της σχέσης μεταξύ του ηλεκτροχημικού σήματος και της συγκέντρωσης κρεατινίνης. Το οξείδιο του χαλκού (CuO) χαρακτηρίζεται ως ένα ελκυστικό υλικό για τον προσδιορισμό κρεατινίνης μέσω σχηματισμού συμπλόκου Cu-κρεατινίνης, λόγω της χαμηλής τοξικότητάς του, της μεγάλης ειδικής επιφάνειας, της υψηλής ηλεκτροκαταλυτικής δραστηριότητας και της υψηλής ευαισθησίας στην κρεατινίνη. [51]



Εικόνα 8: Υπολογιστικά βελτιστοποιημένη δομή (αριστερά) και απλή 2D χημική δομή (δεξιά) του Cu(II) σε σύμπλοκο με την κρεατινίνη. [63]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

### 3.1 Εισαγωγή στην ηλεκτροχημεία

Ένα τμήμα της αναλυτικής χημείας αξιοποιεί ηλεκτρικές μετρήσεις χημικών διεργασιών στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου για αναλύσεις. Η μέθοδος της ποτενσιομετρίας, οι τιτλοδοτήσεις με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, η ηλεκτροσταθμική και κουλομετρική ανάλυση, καθώς και η βολταμμετρία και η αμπερομετρία ανήκουν στις τεχνικές που εφαρμόζονται στην ηλεκτροχημεία. Η ηλεκτροχημεία αποτελεί σημαντικό κλάδο της χημείας, καθώς περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων και στοιχείων. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των χημικών ενώσεων αποτελείται από ιόντα, τα οποία δημιουργούν ηλεκτρισμό μέσω χημικών αντιδράσεων. Επομένως, η κύρια έρευνα της ηλεκτροχημείας επικεντρώνεται στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που προκύπτουν κατά τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος (ηλεκτρόλυση) ή σε αυτές που παράγουν ηλεκτρισμό (ηλεκτροχημικά στοιχεία ή μπαταρίες). Ο ηλεκτρισμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη χημεία, καθώς μας επιτρέπει να κατανοήσουμε και να μελετήσουμε τον τρόπο σύνθεσης διαφορετικών ουσιών. [64]

Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην αντίδραση του ηλεκτροχημικού στοιχείου, είτε αυτή είναι αυθόρμητη (γαλβανικό στοιχείο) είτε εξαναγκασμένη (ηλεκτρολυτικό στοιχείο), υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Σε αυτές τις διαδικασίες εναλλαγής ενέργειας, το ηλεκτροχημικό σύστημα εκτελεί είτε παραγωγή ενέργειας είτε κατανάλωσής της, ανάλογα με την εφαρμογή. Το ηλεκτροχημικό σύστημα περιλαμβάνει έναν ηλεκτρολύτη που διευκολύνει την ροή του ηλεκτρικού ρεύματος, τουλάχιστον δύο ηλεκτρόδια (ηλεκτρικούς αγωγούς) για τη μεταφορά του ηλεκτρισμού, καθώς και ένα κύκλωμα μέτρησης ή ένα εξωτερικό κύκλωμα για την καταγραφή και την ανάλυση των ηλεκτρικών σημάτων. Τα ηλεκτρόδια, τα οποία βυθίζονται σε διάλυμα ενός κατάλληλου ηλεκτρολύτη, λειτουργούν ως η κάθοδος και η άνοδος του ηλεκτροχημικού στοιχείου, με τις αντίστοιχες αναγωγικές και οξειδωτικές αντιδράσεις να συμβαίνουν στην κάθοδο και την άνοδο αντίστοιχα. [64,65]



Το γαλβανικό ή βολταϊκό στοιχείο λειτουργεί χρησιμοποιώντας μια αυτόματη χημική αντίδραση που παράγει ηλεκτρισμό, όπου  $\Delta G < 0$ . Για να επιτευχθεί αυτό, ένα αντιδραστήριο ανάγεται, ενώ ένα άλλο οξειδώνεται. Είναι σημαντικό τα δύο αντιδραστήρια να μη βρίσκονται σε άμεση επαφή, καθώς αυτό θα οδηγούσε σε άμεση ροή ηλεκτρονίων από το αναγωγικό στο οξειδωτικό μέσο. Αν βρίσκονται σε διαφορετικούς χώρους, τα ηλεκτρόνια αναγκάζονται να ρέουν μέσω ενός εξωτερικού κυκλώματος για να μεταφερθούν από το αναγωγικό στο οξειδωτικό αντιδραστήριο. Παραδείγματα γαλβανικών στοιχείων περιλαμβάνουν τις μπαταρίες και τα ενεργειακά στοιχεία, τα οποία χρησιμοποιούν τα αντιδρώντα τους για την παραγωγή ηλεκτρισμού. Η μπαταρία αποτελείται από έναν κλειστό χώρο γεμάτο με τα αντιδρώντα. Σε ένα ενεργειακό στοιχείο, τα αντιδρώντα ρέουν προς τα ηλεκτρόδια, ενώ τα προϊόντα απομακρύνονται συνεχώς από το στοιχείο. Η συνολική αντίδραση αποτελείται από μία οξείδωση και μία αναγωγή, οι οποίες ονομάζονται ημιαντιδράσεις. [64,65,66]

Σε αντίθεση με τα γαλβανικά στοιχεία, όπου παρατηρείται μια αυθόρμητη οξειδοαναγωγική αντίδραση, τα ηλεκτρολυτικά στοιχεία εκτελούν μια μη αυθόρμητη οξειδοαναγωγική αντίδραση ( $\Delta G > 0$ ) με τη χρήση κατάλληλης εξωτερικής πηγής ενέργειας, μετατρέποντας την ηλεκτρική ενέργεια σε χημική. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται η τάση της εξωτερικής πηγής να είναι υψηλότερη από την τάση που θα παράγεται στο γαλβανικό στοιχείο, η οποία προκύπτει από τον συνδυασμό των δύο ημιστοιχείων. Κατά τη μετάβαση από γαλβανικό στοιχείο σε ηλεκτρολυτικό, η ροή των ηλεκτρονίων αλλάζει κατεύθυνση, κάνοντας την άνοδο να μετατρέπεται σε κάθοδο και την κάθοδο σε άνοδο. Αυτό σημαίνει ότι η πολικότητα του συστήματος αντιστρέφεται. Το ηλεκτρόδιο με τη μικρότερη αλγεβρική τιμή του δυναμικού συνδέεται με τον αρνητικό πόλο (-) της εξωτερικής πηγής και λειτουργεί ως κάθοδος (με αναγωγή μέσω της κατάλληλης εξωτερικής πηγής) ενώ το ηλεκτρόδιο με τη μεγαλύτερη αλγεβρική τιμή του δυναμικού συνδέεται με το θετικό πόλο (+) της πηγής και λειτουργεί ως άνοδος (με οξείδωση). Τόσο στα γαλβανικά όσο και στα ηλεκτρολυτικά στοιχεία, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω του εξωτερικού κυκλώματος, ενώ στον ηλεκτρολυτικό αγωγό παρατηρείται μετακίνηση ιόντων. [64,65,66]

Οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές μπορούν να καταταχθούν με κριτήριο την ιδιότητα που μετριέται και την ιδιότητα που υπόκεινται σε έλεγχο, όπως φαίνεται και στον πίνακα παρακάτω: [64]

Πίνακας 2: Ταξινόμηση ηλεκτροχημικών τεχνικών. [64]

Όνομασία τεχνικής	Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος	Μετρούμενη φυσική ιδιότητα
Ποτενσιομετρία	$i=0$	E
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση	$i=0$	E προς V
Χρονοποτενσιομετρία	I	E προς t
Βολταμμετρία	E	i προς E
Πολαρογραφία	E	i προς E
Αμπερομετρική ογκομέτρηση	E	i προς V
Αναδιαλυτική βολταμμετρία	E	i προς E
Κουλομετρία	i ή E	Ποσότητα ηλεκτρισμού
Κουλομετρική ογκομέτρηση	I	T
Ηλεκτροσταθμική ανάλυση	i ή E	Βάρος αποτιθέμενης ουσίας
Αγωγιμομετρία	E(AC)	1/R
Αγωγιμομετρική ογκομέτρηση	E(AC)	1/R προς V

όπου i: ένταση ρεύματος, E: δυναμικό, V: όγκος πιλοδότη, t: χρόνος, AC: εναλλασσόμενο ρεύμα, 1/R: αγωγιμότητα

Τα κύρια πλεονεκτήματα των ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών περιλαμβάνουν τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, την εξειδίκευση σε συγκεκριμένες οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, το χαμηλό κόστος, καθώς και την ικανότητα προσδιορισμού ποικίλων ενώσεων σε διάφορα δείγματα. [65]

### 3.2 Εισαγωγή στη βολταμμετρία

Οι βολταμμετρικές τεχνικές ανήκουν σε ένα είδος ηλεκτροαναλυτικών μεθόδων, οι οποίες βασίζονται στην παρακολούθηση της σχέσης μεταξύ της έντασης του ρεύματος (i) και του εφαρμοζόμενου δυναμικού (E) στο ηλεκτρόδιο εργασίας κατά τη διάρκεια μιας ηλεκτροχημικής διαδικασίας. Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό τόσο ανόργανων όσο και οργανικών ενώσεων,

συμπεριλαμβανομένων και ουσιών με βιολογική και βιοχημική σημασία. Γενικά, οι μετρήσεις σε αυτές τις τεχνικές πραγματοποιούνται σε συνθήκες που επιτρέπουν την πόλωση του ηλεκτροδίου εργασίας, όπως η μικρή επιφάνειά του. [64,65]

Η πολωρογραφία είχε ευρεία χρήση, κυρίως λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων του ηλεκτροδίου υδραργύρου, που περιλάμβαναν την ανανεώσιμη επιφάνειά του και το ευρύ φάσμα καθοδικού δυναμικού. Μετά το 1973, η χρήση αυτής της μεθόδου μειώθηκε σημαντικά, εκτός από ειδικές εφαρμογές όπως ο προσδιορισμός μοριακού οξυγόνου σε διαλύματα. Αυτό οφειλόταν κυρίως στην τοξικότητα του υδραργύρου και στις ανησυχίες για τις επιπτώσεις του στην υγεία και το περιβάλλον. [64,65,67]

### 3.3 Δυναμικό ηλεκτροδίου

Σε κάθε ηλεκτροχημικό στοιχείο, υποθέτουμε την ύπαρξη δύο ημιαντιδράσεων που συνθέτουν τη συνολική αντίδραση. Κάθε μία από αυτές τις ημιαντιδράσεις καθορίζεται από ένα δυναμικό ηλεκτροδίου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σημασία έχει η σχετική τιμή, δηλαδή η μετρούμενη τιμή σε σχέση με το δυναμικό ενός άλλου ηλεκτροδίου, το οποίο ονομάζεται ηλεκτρόδιο αναφοράς, και όχι η απόλυτη τιμή του δυναμικού του ηλεκτροδίου. Επομένως, για την ημιαντίδραση:  $M^{n+} + n e^- \rightleftharpoons M$ , όπου

M αναπαριστά ένα μέταλλο. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου του μετάλλου M, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με διάλυμα ιόντων  $M^{n+}$  με ενεργότητα  $a^{n+}$ , μπορεί να προσδιοριστεί από την εξίσωση Nernst:

$$E = E_{M^{n+},M}^0 - \frac{RT}{nF} * \ln \frac{a_M}{a_{M^{n+}}}$$

όπου  $E^0$ : το κανονικό δυναμικό του ηλεκτροδίου (σε V

R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων (ίση με  $8,314 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),

n: ο αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην ημιαντίδραση (σε  $\text{eq mol}^{-1}$ ), T: η απόλυτη θερμοκρασία (σε K),

F: η σταθερά Faraday (ίση με  $96485.38 \text{ C} \cdot \text{eq}^{-1}$ ),

$a_M$ : η ενεργότητα του μετάλλου M στην στερεά φάση (συμβατικά ίση με 1)

$a_{M^{n+}}$ : η ενεργότητα των ιόντων  $M^{n+}$ . [64,65]

Το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου, όπως φαίνεται και από την εξίσωση Nernst, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την ενεργότητα των ιόντων στο διάλυμα, καθώς και από άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα, όπως η φύση του διαλύτη, η ιονική ισχύς του διαλύματος, η παρουσία συμπλεκτικών μέσων, κ.λπ. Το κανονικό δυναμικό ( $E^0$ ) πολλών ημιαντιδράσεων έχει υπολογιστεί από άμεσες μετρήσεις τάσεων σε στοιχεία όπου το δεύτερο ηλεκτρόδιο ήταν ένα πρότυπο ηλεκτρόδιο αναφοράς, όπως για παράδειγμα το ηλεκτρόδιο υδρογόνου. [64]

Η μέτρηση του δυναμικού ενός στοιχείου σύμφωνα με τη σύμβαση της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) πραγματοποιείται συνήθως σύμφωνα με τον κανόνα "συν/δεξιά", όπου ο θετικός ακροδέκτης του βολτόμετρου συνδέεται με το δεξιό ηλεκτρόδιο του στοιχείου και ο κοινός (ή γειωμένος) ακροδέκτης με το αριστερό ηλεκτρόδιο. Με βάση αυτήν την σύμβαση, η τάση του στοιχείου υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ των δυναμικών των δύο ημιστοιχείων, δηλαδή  $E_{\text{στοιχ}} = E_{\text{δεξιά}} - E_{\text{αριστερό}}$ , όπου  $E_{\text{δεξιά}}$  και  $E_{\text{αριστερό}}$ , είναι τα δυναμικά των ηλεκτροδίων των δύο ημιαντιδράσεων που συνθέτουν το στοιχείο. Ωστόσο, ο παραπάνω τρόπος υπολογισμού του δυναμικού είναι θεωρητικός και ισχύει μόνο όταν το στοιχείο διαρρέεται από πρακτικά μηδενικό ρεύμα. Σε περιπτώσεις όπου το στοιχείο διαρρέεται από ρεύμα, οι μετρούμενες τιμές του δυναμικού μπορεί να αποκλίνουν από τις θεωρητικές λόγω φαινομένων όπως η ωμική αντίσταση και η πόλωση των ηλεκτροδίων. [65]

Για να επιτευχθεί η ροή του ρεύματος σε ένα στοιχείο, είτε πρόκειται για γαλβανικό είτε για ηλεκτρολυτικό στοιχείο, απαιτείται η αντιστάθμιση της αντίστασης των ιόντων κατά την κίνησή τους προς την άνοδο και την κάθοδο. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μιας τάσης, η οποία ονομάζεται πτώση Ohm ή πτώση IR. Η τιμή αυτού του δυναμικού δίνεται από τον νόμο του Ohm και είναι το γινόμενο του ρεύματος (I) επί της αντίστασης (R) του στοιχείου. Αυτή η πτώση IR προστίθεται ή αφαιρείται από το θεωρητικό δυναμικό του στοιχείου, ανάλογα με το αν αναφερόμαστε σε γαλβανικό ή ηλεκτρολυτικό στοιχείο, με βάση την παρακάτω εξίσωση:  $E_{\text{στοιχ}} = E_{\text{δεξιά}} - E_{\text{αριστερό}} - IR$ ,

όπου  $E_{\text{δεξιά}}$  και  $E_{\text{αριστερό}}$  είναι τα δυναμικά ηλεκτροδίου των δύο ημιαντιδράσεων που συνιστούν το στοιχείο, I το ρεύμα σε Amperes και R η αντίσταση του ηλεκτρολύτη στη ροή του ρεύματος σε Ohm. [65]

Η πτώση Ohm μπορεί να περιοριστεί με διάφορους τρόπους, όπως μείωση του μεγέθους του ηλεκτροδίου εργασίας, αύξηση της αγωγιμότητας του διαλύματος μέσω

υψηλών συγκεντρώσεων ηλεκτρολύτη, και μείωση της απόστασης μεταξύ των ηλεκτροδίων. [68]

Στις ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές και στη βολταμετρία, συχνά μετράμε το ρεύμα του στοιχείου ως συνάρτηση της τάσης και κατασκευάζουμε τις καμπύλες του ρεύματος ως προς την τάση. Αν και η εξίσωση του νόμου του Ohm προβλέπει μια γραμμική σχέση μεταξύ της τάσης και του ρεύματος, στην πραγματικότητα οι γραμμές ρεύματος-δυναμικό είναι συνήθως μη γραμμικές στις ακραίες τιμές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το στοιχείο ονομάζεται πολωμένο. Η πόλωση μπορεί να προκύψει είτε σε ένα είτε και στα δύο ηλεκτρόδια. Σε ένα ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο, το ρεύμα παραμένει σταθερό και ανεξάρτητο από την τάση σε ευρεία περιοχή τιμών. [65] Ωστόσο, όταν στο διάλυμα προστίθεται μια ηλεκτρενεργή ουσία, όπως ένας αποπολωτής, το ηλεκτρόδιο αποπολώνεται. [64]

Η πόλωση συνήθως αποτελεί πρόβλημα σε πολλά ηλεκτροχημικά συστήματα. Μπορεί να υπάρχουν δύο είδη πόλωσης: η πόλωση ενεργοποίησης και η πόλωση συγκέντρωσης. Η πόλωση ενεργοποίησης προκύπτει όταν το υπερδυναμικό οφείλεται στη βραδεία μετακίνηση ηλεκτρονίων λόγω αδράνειας του χημικού συστήματος. Αντίθετα, η πόλωση συγκέντρωσης προκύπτει όταν το υπερδυναμικό οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση του αποπολωτή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωση του στο κυρίως διάλυμα, λόγω αργής μετακίνησης του αποπολωτή προς το ηλεκτρόδιο. Μπορεί να υπάρχουν και οι δύο ταυτόχρονα. [64,65]

Όταν εμφανίζεται πόλωση σε ένα ηλεκτρολυτικό στοιχείο, απαιτείται μεγαλύτερο δυναμικό από το αναμενόμενο για να επιτευχθεί δεδομένη τιμή ρεύματος, ενώ σε ένα γαλβανικό στοιχείο απαιτείται μικρότερο. Η υπέρταση είναι ένα μέτρο της πόλωσης ενός ηλεκτροδίου, η οποία ισούται με τη διαφορά μεταξύ του πραγματικού δυναμικού του ηλεκτροδίου και του δυναμικού ισορροπίας. [65] Εάν η ηλεκτροδιακή αντίδραση γινόταν με άπειρη ταχύτητα, θα ήταν εφικτό να τραβήξουμε ρεύμα χωρίς αυτό να προκαλέσει την εμφάνιση υπερδυναμικού στο ηλεκτρόδιο. Στην περίπτωση αυτή, το ηλεκτρόδιο αυτό θα ήταν 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. [64]

### 3.4 Ηλεκτροδιακές διεργασίες

Οι ηλεκτροδιακές διεργασίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της διεπιφάνειας του ηλεκτροδίου-διαλύματος: φαρανταϊκές και μη φαρανταϊκές. [64,65]

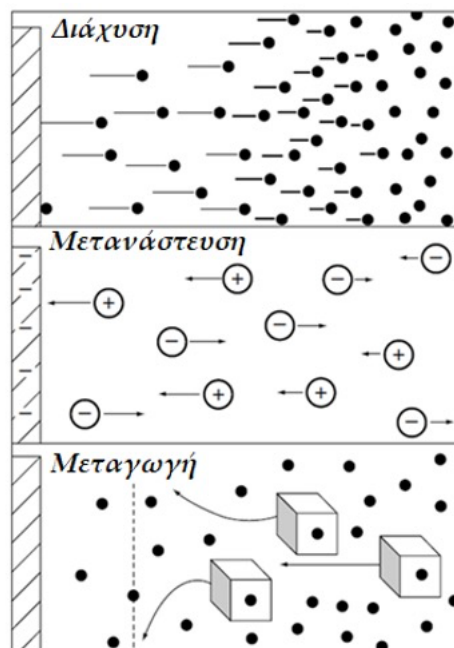
Το φαρανταϊκό ρεύμα αναφέρεται στο ρεύμα που προκύπτει από την ανταλλαγή ηλεκτρικού φορτίου μεταξύ των ηλεκτροδίων και της ύλης που τα περιβάλλει. Αυτό το ρεύμα προκαλείται από αντιδράσεις οξειδωσης ή αναγωγής των ηλεκτροενεργών ουσιών στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Η ποσότητα του φαρανταϊκού ρεύματος σχετίζεται άμεσα με το συνολικό φορτίο που διέρχεται ( $Q$ ) και τον συνολικό αριθμό των χημικών ισοδυνάμων ( $eq$ ) των ηλεκτροενεργών ουσιών που συμμετέχουν στην ημιαντίδραση στο ηλεκτρόδιο, σύμφωνα με το νόμο του Faraday. [64,65]

Οι φαρανταϊκές διεργασίες αναφέρονται σε αυτές όπου η οξειδωση ή η αναγωγή συμβαίνει λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων, σύμφωνα με το νόμο του Faraday. Αυτό σημαίνει ότι η ποσότητα της ουσίας που υφίσταται οξειδωση ή αναγωγή στο ηλεκτρόδιο είναι ανάλογη της ποσότητας του ηλεκτρισμού που περνά από το διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια σε αυτές τις διεργασίες ονομάζονται ηλεκτρόδια μεταφοράς φορτίου και το ρεύμα που παρατηρείται είναι το φαρανταϊκό ρεύμα (faradaic current),  $iF$ . Από την άλλη πλευρά, στις μη φαρανταϊκές διεργασίες, η μεταφορά των ηλεκτρονίων δεν συμβαίνει εύκολα θερμοδυναμικά ή κινητικά. Ωστόσο, κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως αλλαγές στο δυναμικό, τη σύνθεση του διαλύματος και την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, μπορεί να παρατηρηθεί διέλευση ρεύματος. Αυτό το ρεύμα ονομάζεται χωρητικό ρεύμα (capacitive current),  $iC$ , και αυξάνεται με τη συχνότητα και την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στις τεχνικές βολταμμετρίας, το συνολικό ρεύμα που μετράται είναι ο συνδυασμός του χωρητικού και του φαρανταϊκού ρεύματος ( $iF + iC$ ), αλλά μόνο το φαρανταϊκό ρεύμα,  $iF$ , περιέχει την αναλυτική πληροφορία. [64,65]

### 3.5 Τρόποι μεταφοράς μάζας

Οι μηχανισμοί που επιτρέπουν τη μετακίνηση ηλεκτρενεργών ουσιών από το κύριο διάλυμα προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου περιλαμβάνουν τους παρακάτω τρεις:

1. Όδευση (ή μετανάστευση): Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη κίνηση φορτισμένων σωματιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο προκύπτει από τη βαθμίδωση του ηλεκτρικού δυναμικού.
2. Μεταγωγή (ή φυσική ροή): Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει τη μη υδροδυναμική μεταφορά σωματιδίων λόγω της βαθμίδωσης της πυκνότητας ή της εξαναγκασμένης μεταφοράς, για παράδειγμα μέσω ανάδευσης.
3. Διάχυση: Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αυθόρμητη κίνηση σωματιδίων λόγω της βαθμίδωσης της συγκέντρωσής τους, καθώς μετακινούνται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλότερης συγκέντρωσης. [64,65,67,68]



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των 3 τρόπων μεταφοράς μάζας: διάχυση, μετανάστευση και μεταγωγή. [67]

Σε συνθήκες όπου η μεταφορά μάζας του αναλύτη προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου γίνεται αποκλειστικά με διάχυση, η ροή μάζας της ηλεκτρενεργής ουσίας δίνεται από τον πρώτο νόμο διάχυσης του Fick δηλαδή από την εξής εξίσωση:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$$

όπου J: η ροή μάζας (σε mol cm<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>),

D: ο συντελεστής διάχυσης (cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>)

[∂C(x,t)]/∂x: η βαθμίδα συγκέντρωσης (σε mol cm<sup>-3</sup> / cm) σε απόσταση x και χρόνο t.

Σε υδατικά διαλύματα, ο συντελεστής διάχυσης (D) συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Επομένως, το ρεύμα είναι ανάλογο της βαθμίδας της συγκέντρωσης των ηλεκτρενεργών ουσιών (ανά πάσα στιγμή) και δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$i = nFAD \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$$

όπου i: το ρεύμα (σε ampere),

n: ο αριθμός των ηλεκτρονίων ανά σωματίδιο (eq·mol<sup>-1</sup>),

F: η σταθερά Faraday (ίση με 96485 C·eq<sup>-1</sup>),

A: η επιφάνεια του ηλεκτροδίου (cm<sup>2</sup>),

D: ο συντελεστής διάχυσης του σωματιδίου (cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>)

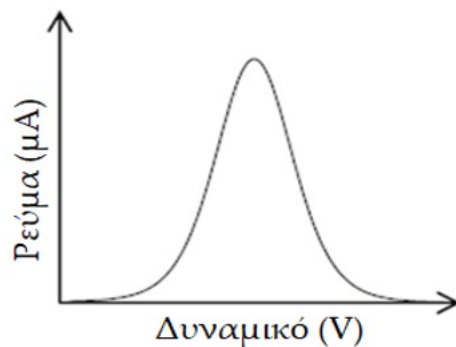
C: η συγκέντρωση της ηλεκτρενεργής ουσίας (mol·cm<sup>-3</sup>) [67]

### 3.6 Βολταμμογράφημα

Το βολταμμογράφημα αποτελεί τη γραφική αναπαράσταση του ηλεκτρικού ρεύματος που διαπερνά ένα ηλεκτρολυτικό στοιχείο, σε σχέση με το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Κατά τη βολταμμετρία, χρησιμοποιείται ένα σήμα διέγερσης μεταβλητού δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας του ηλεκτροχημικού στοιχείου, προκαλώντας μια χαρακτηριστική ανταπόκριση ηλεκτρικού ρεύματος, η οποία αποτελεί τη βάση της τεχνικής. [65] Ένα συνηθισμένο είδος βολταμμογραφήματος είναι η κορυφή, η οποία παρουσιάζεται στην εικόνα 10. [69]

Από το βολταμμογράφημα, εκτελείται ο ποιοτικός προσδιορισμός (ταυτοποίηση) του προσδιοριζόμενου συστατικού με βάση το δυναμικό κορυφής. Με βάση επίσης το ρεύμα κορυφής, δηλαδή το ύψος της κορυφής που αντιστοιχεί στο μέγιστο ρεύμα και είναι συνήθως ανάλογο της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού, γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του προσδιοριζόμενου συστατικού. [65]





Εικόνα 10: Τυπική μορφή βολταμμογραφήματος. [69]

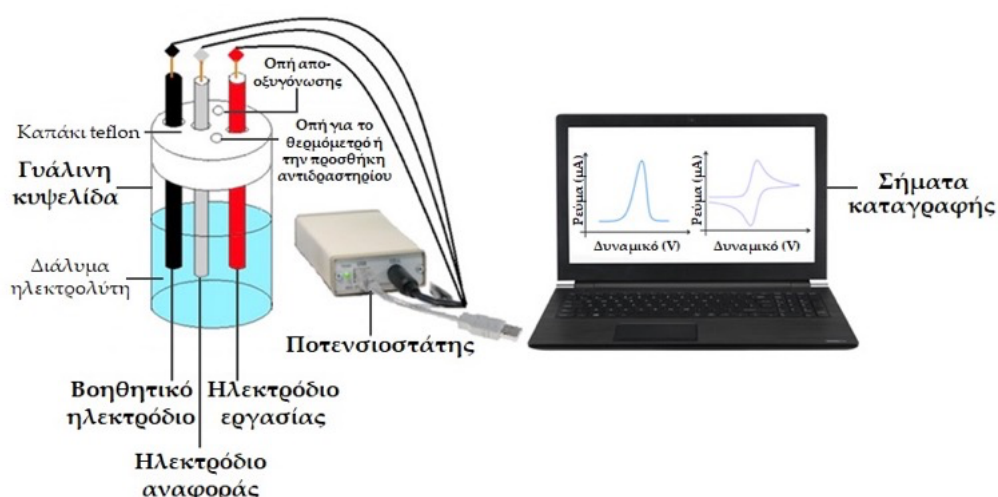
Τα βολταμμογραφήματα συχνά επηρεάζονται από το pH του διαλύματος. Ιδιαίτερα σε ηλεκτροχημικές διαδικασίες όπου υπάρχει κατανάλωση ή παραγωγή ιόντων υδρογόνου, μη καλά ρυθμισμένο διάλυμα μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στο pH κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του δυναμικού αναγωγής της αντίδρασης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη βέλτιστων κορυφών στο βολταμμογράφημα. Επιπλέον, η εξάρτηση της ηλεκτροχημικής διαδικασίας από το pH μπορεί να οδηγήσει σε μη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του ρεύματος διάχυσης/συγκέντρωσης. Συνεπώς, ο εύρυθμος έλεγχος του pH, ιδίως σε οργανικές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις, είναι συχνά αναγκαίος για την αξιόπιστη απόκτηση αποτελεσμάτων. [65]

### 3.7 Οργανολογία βολταμμετρίας

Το ηλεκτροχημικό στοιχείο απαρτίζεται από τουλάχιστον δύο ηλεκτρόδια που βρίσκονται εντός ενός διαλύματος. Αυτό το διάλυμα περιέχει τον αναλύτη και ένα αδρανές φέρον ηλεκτρολύτη. Αρχικά, η βολταμμετρία πραγματοποιούνταν με ένα σύστημα που περιλάμβανε μόνο δύο ηλεκτρόδια: το ηλεκτρόδιο εργασίας και ένα μεγάλο μεταλλικό ηλεκτρόδιο, που λειτουργούσε ως δεύτερο ηλεκτρόδιο προκειμένου να αποφεύγεται η πόλωσή του κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αυτό το διπλό σύστημα ηλεκτροδίων έχει πλέον αντικατασταθεί από ένα σύστημα με τρία ηλεκτρόδια. Σε αυτό το σύστημα, χρησιμοποιούνται τρία ηλεκτρόδια: το ηλεκτρόδιο εργασίας, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Το δεύτερο ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιούνταν στα πρώτα στάδια ήταν ουσιαστικά ένας

συνδυασμός των λειτουργιών του ηλεκτροδίου αναφοράς και του βοηθητικού ηλεκτροδίου. [65]

Στο ηλεκτρόδιο εργασίας (WE), το δυναμικό μεταβάλλεται με τον χρόνο και αποτελεί το ηλεκτρόδιο όπου πραγματοποιείται η ελεγχόμενη ή παρακολουθούμενη ηλεκτροδιακή αντίδραση. Επιλέγονται μικρές διαστάσεις για το ηλεκτρόδιο εργασίας, έτσι ώστε να ευνοείται η πόλωση συγκέντρωσης της τάσης του. Στο δεύτερο ηλεκτρόδιο, το ηλεκτρόδιο αναφοράς (RE), το δυναμικό παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης και είναι ανεξάρτητο από τη σύσταση του διαλύματος. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς συνήθως χρησιμοποιείται το κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανα (SCE) ή το ηλεκτρόδιο αργύρου-χλωριούχου αργύρου (Ag-AgCl). Το τρίτο ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιείται είναι το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (CE), το οποίο χρησιμοποιείται απλώς για την αγωγή του ηλεκτρισμού από την πηγή του σήματος (γεννήτρια δυναμικού σάρωσης) μέσω του διαλύματος προς το ηλεκτρόδιο εργασίας. Συνήθως, είναι ένα απλό σπείραμα σύρματος λευκοχρύσου. Το σήμα εξόδου από την πηγή εισάγεται σε έναν ποτενσιοστάτη, ο οποίος είναι ένα ηλεκτρονικό σύστημα που διατηρεί το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας σταθερό ως προς το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου αναφοράς. [65] Με τον ποτενσιοστατικό έλεγχο του ηλεκτροδίου εργασίας ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα που οφείλονται στην αντίσταση των κυψελίδων. <sup>67</sup> Επιπλέον, απαιτείται ένας υπολογιστής για την καταγραφή και παρουσίαση των ηλεκτρικών σημάτων. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα τμήματα της απαιτούμενης οργανολογίας των βολταμετρικών τεχνικών. [70]



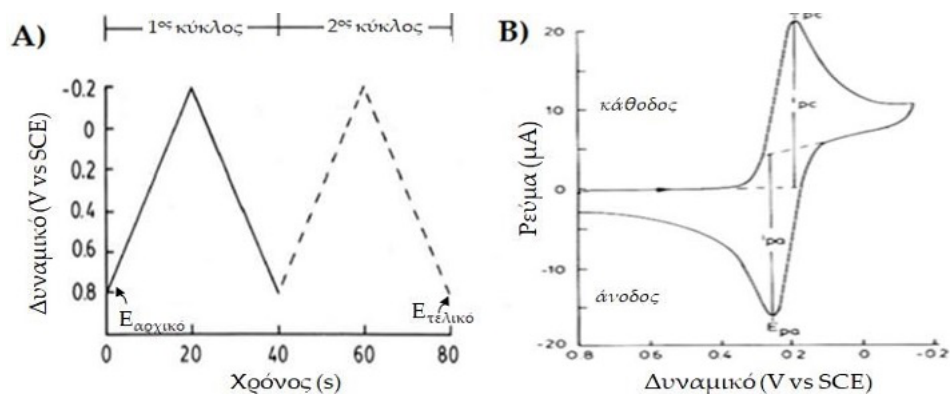
Εικόνα 11: Οργανολογία βολταμετρικών μετρήσεων. [τροπ. [70] ]

Οι μετρήσεις στη βολταμμετρία πραγματοποιούνται σε ηλεκτροχημικές κυψέλες, όπου ενσωματώνονται τα τρία ηλεκτρόδια. Αυτές οι κυψέλες μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος, ικανότητα ελέγχου θερμοκρασίας, απαιτήσεις ανάδευσης, σχήμα ή αριθμό διαμερισμάτων. Συνήθως, έχουν όγκο από 1 έως 50 mL, κατασκευάζονται από γυαλί και χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του διαλύματος. Άλλα υλικά κατασκευής των κυψελών είναι ο χαλαζίας και το Teflon. Τα απαραίτητα όργανα είναι σχετικά φθηνά και εύκολα διαθέσιμα στην αγορά, γεγονός που αποτελεί ακόμα ένα πλεονέκτημα της βολταμμετρίας (και γενικά των ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών). [67]

### 3.8 Κυκλική βολταμμετρία

Κατά τη διάρκεια της κυκλικής βολταμμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV), το ηλεκτρόδιο εργασίας υφίσταται έναν επαναλαμβανόμενο κύκλο δυναμικού μεταξύ προκαθορισμένων τιμών σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Αυτό συνοδεύεται από την καταγραφή του ρεύματος που διαρρέει το στοιχείο. Συγκεκριμένα, μια γραμμική σάρωση δυναμικού εκτελείται με τριγωνική μορφή, ξεκινώντας από μια αρχική τιμή ( $E_{\text{αρχικό}}$ ) και καταλήγοντας σε μια τελική τιμή ( $E_{\text{τελικό}}$ ). Στη συνέχεια, η κατεύθυνση της σάρωσης αντιστρέφεται, παράγοντας το γράφημα του ρεύματος έναντι του δυναμικού που προκύπτει, γνωστό ως κυκλικό βολταμμογράφημα. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα συνήθως εκτελούνται υπό συνθήκες που επιτρέπουν τη μεταφορά μάζας μόνο μέσω της διάχυσης, όπως ένα στατικό διάλυμα. Το συγκεκριμένο σχήμα και τα χαρακτηριστικά του κυκλικού βολταμμογραφήματος μπορεί να ποικίλουν, κυρίως επηρεαζόμενα από την αντιστρεπτικότητα της ημιαντίδρασης του ηλεκτροδίου. Για αντιστρεπτές ηλεκτροδιακές αντιδράσεις, τα ρεύματα των ανοδικών και καθοδικών κορυφών είναι περίπου ίσα σε απόλυτη τιμή και με αντίθετο πρόσημο. [65,71]

Ένα κυκλικό βολταμμογράφημα χαρακτηρίζεται ως πηγή πληροφοριών στην ηλεκτροχημεία, καθώς μπορούν να εξαχθούν από αυτό πληροφορίες για το βολταμμετρικό προφίλ μιας ένωσης. Στην εικόνα 12 απεικονίζεται ένα τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα μιας πλήρως αντιστρεπτής ημιαντίδρασης. [71]



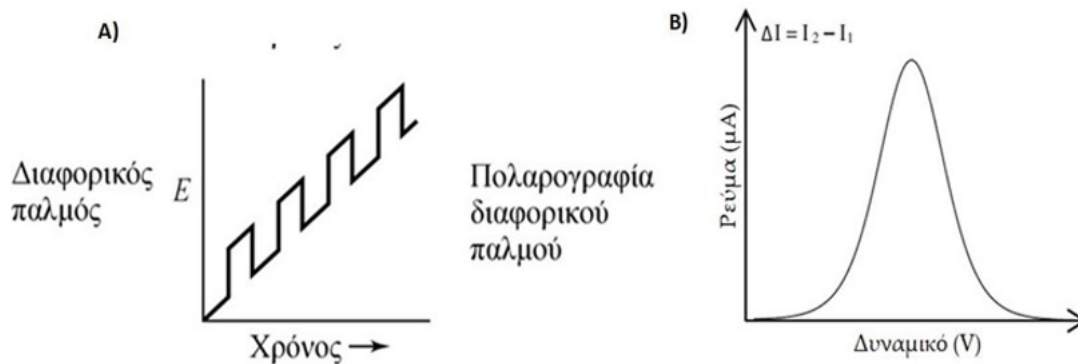
Εικόνα 12: Α) Τριγωνικό σήμα διέγερσης που χρησιμοποιείται στην κυκλική βολταμετρία και Β) Απεικόνιση κυκλικού βολταμμογραφήματος. [71]

### 3.9 Παλμική βολταμετρία

Οι παλμικές βολταμετρικές τεχνικές εστιάζουν στο να μετρήσουν το ρεύμα κατά τη στιγμή που η απόκλιση μεταξύ του επιθυμητού φαρανταϊκού ρεύματος και του μη επιθυμητού φορτίου φόρτισης, γνωστού ως χωρητικό ρεύμα, είναι σημαντική. Στη βολταμετρία, χρησιμοποιούνται δύο βασικές τεχνικές παλμών: η διαφορική παλμική βολταμετρία και η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού. Αυτές οι τεχνικές έχουν αντικαταστήσει αποτελεσματικά την παραδοσιακή τεχνική λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας, της ευκολίας χρήσης και της επιλεκτικότητάς τους. [65]

#### 3.9.1 Διαφορική παλμική βολταμετρία

Η διαφορική παλμική βολταμετρία (DPV) είναι μια δημοφιλής τεχνική λόγω της ικανότητάς της να ξεχωρίζει το χωρητικό ρεύμα που απορροφάται από τη φόρτιση, βελτιώνοντας έτσι την ανίχνευση. Σε αυτήν την τεχνική, η κυματομορφή δυναμικού περιλαμβάνει σύντομους παλμούς (περίπου 60 ms) που εναλλάσσονται με μια γραμμική αλλαγή στο δυναμικό. Οι παλμοί αυτοί εφαρμόζονται μεταξύ σταθερών χρονικών διαστημάτων, και το ρεύμα μετρείται πριν και μετά από κάθε παλμό. Η ένταση του ρεύματος μετράται αμέσως πριν την εφαρμογή του παλμού ( $I_1$ ) και λίγο πριν το τέλος του παλμού ( $I_2$ ), και η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές εντάσεις ( $\Delta I = I_2 - I_1$ ) καταγράφεται ως απόκριση ρεύματος. Με αφαίρεση των δύο ρευμάτων, μειώνεται η συμβολή του φορτίου φόρτισης, επιτρέποντας πιο ακριβείς μετρήσεις. Η τεχνική αυτή απεικονίζεται στην εικόνα 13, όπου η καμπύλη της διαμορφώνεται έτσι ώστε η κορυφή της να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της μετρούμενης ουσίας. [65,69]



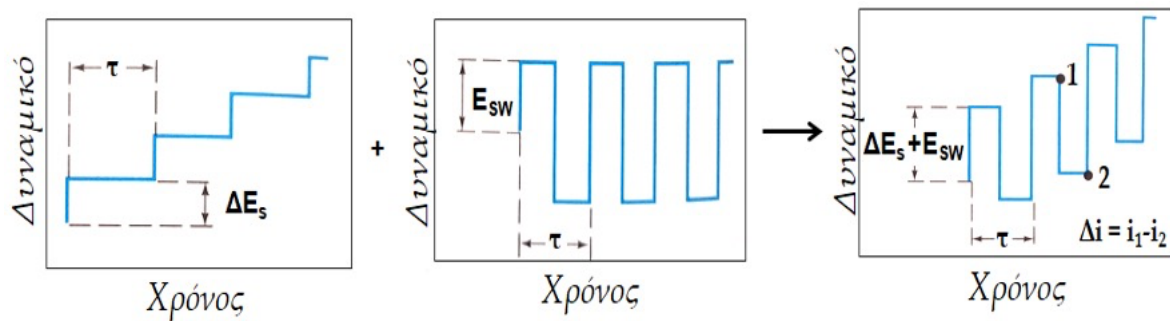
Εικόνα 13: Α) Απεικόνιση της κυματομορφής δυναμικού (E)-χρόνου για τη βολταμμετρία διαφορικού παλμού, Β) Τυπική μορφή βολταμμογραφήματος στην διαφορική παλμική βολταμμετρία. [69]

Η διαφορική παλμική βολταμμετρία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν η ικανότητα διάκρισης των κορυφών και η υψηλή ευαισθησία. Η αύξηση της ευαισθησίας προκύπτει από την αύξηση του επιθυμητού ρεύματος και την ταυτόχρονη μείωση του μη φαρανταϊκού ρεύματος (χωρητικό ρεύμα φόρτισης). Όταν ένας παλμός δυναμικού εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο, τόσο τα φαρανταϊκά όσο και τα μη φαρανταϊκά ρεύματα αυξάνονται απότομα καθώς αυξάνεται το ηλεκτρικό φορτίο. Ωστόσο, το μη-φαρανταϊκό ρεύμα με την πάροδο του χρόνου μειώνεται σταδιακά (εκθετικά), πλησιάζοντας τελικά το μηδέν. Κατά συνέπεια, κατά τη μέτρηση του ρεύματος σε αυτό το σημείο, το μη φαρανταϊκό ρεύμα μειώνεται σημαντικά, καθιστώντας το λόγο σήματος προς θόρυβο υψηλότερο και επιτυγχάνοντας καλύτερη ευαισθησία. [65]

### 3.9.2 Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού

Ένας άλλος δημοφιλής τύπος παλμικής τεχνικής στη βολταμμετρία είναι η βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (Square-Wave Voltammetry, SWV). Στην SWV, το σήμα διέγερσης αποτελείται από το άθροισμα παλμικού και κλιμακωτού σήματος, όπως φαίνεται στην εικόνα 14. Ένας παλμός ορθής φοράς (προς τις περισσότερες αρνητικές τιμές) παράγει ένα καθοδικό ρεύμα ( $i_1$ ), ενώ ένας παλμός αντίστροφης φοράς (προς τις θετικές τιμές) παράγει ένα ανοδικό ρεύμα ( $i_2$ ). Η διαφορά των δύο ρευμάτων ( $\Delta i = i_1 - i_2$ ) ως προς το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας παράγει το

βολταμογράφημα, το οποίο έχει παρόμοια μορφή με αυτό που λαμβάνεται από τη Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία (DPV). [65]



Εικόνα 14: Σήματα διέγερσης για την βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού. [65]

Η τεχνική της βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (SWV) χαρακτηρίζεται από αυξημένη ταχύτητα, καθώς απαιτεί λιγότερο από 10ms για ένα πλήρες βολταμογράφημα. Αυτό επιτρέπει τη λήψη πολλαπλών βολταμμετρικών σαρώσεων για ένα δείγμα σε σύντομο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα την αύξηση της ακρίβειας της ανάλυσης μέσω της χρήσης μέσων τιμών. Επιπλέον, η SWV παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται μεταξύ  $10^{-7}$  έως  $10^{-8}$  M. Αυτά τα χαρακτηριστικά της καθιστούν ιδανική για την εφαρμογή σε ανιχνευτές συστημάτων υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. [65]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ

### 4.1 Εισαγωγή

Το τυπικό σχήμα ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου περιλαμβάνει τρία διαφορετικά ηλεκτρόδια: το ηλεκτρόδιο εργασίας, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο. [65]

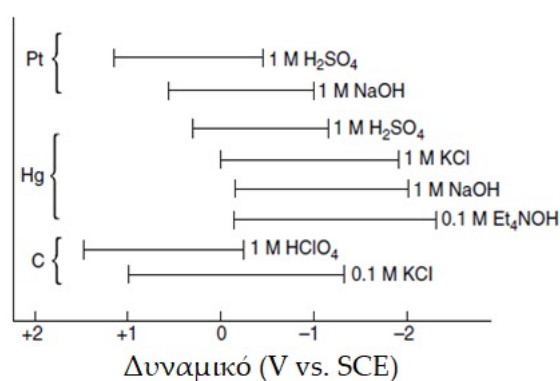
Το ηλεκτρόδιο εργασίας (WE), που είναι ουσιαστικά ο χώρος όπου διεξάγεται η ελεγχόμενη ή παρακολουθούμενη ηλεκτροχημική αντίδραση, μπορεί να παρουσιάζεται σε διάφορες μορφές και σχήματα. Συνήθως, αποτελείται από μικρούς επίπεδους δίσκους κατασκευασμένους από κάποιο αγώγιμο υλικό, οι οποίοι εφαρμόζονται με πίεση πάνω σε έναν κυλινδρικό φορέα από αδρανές υλικό, όπως το Teflon. Στον επιφανειακό αυτόν φορέα ενσωματώνεται ένα σύρμα που χρησιμοποιείται για την ηλεκτρική επαφή. [65]

Το αγώγιμο υλικό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή των ηλεκτροδίων εργασίας (WE) μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις απαιτήσεις της εφαρμογής. Μπορεί να πρόκειται για αδρανή μέταλλα, όπως ο λευκόχρυσος ή ο χρυσός, κάποια μορφή άνθρακα, όπως γραφιτική πάστα, ίνες άνθρακα, πυρολυτικός γραφίτης, υαλώδης άνθρακας, διαμάντι, νανοσωλήνες άνθρακα, ή κάποιος ημιαγωγός, όπως οξειδία του κασσιτέρου ή μέταλλο με επικάλυψη ενός λεπτού στρώματος υδραργύρου. Η επιλογή του υλικού εξαρτάται από παράγοντες όπως η επιθυμητή αντίδραση, η σταθερότητα και η αντοχή στις συνθήκες λειτουργίας. [65]

Πέρα από τις βασικές ιδιότητες, το υλικό που χρησιμοποιείται για τα ηλεκτρόδια εργασίας πρέπει να πληροί και ορισμένες άλλες κρίσιμες προϋποθέσεις. Είναι σημαντικό να είναι αδρανές έναντι του ηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται, να διαθέτει ευρύ φάσμα δυναμικού (γνωστό και ως παράθυρο δυναμικού), να έχει χαμηλό ρεύμα υποβάθρου και υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο, να επιδεικνύει αναπαραγωγίμη απόκριση και να είναι εύκολα αναγεννήσιμο, είτε με καθαρισμό είτε με γυάλισμα της επιφάνειάς του. [72]

Η επιλογή της περιοχής δυναμικού για τη χρήση κάθε ηλεκτροδίου σε υδατικά διαλύματα εξαρτάται τόσο από το υλικό κατασκευής όσο και από τη σύσταση του διαλύματος στο οποίο εφαρμόζεται. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, οι περιοχές

δυναμικών για τους διάφορους τύπους ηλεκτροδίων, όπως ανθρακικά (C), υδραργυρικά (Hg) και λευκοχρυσωμένα (Pt), ποικίλουν ανάλογα με τον φορέα ηλεκτρολύτη. Γενικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προς τις θετικές τιμές, οι οριακές τιμές του δυναμικού οφείλονται στα μεγάλα ρεύματα κατά την οξειδωση του νερού προς μοριακό οξυγόνο, ενώ προς τις αρνητικές τιμές, το δυναμικό περιορίζεται λόγω της αναγωγής του νερού προς υδρογόνο. [65,67]



Εικόνα 15: Περιοχές δυναμικών για 3 είδη υλικών ηλεκτροδίων (άνθρακα, υδραργύρου και λευκόχρυσου) σε διαφορετικούς φέροντες ηλεκτρολύτες. [67]

## 4.2 Ηλεκτρόδια υδραργύρου

Οι αρχικές βολταμετρικές τεχνικές χρησιμοποιούσαν ηλεκτρόδια εργασίας κατασκευασμένα από υδράργυρο (Hg). Αυτά τα ηλεκτρόδια αποτελούσαν ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για τη βολταμετρική ανάλυση λόγω των παρακάτω σημαντικών πλεονεκτημάτων τους:

- Ευρύ φάσμα καθοδικού δυναμικού: Τα ηλεκτρόδια Hg είχαν μεγάλο εύρος καθοδικού δυναμικού, κυμαινόμενο από +0,4V έως -2,5V, ανάλογα με τον φορέα ηλεκτρολύτη, λόγω του υψηλού υπερδυναμικού του υδρογόνου. [67,73,74]
- Αμαλγάματα με πολλά μέταλλα: Είχαν τη δυνατότητα σχηματισμού αμαλγαμάτων με πολλά μέταλλα, προκαλώντας αυξημένη ευαισθησία λόγω της αντιστρεπτικής οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς. [65,73,75]
- Προσρόφηση οργανικών ενώσεων: Είχαν τη δυνατότητα έντονης προσρόφησης οργανικών ενώσεων, διευκολύνοντας τη χρήση τους στην προσροφητική προσυγκέντρωση. [67]



- Εύκολη ανανέωση επιφάνειας: Μπορούσαν εύκολα να ανανεώνονται οι επιφάνειές τους. [67,73]
- Υψηλή ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα: Εξέφραζαν υψηλή ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα. [73]

Παρόλα αυτά, τα ηλεκτρόδια υδραργύρου παρουσιάζουν δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Το πρώτο είναι το στενό ανοδικό εύρος λόγω της οξειδωσης του υδραργύρου, που οδηγεί σε περιορισμένη χρήση τους στην οξειδωτική περιοχή δυναμικών. Επίσης, το δεύτερο σημαντικό μειονέκτημα είναι η υψηλή τοξικότητα του υδραργύρου. Οι δύο κύριοι τύποι ηλεκτροδίων του είναι τα ηλεκτρόδια κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου (HMDEs) και τα ηλεκτρόδια λεπτού στρώματος υδραργύρου (MFEs). [65,67,73]

Το ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου (HMDE) αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά ηλεκτρόδια για αναδιαλυτική και κυκλική βολταμμετρία. [67,73] Ένα βασικό πλεονέκτημά του είναι η εύκολη αναγέννηση της επιφάνειάς του με την απλή ανάπτυξη μιας νέας σταγόνας υδραργύρου. Με αυτόν τον τρόπο, αναιρείται η πιθανότητα "δηλητηρίασης" του ηλεκτροδίου, δηλαδή η δυσλειτουργία του λόγω κάλυψης της επιφάνειάς του με ξένες ουσίες. [75]

Το ηλεκτρόδιο λεπτού στρώματος υδραργύρου (MFE) αποτελείται από ένα πολύ λεπτό στρώμα υδραργύρου, κατά προσέγγιση 10 έως 100 μm, το οποίο αποτίθεται επάνω σε ένα αγώγιμο και χημικά αδρανές υπόστρωμα. Συνήθως χρησιμοποιείται υπόστρωμα υαλώδους άνθρακα. Η εναπόθεση του υδραργύρου συνήθως γίνεται μέσω καθοδικής εναπόθεσης διαλύματος νιτρικού υδραργύρου, συνήθως ταυτόχρονα με την εναπόθεση των μετάλλων που πρόκειται να ανιχνευθούν. [67]

### **4.3 Ηλεκτρόδια άνθρακα**

Ο άνθρακας αποτελεί ένα από τα πιο συνηθισμένα υλικά κατασκευής ηλεκτροδίων εργασίας (WE) στην ηλεκτροανάλυση. Η ευρεία αυτή χρήση οφείλεται σε πολλά πλεονεκτήματα, όπως η μη τοξικότητά του, το χαμηλό κόστος, η διαθεσιμότητα ποικίλων μορφών, τα χαμηλά ρεύματα υποβάθρου, η καλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, το σχετικά μεγάλο εύρος δυναμικού, η χημική και ηλεκτροχημική αδράνεια, η

σταθερότητά του, καθώς και η ευκολία τροποποίησης της επιφάνειάς του για τη βελτίωση της ηλεκτροχημικής απόδοσης. [72,76]

Οι πιο δημοφιλείς τύποι άνθρακα που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροχημεία για την κατασκευή ηλεκτροδίων περιλαμβάνουν: α) τον πυρολυτικό γραφίτη, β) την πάστα άνθρακα, γ) τον υαλώδη άνθρακα, δ) τις ίνες άνθρακα (ή ανθρακονήματα), ε) το γραφένιο, στ) το διαμάντι εμπλουτισμένο με βόριο, και η) τους νανοσωλήνες άνθρακα. [67,72]

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και οι βιοαισθητήρες με βάση το γραφένιο έχουν λάβει πρόσφατα αυξανόμενη προσοχή στο πεδίο της ηλεκτροανάλυσης, λόγω των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως η υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, η χημική αντίσταση και η μηχανική αντοχή. Αν και το γραφένιο έχει πολλές εξαιρετικές ιδιότητες, λόγω της αδρανούς επιφάνειάς του, υπάρχει μια ισχυρή δύναμη Van der Waals μεταξύ των φύλλων του, η οποία οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συσσωμάτωση. Για να εκμεταλλευτούμε πλήρως τις εξαιρετικές ιδιότητες του γραφενίου, η επιφάνειά του επιβάλλεται να τροποποιηθεί. Το χημικό ντόπινγκ των ατόμων αζώτου αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για τη ρύθμιση της επιφάνειας του άνθρακα και για τη βελτίωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. [77] Επιπλέον, η μοναδική δισδιάστατη κρυσταλλική δομή του γραφενίου το καθιστά εξαιρετικά ελκυστικό ως υλικό υποστήριξης για νανοσωματίδια, καταλύτη μετάλλων και οξειδίων μετάλλων. Αυτά τα υβριδικά υλικά με βάση το γραφένιο έχουν δείξει μεγαλύτερη ευελιξία ως βελτιωμένα υλικά ηλεκτροδίων για εφαρμογές ηλεκτροχημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων. [27] Αυτό αναμένεται να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων βιοαισθητήρων με ακόμη πιο προηγμένες ιδιότητες. [77]

Ωστόσο, σε γυμνό γυάλινο ηλεκτρόδιο άνθρακα, συγκεκριμένα η γουανίνη και η αδερίνη έδειξαν ανεπαρκή ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων και ανικανότητα ηλεκτροκαταλυτικής οξειδωσης. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, τα ηλεκτρόδια γενικά τροποποιούνται με μια κατηγορία υλικών νανομέτρων με υψηλή αγωγιμότητα και ισχυρή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα, όπως υλικό άνθρακα, μεταλλικά νανοσωματίδια, αγώγιμο πολυμερές κ.λπ. Επομένως, η εύρεση κατάλληλου υλικού για την κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα για την ανίχνευση της γουανίνης και της αδερίνης παραμένει μια πρόκληση. [78]

#### 4.4 Ηλεκτρόδια μετάλλων

Τα στερεά ηλεκτρόδια μετάλλων μπορούν να παρουσιάζονται σε στατική ή περιστρεφόμενη μορφή, και διατίθενται σε ποικίλα μεγέθη και γεωμετρίες. Συνήθως, αυτά τα ηλεκτρόδια έχουν τη μορφή επίπεδου δίσκου και αποτελούνται από μια κοντή κυλινδρική ράβδο του υλικού του ηλεκτροδίου, η οποία ενσωματώνεται σε έναν κατάλληλο σωλήνα από μονωτικό υλικό. Το μονωτικό υλικό μπορεί να είναι, για παράδειγμα, Teflon, Kel-F, γυαλί και άλλα αντίστοιχα υλικά. [67,72]

Τα πιο συνηθισμένα υλικά για ηλεκτρόδια μετάλλων είναι το Pt και το Au. Τα ηλεκτρόδια Au είναι η κύρια επιλογή για τον προσδιορισμό ηλεκτροθετικών στοιχείων, κυρίως του Hg και του As. Άλλα μέταλλα, όπως το Cu, το Ni και το Ag, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως υλικά ηλεκτροδίων, αλλά συνήθως για συγκεκριμένες εφαρμογές. Τα ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων δεν είναι τόσο αδρανή όσο τα ηλεκτρόδια του άνθρακα, και συνεπώς είναι πιο επιρρεπή στην απορρόφηση υδρογόνου στην επιφάνειά τους και στον σχηματισμό επιφανειακών οξειδίων, που προκαλούν υψηλά ρεύματα υποβάθρου. Αυτό το πρόβλημα συνήθως αντιμετωπίζεται με την εφαρμογή ενός κυκλικού δυναμικού ή με μηχανικό γυάλισμα, και είναι λιγότερο σοβαρό σε μη υδατικά μέσα, όπου τα ευγενή μέταλλα συχνά αποτελούν την ιδανική επιλογή. [67,72,78,79]

Ειδικότερα, τα νανοσωματίδια χρυσού (GNP) χρησιμοποιούνται ευρέως. Η παρασκευή και η ακινητοποίηση του GNP μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, για ηλεκτροκαταλυτικές εφαρμογές, όπως η αγκύρωση με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, ομοιοπολική σύνδεση και ηλεκτροαπόθεση. Η ηλεκτροαπόθεση αποτελεί μια εξαιρετικά ελκυστική μέθοδο, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και απαιτείται λιγότερη πειραματική πορεία. Επιπλέον, το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα, ελέγχοντας την υπέρταση, την πυκνότητα ρεύματος, τη σύνθεση του διαλύματος και τη θερμοκρασία. [80]

Άλλο ένα παράδειγμα είναι τα νανοσωματίδια αργύρου (Ag), τα οποία έχουν εξαιρετικά υψηλή αγωγιμότητα και ηλεκτροχημική απόδοση. Η παρουσία νανοσωματιδίων αργύρου επεκτείνει τις δυνατότητες για την κατασκευή νανοδομών με πρόσμειξη Ag και επεκτείνει τη χρήση τους σε βιοαισθητήρες. Η χρήση πυριτίου και υλικών με βάση τον άνθρακα ως παραπροϊόντα μπορεί να ενισχύσει την ηλεκτροχημική σύνδεση μεταξύ των αναλυτών και του μεταλλικού νανοσωματιδίου.

Ο συνδυασμός υλικών με βάση τον άνθρακα με μεταλλικά νανοσωματίδια έχει αποδειχθεί ότι έχει συνεργική πρόοδο στις ηλεκτροκαταλυτικές εφαρμογές. Έτσι, αποτελούν ιδανικό ανιχνευτή για εφαρμογές βιοαισθητήρα λόγω της υψηλής επιφάνειας, της χημικής αδράνειας, του χαμηλού κόστους, της υδατοδιαλυτότητας, της χαμηλής τοξικότητας, της βιοσυμβατότητας και των ηλεκτρικών και οπτικών ιδιοτήτων τους. [4]

Τα μεταλλικά ηλεκτρόδια έχουν πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων των εξαιρετικών ηλεκτρικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους και του μεγάλου ανοδικού εύρους δυναμικού. [67] Η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους τους, η χημική σταθερότητα, η υψηλή δραστηριότητα κατάλυσης και η ανθεκτικότητα της επιφάνειας τους, τα καθιστούν πολύ χρήσιμα για εφαρμογές αισθητήρων. [80] Ωστόσο, ένα βασικό μειονέκτημά τους είναι η επιδεκτικότητά τους σε δηλητηρίαση και απόφραξη της επιφάνειάς τους από τα προϊόντα των ηλεκτροδιακών αντιδράσεων. [72] Επιπλέον, η χαμηλή υπέρταση υδρογόνου περιορίζει το παράθυρο καθοδικού δυναμικού τους σε περιοχές μεταξύ -0,2 έως -0,5 V, ανάλογα με το pH του διαλύματος. [67]

Συμπερασματικά, η επίδραση του νανοσωματιδίου με το γραφένιο έχει ως αποτέλεσμα την βελτιωμένη ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα με υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα και σταθερότητα για την ανίχνευση της γουανίνης και της αδενίνης. [4]

#### **4.4.1 Ηλεκτρόδιο χαλκού**

Ο χαλκός παίζει σημαντικό ρόλο στη χημεία και την κατάλυση σε βιολογικά συστήματα. Συμμετέχει σε διάφορες σημαντικές διεργασίες στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης ερυθρών αιμοσφαιρίων, πρωτεϊνών και ενζύμων, καθώς και τον μεταβολισμό του σιδήρου, της γλυκόζης και της χοληστερόλης. Οι διαφορετικοί ρόλοι του χαλκού στα βιολογικά συστήματα, προκύπτουν από την ικανότητά του να κάνει κύκλο μεταξύ της ανηγμένης ( $\text{Cu}^+$ ) και της οξειδωμένης ( $\text{Cu}^{2+}$ ) μορφής του. [63]

Σε αυτή την προοπτική, ο χαλκός ξεχωρίζει για την ικανότητά του να σχηματίζει σύμπλοκα με λειτουργικές ομάδες -N-, -S- και -O- που βρίσκονται ακόμη και σε βιομόρια. Ως εκ τούτου, ένας μεταλλικός ηλεκτροχημικός αισθητήρας με βάση τον

χαλκό θα μπορούσε να είναι μια καλή επιλογή για την άμεση ανίχνευση της κρεατινίνης. [62]

Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροχημική παρακολούθηση του συμπλέγματος χαλκού-κρεατινίνης μέσω της οξειδωσης του χαλκού στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου. [81] Αυτό, μπορεί να οδηγήσει είτε σε αύξηση είτε σε μείωση του ρεύματος αιχμής, ανάλογα με τον μηχανισμό της συμπλοκοποίησης. [47] Η κατανόηση αυτής της αλληλεπίδρασης μεταξύ χαλκού και κρεατινίνης θα διευκολύνει την περαιτέρω ανάπτυξη σε ιατρική έρευνα και μελέτες. [63]

Συνοψίζοντας, οι μη ενζυματικοί ηλεκτροχημικοί αισθητήρες κρεατινίνης που βασίζονται σε μεταλλικά κέντρα παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των ενζυματικών αισθητήρων. Η έρευνα σε αυτούς τους αισθητήρες κρεατινίνης με βάση το μεταλλικό κέντρο έχει φέρει ελπιδοφόρα αποτελέσματα, με ευέλικτους μηχανισμούς και ευρύ φάσμα ανίχνευσης, εξαιρετική επιλεκτικότητα και πολύ υψηλή σταθερότητα αποθήκευσης από τους αντίστοιχους ενζυματικούς. Αν και οι τελευταίοι είναι εξαιρετικά επιλεκτικοί, το υψηλό κόστος και η μικρή διάρκεια αποθήκευσής τους, τους καθιστούν δυσχερείς στην εφαρμογή τους για μη συγκεντρωμένη ανίχνευση. Αντίθετα, οι μη ενζυματικοί αισθητήρες, κυρίως αυτοί που βασίζονται σε μεταλλικά κέντρα, είναι χαμηλού κόστους και μπορούν άμεσα να βοηθήσουν ασθενείς σε κίνδυνο να πραγματοποιήσουν ποσοτική ανάλυση ρουτίνας των επιπέδων κρεατινίνης στο αίμα /ορός και/ή ούρα. [47]

## **4.5 Τρισδιάστατα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια**

### **4.5.1 Εισαγωγή στην τρισδιάστατη εκτύπωση**

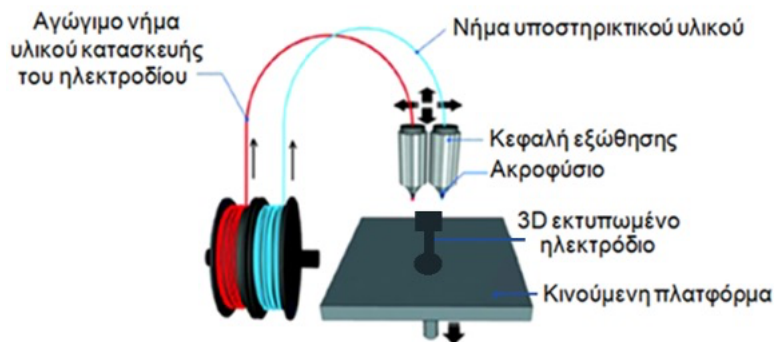
Υπάρχουν ποικίλες τεχνικές μαζικής παραγωγής ηλεκτροδίων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η παραγωγή ηλεκτροδίων μέσω της μικρομηχανικής (καθοδικής ιοντοβολής (sputtering) ή φωτολιθογραφίας) χαρακτηρίζονται από διαδικασίες πολλαπλών σταδίων που απαιτούν δαπανηρό και ογκώδη εξοπλισμό καθώς και πρόσθετα υλικά (π.χ. φωτοανθεκτικά πολυμερή). Η χύτευση με έγχυση είναι κατάλληλη για την ταχεία μαζική παραγωγή ηλεκτροδίων χαμηλού κόστους, ωστόσο, υστερεί στην ευελιξία της και αυτό διότι χρειάζεται ακριβά ειδικά καλούπια για κάθε σχέδιο. [82] Τεχνικές εκτύπωσης όπως η εκτύπωση μέσω πλέγματος (screen-

printing) και ο ψεκασμός μελάνης (inkjet-printing) χρησιμοποιούνται συχνά. [82,83] Ωστόσο, η απαίτηση των τεχνικών αυτών για κατάλληλα υποστρώματα και αγώγιμα μελάνια, των οποίων η σύνθεση και το ιξώδες πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά, καθώς επίσης και η συχνή ανάγκη των προκυπτόντων αισθητήρων για κάποια περαιτέρω επεξεργασία (όπως θέρμανση ή σύντηξη) με σκοπό την βελτίωση της αγωγιμότητάς τους και κατ' επέκταση της ηλεκτροαναλυτικής τους απόδοσης περιορίζει σημαντικά την χρήση τους. [82] Αντίθετα, η τρισδιάστατη εκτύπωση (three-dimensional printing, 3D printing) κατασκευάζει απλά, γρήγορα και με χαμηλό κόστος επιθυμητά υλικά σε διάφορα σχήματα και με ποικίλες ιδιότητες και λειτουργίες. Η συνηθέστερη τεχνική 3D εκτύπωσης είναι η εκτύπωση μέσω της συντηγμένης μοντελοποίησης με εναπόθεση (fused deposition modeling, FDM). [84,85] Σε αυτήν την τεχνική εκτύπωσης, τα αντικείμενα κατασκευάζονται με την απόθεση διαδοχικών στρώσεων ενός υλικού μέχρις ότου σχηματιστεί το επιθυμητό αντικείμενο και αποτελεί την ιδανική επιλογή για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων. [82,84]

#### **4.5.2 Αρχή τεχνικής 3D εκτύπωσης με συντηγμένη μοντελοποίηση εναπόθεσης**

Η τεχνική της 3D εκτύπωσης με χρήση της συντηγμένης μοντελοποίησης με εναπόθεση (Fused Deposition Modeling, FDM) λειτουργεί ως εξής:

1. Εξώθηση θερμοπλαστικού νήματος: Ένα ημιτηγμένο θερμοπλαστικό νήμα εξέρχεται από μια κινούμενη θερμαινόμενη κεφαλή.
2. Εναπόθεση στρώσης προς στρώσης: Το θερμοπλαστικό νήμα εφαρμόζεται πάνω σε μια πλατφόρμα ακολουθώντας το σχήμα που καθορίζεται από το λογισμικό, ενώ η κεφαλή κινείται σε τρεις διαστάσεις.
3. Πτώση της πλατφόρμας: Με την ολοκλήρωση κάθε εκτυπωμένου στρώματος, η πλατφόρμα χαμηλώνει κατά μία μικρή απόσταση, παρασκευάζοντας το έδαφος για την επόμενη στρώση.
4. Επανάληψη: Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με την εξώθηση νέου νήματος και την εναπόθεση νέου στρώματος, μέχρι να δημιουργηθεί το τελικό επιθυμητό αντικείμενο. [84,85,86,87]



Εικόνα 16: Απεικόνιση 3D εκτυπωτή για χρήση με FDM τεχνική. [τροπ. [87] ]

Συγκεκριμένα, η διαδικασία ξεκινάει με την δημιουργία του επιθυμητού μοντέλου, χρησιμοποιώντας λογισμικό ψηφιακού σχεδιασμού με τη βοήθεια υπολογιστή (computer-aided design, CAD το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε κατάλληλη μορφή αρχείου (συνήθως standard triangle language, STL) και αποθηκεύει πληροφορίες για τις επιφάνειες των 3D αντικειμένων ως λίστα συντεταγμένων τριγωνικών τμημάτων. Έπειτα, το τρισδιάστατο μοντέλο χωρίζεται σε πολλά στρώματα με δισδιάστατες διατομές τα οποία αποστέλλονται στον τρισδιάστατο εκτυπωτή για επεξεργασία. Τέλος, το 3D ο εκτυπωτής αρχίζει να εναποθέτει το νήμα στην πλατφόρμα εκτύπωσης μέχρι ολόκληρο το 3D αντικείμενο να δημιουργηθεί. [83,86]

#### 4.5.3 Αγωγή πολυμερή υλικά για παραγωγή 3D ηλεκτροδίων

Η τεχνική Fused Deposition Modeling (FDM) στην εκτύπωση ηλεκτροδίων χρησιμοποιεί ποικίλα αγώγιμα θερμοπλαστικά νήματα. [84,86] Ανάμεσα στα δημοφιλέστερα υλικά που χρησιμοποιούνται για την εκτύπωση ηλεκτροδίων μέσω FDM περιλαμβάνονται τα εξής: Ακρυλονιτρίλιο-Βουταδιένιο-Στυρόλιο (Acrylonitrile Butadiene Styrene, ABS), Πολυγαλακτικό Οξύ (Polylactic Acid, PLA) [86,87], Πολυαμίδιο (Polyamide, PA) [85], Πολυβινυλική Αλκοόλη (Polyvinyl Alcohol, PVA), Τερεφθαλικό Πολυαιθυλένιο (Polyethylene Terephthalate, PET), Πολυανθρακικές Ρητίνες (Polycarbonate, PC), Θερμοπλαστικά Ελαστομερή (Thermoplastic Elastomers, TPE) και Νάιλον (Nylon). [87]

Μερικά από αυτά τα υλικά έχουν επίσης εφαρμοστεί σε σύνθετα νήματα για την παραγωγή αγώγιμων νημάτων άνθρακα. Παραδείγματα περιλαμβάνουν τα σύνθετα

νήματα PLA/γραφενίου, ABS/αιθάλης, πολυπροπυλενίου/αιθάλης, πολυβουτυλενίου τερεφθαλικού οξέος/ νανοσωλήνων άνθρακα/γραφενίου και νανοϊνών άνθρακα/γραφίτη/πολυστυρενίου. [85,86,87]

#### **4.5.4 Πλεονεκτήματα 3D εκτύπωσης με συντηγμένη μοντελοποίηση εναπόθεσης**

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής 3D εκτύπωσης μέσω της FDM για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων είναι τα ακόλουθα:

- Χαμηλό κόστος εξοπλισμού και υλικών. [85]
- Δυνατότητα χρήσης οικιακού και φορητού εξοπλισμού. [82,83]
- Ταχεία και εύκολη μαζική παραγωγή ηλεκτροδίων. [82,83]
- Υψηλή ακρίβεια και ομοιομορφία ηλεκτροδίων από παρτίδα σε παρτίδα. [82]
- Μεγάλη ευελιξία στην επιλογή υλικών. [82,83]
- Φιλικό προς το περιβάλλον, αφού δεν απαιτούνται χημικές ουσίες και δεν παράγονται απόβλητα. [82]
- Υψηλή ευελιξία στο σχήμα, το μέγεθος και τη γεωμετρία των αισθητήρων χωρίς την ανάγκη χρήσης υποστρωμάτων. [82,83,85,87]
- Πλήρης μεταφορά της σχεδίασης μεταξύ των 3D πλατφορμών, επιτρέποντας την εκτύπωση των ηλεκτροδίων σε οποιοδήποτε μέρος του κόσμου. [82,83]
- Δυνατότητα κατασκευής αντικειμένων από διαφορετικά υλικά, χρησιμοποιώντας 3D εκτυπωτές με πολλαπλές κεφαλές. [82,87]

Αυτά τα πλεονεκτήματα καθιστούν την τεχνική FDM ιδανική για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων με χαμηλό κόστος, υψηλή ακρίβεια και ευελιξία στον σχεδιασμό. [82]



## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η σύνθεση αγώγιμων πολυμερικών νηματίων τροποποιημένων με νανοσωματίδια, από τα οποία θα εκτυπώνονταν μέσω τρισδιάστατης εκτύπωση ηλεκτροχημικοί αισθητήρες κατάλληλοι για τον προσδιορισμό βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά. Ειδικότερα, οι βιοδείκτες που μελετήθηκαν ήταν η αδενίνη και η γουανίνη καθώς και η κρεατινίνη. Αρχικά, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια εργασίας που εκτυπώθηκαν από νημάτιο πολυγαλακτικού οξέος (PLA) τροποποιημένα με αιθάλη (CB, carbon black). Τόσο η αδενίνη όσο και η γουανίνη οξειδώνονται απευθείας στο 3D ηλεκτρόδιο δίνοντας χαρακτηριστικές κορυφές οξείδωσης σε διαφορετικά θετικά δυναμικά. Για την ανίχνευση της κρεατινίνης, χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια εργασίας που εκτυπώθηκαν από νημάτιο πολυγαλακτικού οξέος τροποποιημένα με αιθάλη και νανοσκόνη CuO. Το ενσωματωμένο CuO οξειδώνεται σε Cu(II) το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με την κρεατινίνη. Ο ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της κρεατινίνης βασίζεται στη μείωση του ύψους κορυφής οξείδωσης του Cu (προερχόμενο από το ενσωματωμένο CuO) λόγω κατανάλωσής του κατά το σχηματισμό συμπλόκου με την κρεατινίνη. Όσο περισσότερη κρεατινίνη περιέχει το δείγμα τόσο μικρότερο ρεύμα οξείδωσης χαλκού παρατηρείται, μειώνοντας τη χαρακτηριστική κορυφή οξείδωσης του χαλκού. Και οι δύο ηλεκτροχημικές μέθοδοι προσδιορισμού αδενίνης, γουανίνης, κρεατινίνης πραγματοποιήθηκαν με διαφορική παλμική βολταμμετρία (DPV), σε δείγματα ούρων και πλάσματος. Μέχρι στιγμής, στη βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί η χρήση 3D εκτυπωμένων ηλεκτροδίων στον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό των παραπάνω βιοδεικτών. Η τρισδιάστατη εκτύπωση που εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη εργασία παρείχε υψηλής ευαισθησίας, χαμηλού κόστους, απλούς και γρήγορους στην κατασκευή καθώς, επίσης, και φιλικούς προς το περιβάλλον προηγμένους αισθητήρες κατάλληλους για επιτόπια κατασκευή και ανάλυση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

### 5.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραματικών διεργασιών ήταν τα παρακάτω:

1) Δισαππεσταγμένο νερό (H<sub>2</sub>O)

2) Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, HCl 0,1M (pH=2):

Για την παρασκευή 250 mL HCl 1M, αραιώθηκαν 21mL πυκνού διαλύματος HCl (30%) σε δισαππεσταγμένο νερό.

3) Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa 0,1M (pH=5):

Για την παρασκευή 250mL του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος 1M, ζυγίστηκαν 34g άνυδρου CH<sub>3</sub>COONa τα οποία διαλύθηκαν σε δισαππεσταγμένο νερό, αναμίχθηκαν με 14,5mL παγόμορφου CH<sub>3</sub>COOH 99,7% και αραιώθηκαν με δισαππεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 250mL. Το προκύπτον ρυθμιστικό διάλυμα είχε pH=5.

3) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M (pH=7):

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M, ζυγίστηκαν 2,35g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 1,78g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> τα οποία διαλύθηκαν σε δισαππεσταγμένο νερό, αναμίχθηκαν και αραιώθηκαν με δισαππεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 250mL. Το προκύπτον ρυθμιστικό διάλυμα είχε pH=7.

4) Ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνίας, NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl 0,1M (pH=10):

Για την παρασκευή 100 mL NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl 0,1M, ζυγίστηκαν 5,35g NH<sub>4</sub>Cl, τα οποία διαλύθηκαν σε δισαππεσταγμένο νερό, αναμίχθηκαν με 6mL NH<sub>3</sub> και αραιώθηκαν με δισαππεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100mL. Έπειτα μετρήθηκε το pH του προκύπτοντος διαλύματος, το οποίο βρέθηκε ίσο με 10.

5) Πρότυπο υδατικό διάλυμα αδενίνης:

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος αδενίνης, ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 0,13513g σε 100mL δισαππεσταγμένου νερού. Η ογκομετρική φιάλη του διαλύματος αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

6) Πρότυπο υδατικό διάλυμα γουανίνης:

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος γουανίνης, ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 0,15113g σε 20mL NaOH/80ml δισαππεσταγμένο νερό. Η ογκομετρική φιάλη του διαλύματος αποθηκεύτηκε στους 4<sup>0</sup>C.

7) Πρότυπο υδατικό διάλυμα κρεατινίνης:

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος κρεατινίνης, ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν 0,11312g σε 100mL δισαππεσταγμένο νερό. Η ογκομετρική φιάλη του διαλύματος αποθηκεύτηκε στους 4<sup>0</sup>C.

8) Συνθετικά ούρα:

2,427g ουρίας, 0,034g ουρικού οξέος, 0,297g of Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 0,634g NaCl, 0,450 KCl, 0,161g NH<sub>4</sub>Cl, 0,089g CaCl<sub>2</sub>, 0,100g of MgSO<sub>4</sub>, 0,034g NaHCO<sub>3</sub>, 0,003g NaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 0,258g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,100g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, και 0,011g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> αραιωμένα σε 200mL δισαππεσταγμένου νερού.

9) Παρεμποδίσεις:

0,176g ασκορβικό οξύ σε 100mL δισαππεσταγμένο νερό, 0,153g ντοπαμίνη σε 100mL δισαππεσταγμένο νερό, 0,180g γλυκόζη σε 100mL δισαππεσταγμένο νερό και 0,113g κυτοσίνη σε 100mL δισαππεσταγμένο νερό.

10) Νημάτια (Fillaments) για προσδιορισμό αδενίνης και γουανίνης:

Συντέθηκαν νημάτια που αποτελούνται από PLA, Carbon Black ως αγωγίμο υλικό και διμεθυλαιθέρα πολυαιθυνοελογλυκόλη (polyethylene glycol (PEG) dimethyl ether) ως πλαστικοποιητή.

11) Νημάτια για προσδιορισμό κρεατινίνης:

Συντέθηκαν νημάτια που αποτελούνται από PLA, Carbon Black ως αγωγίμο υλικό, διμεθυλαιθέρα πολυαιθυνοελογλυκόλη ως πλαστικοποιητή και νανοσκόνη CuO ως τροποποιητή.

12) Λοιπά αντιδραστήρια:

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DCM)

## 5.2 Οργανολογία

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε τα εξής:

- Ποτενσιοστάτης: Χρησιμοποιήθηκε ο ποτενσιοστάτης Palm Sens 4 της εταιρείας Palm Sens συνδεδεμένος με υπολογιστή, ο οποίος διαθέτει το πρόγραμμα

software PStTrace 5.05 για την καταγραφή και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

- Εκτυπωτής τρισδιάστατης εκτύπωσης δύο κεφαλών της σειράς Creator Pro της εταιρείας Flashforge και χρήση των λογισμικών Tinkercad και Flashprint για τη σχεδίαση των ηλεκτροδίων.
- Κυψελίδα και αναδευτήρας: Χρησιμοποιήθηκε υάλινη κυψελίδα των 100mL με υποδοχές για τα 3 ηλεκτρόδια και μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του διαλύματος.
- Ηλεκτρόδιο εργασίας: 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια από τα συντεθειμένα νημάτια.
- Ηλεκτρόδιο αναφοράς: ηλεκτρόδιο Ag/AgCl, κορεσμένο σε KCl (της εταιρείας Sentek).
- Βοηθητικό ηλεκτρόδιο: σύρμα λευκόχρυσου.
- Συσκευή υπερήχων (Bandelin Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD 3200).
- Πεχάμετρο.
- Αναλυτικός ζυγός (ακρίβειας 4 δεκαδικών).
- Μηχανικές πιπέτες μεταβλητού όγκου.
- Διάφορα γυάλινα σκεύη (σιφώνια, ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι, ράβδος, σπάτουλα κτλ).

### **5.3 Κατασκευή αισθητήρα με τρισδιάστατη εκτύπωση**

#### **5.3.1 Σύνθεση πολυμερικών αγώγιμων νημάτων**

Η διαδικασία σύνθεσης των αγώγιμων νημάτων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 17).

Σύνθεση PLA/CB νημάτιου: Σφαιρίδια PLA διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο (DCM) με αναλογία  $0,1 \text{ g mL}^{-1}$  υπό ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του PLA στο DCM, προστίθεται πλαστικοποιητής (PEG dimethyl ether) σε αναλογία (15,8<sub>PEG</sub>:100<sub>PLA</sub>) και η ανάδευση συνεχίζεται για 30 min. Ακολουθεί η προσθήκη αιθάλης (αγώγιμο πληρωτικό) σε αναλογία (27,5<sub>CB</sub>:72,5<sub>PLA</sub>), και η ανάδευση συνεχίζεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το προκύπτον μείγμα αποχύνεται σε γυάλινη επιφάνεια και αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να εξατμιστεί όλο το διχλωρομεθάνιο (συνήθως όλη τη νύχτα). Το φιλμ που προκύπτει

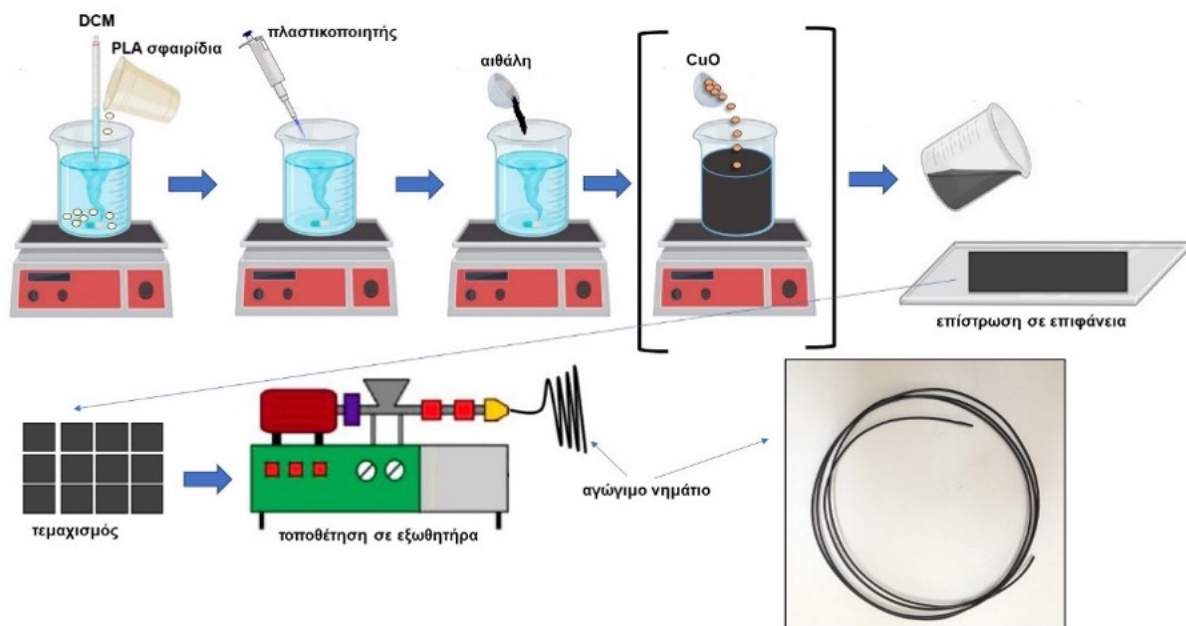
κόβεται σε μικρά κομμάτια με ψαλίδι και τοποθετείται στον εξωθητήρα (Noztek Pro (Noztek)). Η θερμοκρασία εξώθησης είναι 200°C και η κεφαλή εξώθησης έχει διάμετρο 1,75 mm, και στη συνέχεια το προκύπτον νημάτιο τοποθετείται στον 3D εκτυπωτή για την εκτύπωση των ηλεκτροδίων.

Σύνθεση Cu/PLA/CB νηματίου: ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την σύνθεση του PLA/CB νηματίου, με την μόνη διαφορά ότι μετά την προσθήκη CB γίνεται και προσθήκη CuO σε αναλογία (10<sub>Cu</sub>:100<sub>CB</sub>) υπό ανάδευση για 30 min.

Στον πίνακα 3 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι αναλογίες μαζών των συστατικών των δύο νημάτων:

Πίνακας 3: Αναλογία μαζών και περιεκτικότητα wt% των αγώγιμων πολυμερικών νημάτων.

Νημάτιο	Αναλογία μάζας Cu/ CB/ PLA/ PEG	περιεκτικότητα wt% Cu/ CB/ PLA/ PEG
Νημάτιο CB/PLA/PEG	0/ 38/ 100/ 15,8	0,0/ 24,7/ 65,0/ 10,3
Νημάτιο Cu/CB/PLA/PEG	3,8/ 38/ 100/ 15,8	2,4/ 24,1/ 63,5/ 10,0

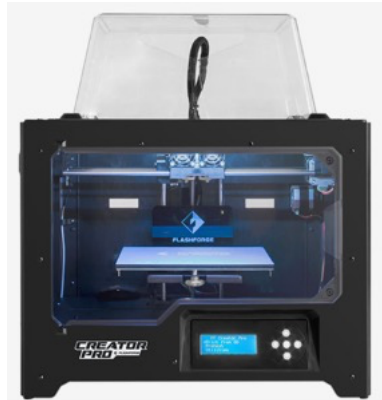


Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης των νημάτων και φωτογραφία του αγώγιμου νήματος.

### 5.3.2 Οργανολογία και υλικά για την 3D εκτύπωση

Για την κατασκευή του αισθητήρα χρησιμοποιήθηκε 3D εκτυπωτής της σειράς Creator Pro (της εταιρείας Flashforge), ο οποίος απεικονίζεται στην εικόνα 18. Ως

νημάτια χρησιμοποιήθηκαν αυτά που συντέθηκαν καθώς και για λόγους σύγκρισης εμπορικό CB/PLA της εταιρίας ProtoPasta.



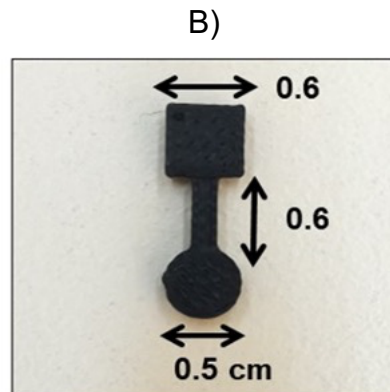
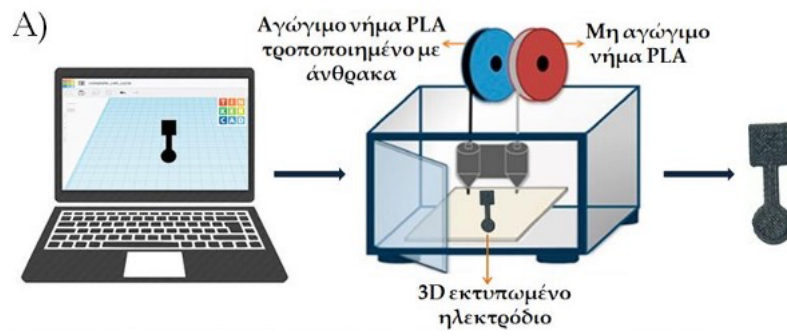
Εικόνα 18: Απεικόνιση του 3D εκτυπωτή.

### 5.3.3 Διαδικασία σχεδιασμού και εκτύπωσης αισθητήρα

Αρχικά, το ηλεκτρόδιο σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ψηφιακού σχεδιασμού Tinkercad (CAD) και μετατράπηκε σε μορφή αρχείου .STL. Ακολουθώντας, το αρχείο το οποίο περιλάμβανε τις πληροφορίες για την επιφάνεια του 3D ηλεκτροδίου ως λίστα συντεταγμένων ανοίχτηκε με το πρόγραμμα Flashprint, καθορίστηκαν οι συνθήκες εκτύπωσης και αποθηκεύτηκε ως μορφή αρχείου .x3g σε μια κάρτα SD. Ειδικότερα, οι συνθήκες εκτύπωσης που ορίστηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Θερμοκρασία πλατφόρμας: 60°C
- Ταχύτητα εκτύπωσης: 35 mm s<sup>-1</sup>
- Θερμοκρασία κεφαλής εξώθησης νήματος: 200°C

Στη συνέχεια, αφού τοποθετήθηκε η κάρτα SD στο 3D εκτυπωτή ξεκίνησε η διαδικασία εκτύπωσης, εναποθέτοντας διαδοχικές στρώσεις του νήματος στην πλατφόρμα μέχρις ότου να σχηματιστεί ο αισθητήρας. Η αναπαράσταση της διαδικασίας κατασκευής καθώς, επίσης, και οι διαστάσεις του ηλεκτροδίου απεικονίζονται στην εικόνα 19.

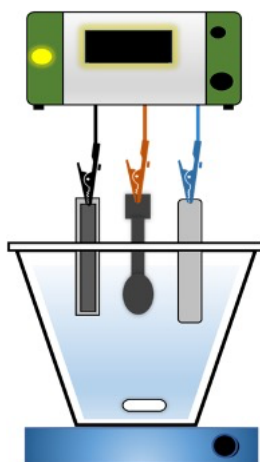


Εικόνα 19: A) Διαδικασία 3D εκτύπωσης ηλεκτροδίου και B) Φωτογραφία και διαστάσεις ηλεκτροδίου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

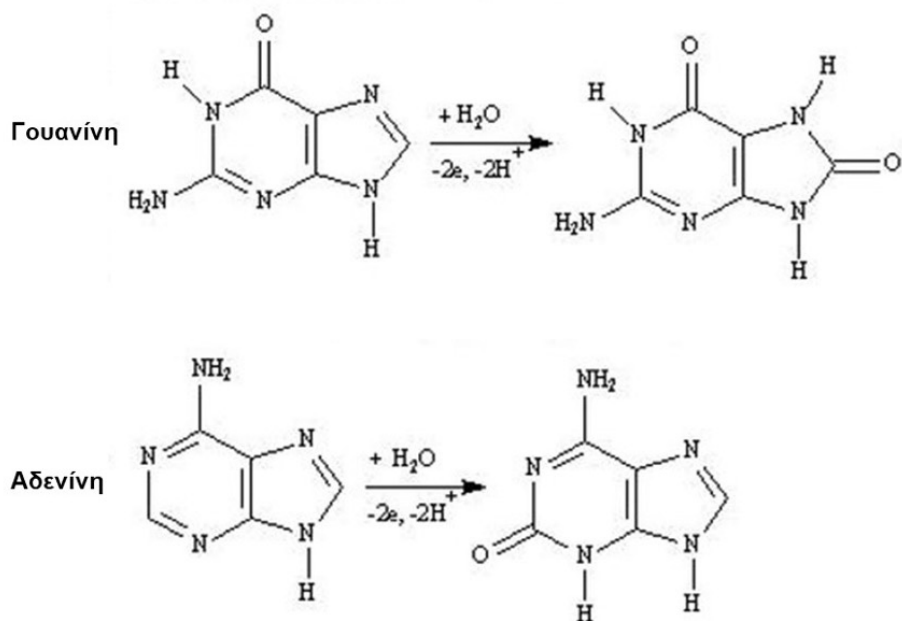
### 6.1 Αρχή μεθόδου και πειραματική διαδικασία προσδιορισμού

Ο ταυτόχρονος ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της αδενίνης και της γουανίνης σε υδατικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (DPV), χρησιμοποιώντας 3D ηλεκτρόδια CB/PLA, κατασκευασμένα σύμφωνα με όσο περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 5. Αναλυτικότερα, ο αισθητήρας βυθιζόταν στο διάλυμα του δείγματος, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7) ως φέρον ηλεκτρολύτης. Εφαρμόστηκε δυναμικό προσρόφησης -0,9V για 30s υπό ανάδευση και ταχύτητα σάρωσης  $50\text{mVs}^{-1}$ . Μετά το πέρας των 30s η ανάδευση διακοπτόταν, το διάλυμα αφήνόταν σε ηρεμία και ακολουθούσε σάρωση DPV σε διάστημα από +0,4V έως +1,4V (εικόνα 20). Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ούρα και πλάσμα αίματος. Οι αντιδράσεις οξειδωσης της γουανίνης και της αδενίνης παρουσιάζονται στην εικόνα 21.



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροχημικής μεθόδου.





Εικόνα 21: Αντιδράσεις οξειδωσης γουανίνης και αδενίνης.

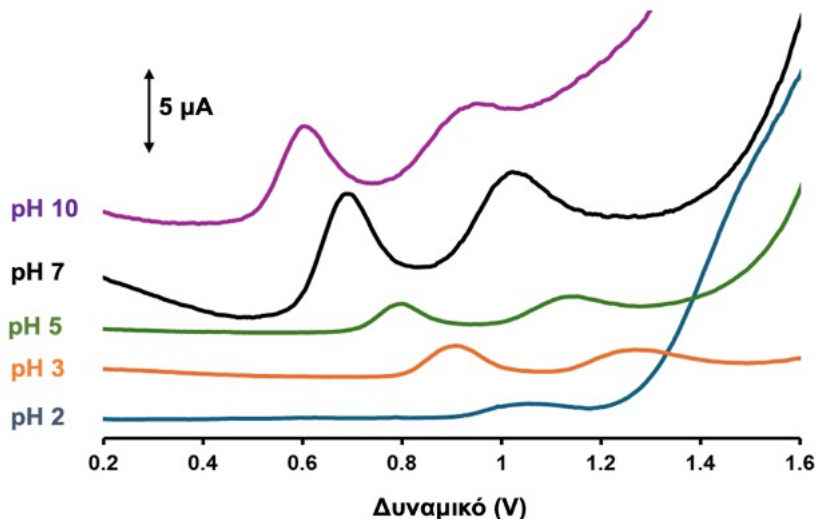
## 6.2 Πειραματικά αποτελέσματα

### 6.2.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων

#### 6.2.1.1 Επίδραση φέροντος ηλεκτρολύτη

Η μελέτη για την επιλογή του φέροντος ηλεκτρολύτη πραγματοποιήθηκε σε εύρος pH από 2 έως 10. Τα τέσσερα διαλύματα ηλεκτρολυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: α) διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, HCl με pH=2 και pH=3, β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών  $CH_3COOH-CH_3COONa$  0,1M με pH 5, γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών,  $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$  0,1M με pH=7 και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών,  $NH_3-NH_4Cl$  0,1 M με pH=10. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην υποενότητα 6.1, με δυναμικό προσρόφησης -0,9V για 30s.

Τα δυναμικά οξειδωσης των κορυφών της αδενίνης και της γουανίνης μετατοπίζονταν σε πιο αρνητικές τιμές όσο αυξανόταν το pH, υποδεικνύοντας έτσι, πως οι οξειδώσεις των ενώσεων είναι άμεσα εξαρτώμενες από την τιμή του pH του ηλεκτρολύτη (εικόνα 22). Ο ηλεκτρολύτης που επιλέχθηκε ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών  $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$  0,1M με pH=7, ο οποίος εμφάνιζε την μεγαλύτερη ευαισθησία.



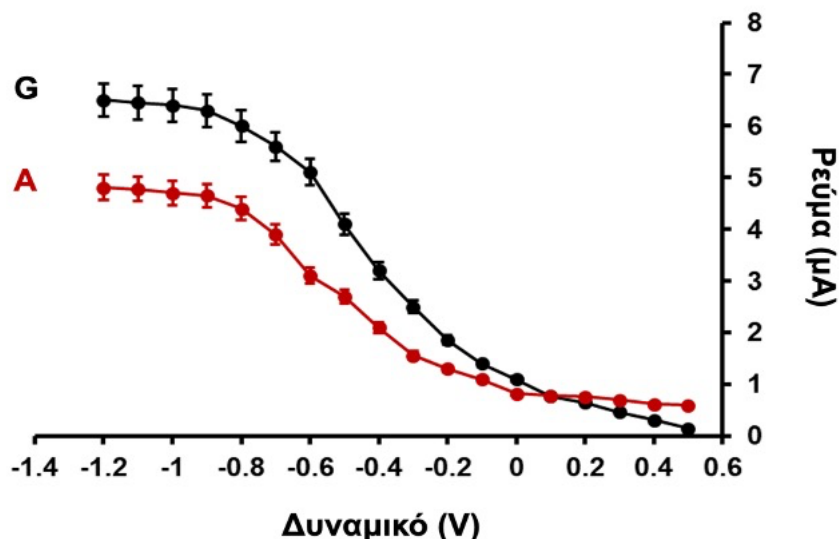
Εικόνα 22: Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας διαλύματος μείγματος 20 $\mu$ M αδενίνη-γουανίνη σε διαφορετικούς ηλεκτρολύτες και σε διαφορετικές τιμές pH α) διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl 0,1M με pH=2 και pH=3, β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa 0,1M με pH 5, γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M με pH 7 και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών, NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl 0,1 M με pH 10.

(Συνθήκες: δυναμικό προσυγκέντρωσης: -0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης: 30s).

### 6.2.1.2 Επίδραση δυναμικού προσυγκέντρωσης

Η επιλογή του καταλληλότερου δυναμικού προσυγκέντρωσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης έγινε σε διάστημα από -1,2V έως +0,5V και παρουσιάζεται στην εικόνα 23. Αναλυτικότερα, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 5 $\mu$ M αδενίνης – γουανίνης σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M με pH=7. Ο χρόνος εφαρμογής δυναμικού ήταν 30s υπό ανάδευση και χρήση του εξεταζόμενου δυναμικού ως δυναμικό προσυγκέντρωσης, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 6.1.

Παρατηρείται ότι το ύψος των κορυφών του ρεύματος της αδενίνης και της γουανίνης ήταν κοντά στο μηδέν σε δυναμικά που πλησίαζαν το δυναμικό οξειδωσής τους και καθώς το δυναμικό πήγαινε σε πιο αρνητικές τιμές, το ρεύμα αυξανόταν μέχρι που έφτασε στην μέγιστη τιμή του στα -0,9V. Στο διάστημα από -0,9 έως -1,2V τα ύψη κορυφών παρέμειναν σχεδόν σταθερά. Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης επιλέχτηκε το δυναμικό -0,9V.



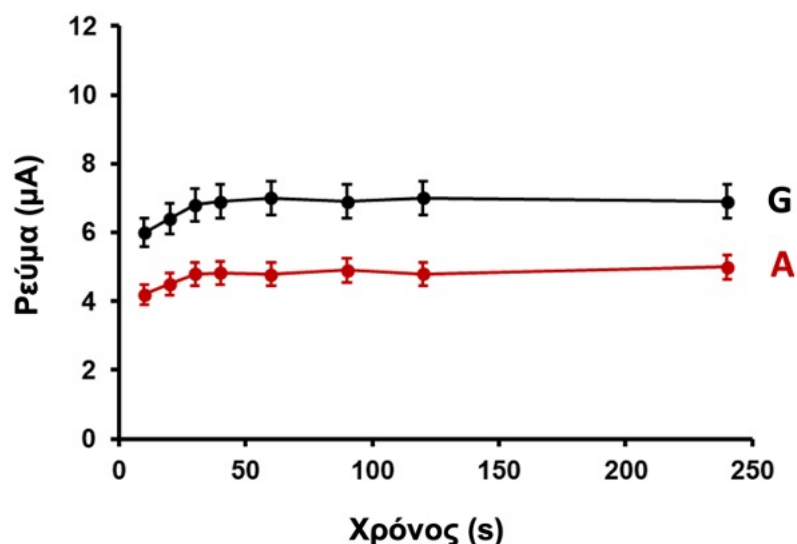
Εικόνα 23: Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στο ύψος των κορυφών οξείδωσης της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 5μM αδενίνη-γουανίνη.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), χρόνος προσυγκέντρωσης: 30s).

### 6.2.1.3 Επίδραση χρόνου προσυγκέντρωσης

Άλλη μία παράμετρος που μελετήθηκε για την επίδραση στο ύψος των κορυφών οξείδωσης της αδενίνης και της γουανίνης είναι ο χρόνος προσυγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, για την επιλογή του ιδανικότερου χρόνου προσυγκέντρωσης, έγινε μελέτη λαμβάνοντας βολταμμογραφήματα σε εύρος 0-250s υπό ανάδευση και δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V. Το διάλυμα περιείχε 5μM αδενίνης – γουανίνης σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M με pH=7, με την χρήση 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα.

Στην καμπύλη που φαίνεται στην εικόνα 24, παρατηρείται ότι με αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης το ρεύμα διατηρείται πρακτικά σταθερό, γεγονός το οποίο δείχνει ότι ο χρόνος προσυγκέντρωσης δεν επηρεάζει σημαντικά το ύψος των κορυφών της αδενίνης και της γουανίνης. Έτσι, για πρακτικούς λόγους, επιλέχθηκε η τιμή των 30s για χρόνο προσυγκέντρωσης.

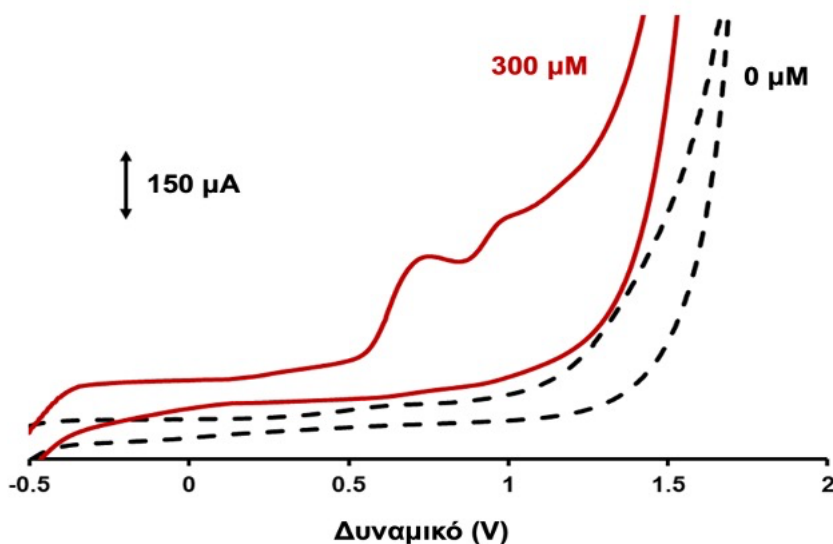


**Εικόνα 24:** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο ύψος των κορυφών οξειδωσης της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 5μM αδενίνης- γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V).

#### 6.2.1.4 Κυκλικό βολταμετρικό προφίλ

Στην εικόνα 25 απεικονίζεται το βολταμογράφημα της κυκλικής βολταμετρίας (CV). Το δυναμικό προσρόφησης είναι -0,9V, ο χρόνος προσρόφησης 30s και ως ηλεκτρολύτης χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M με pH=7. Παρατηρείται, ότι οι κορυφές οξειδωσης 300μM αδενίνης και της γουανίνης δεν εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία ενώ και οι αντιδράσεις τους δεν είναι αντιστρεπτές, αφού δεν εμφανίζονται κορυφές αναγωγής στο διάστημα δυναμικού από -0,5 έως 1.5V. Λόγω πολύ χαμηλής ευαισθησίας, η κυκλική βολταμετρία δεν επιλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση της αδενίνης και της γουανίνης.



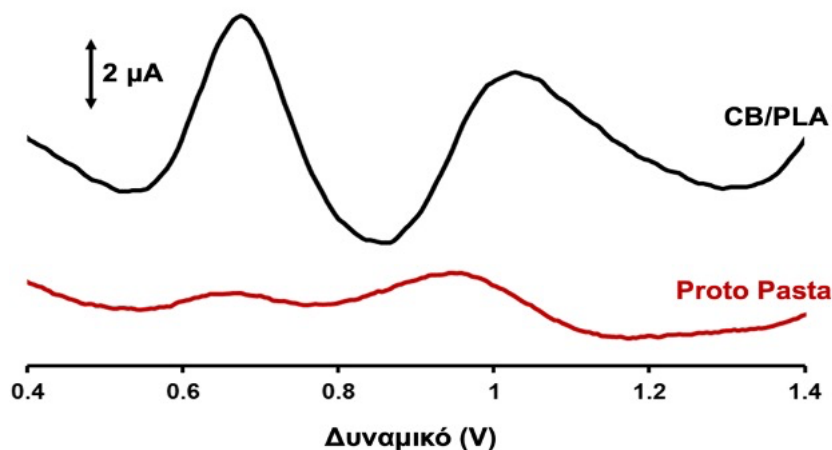
**Εικόνα 25:** Κυκλικό βολταμμογράφημα της αδενίνης και της γουανίνης σε διάλυμα 0μM και 300μM αδενίνη- γουανίνη.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).

#### 6.2.1.5 Σύγκριση με εμπορικά ηλεκτρόδια

Το υλικό κατασκευής του ηλεκτροδίου εργασίας αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για το αποτέλεσμα του προσδιορισμού αφού σ' αυτό πραγματοποιείται η ηλεκτροδιακή αντίδραση. Συγκρίθηκαν δύο διαφορετικά ηλεκτρόδια στον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης. Το ένα ηλεκτρόδιο εκτυπώθηκε από το νήμα CB/PLA που συντέθηκε, και το άλλο ηλεκτρόδιο εκτυπώθηκε από εμπορικό νήμα CB/PLA της εταιρίας Proto-Pasta. Το διάλυμα περιείχε 5μM αδενίνης – γουανίνης σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M με pH=7, δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V και χρόνο προσυγκέντρωσης 30s.

Όπως παρατηρείται και στην εικόνα 26, το ηλεκτρόδιο που εκτυπώθηκε από το νήμα CB/PLA έδωσε πολύ υψηλότερο σήμα κορυφών γουανίνης - αδενίνης (13 φορές υψηλότερη κορυφή γουανίνης και 3,2 φορές υψηλότερη κορυφή αδενίνης) σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο που εκτυπώθηκε από το νήμα της Proto-Pasta.



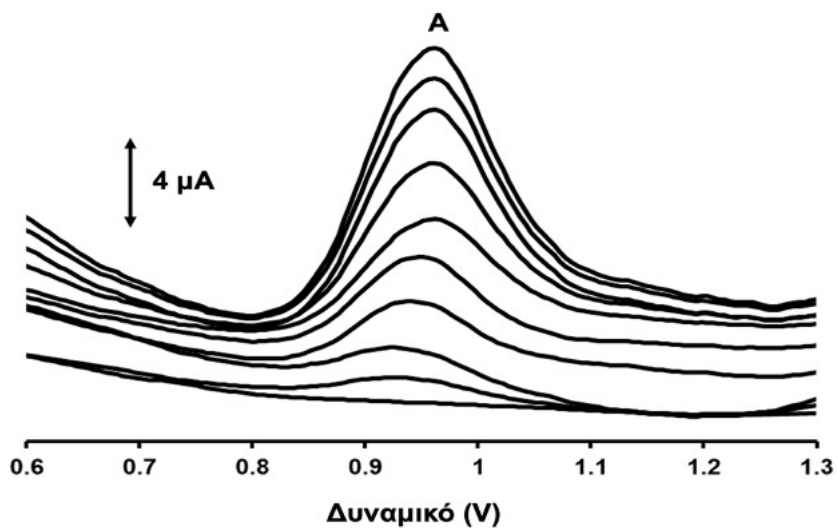
**Εικόνα 26:** Βολταμμογραφήματα διαλύματος 5μM αδενίνης – γουανίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικό τύπο ηλεκτροδίου ως υπόστρωμα.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s)

## 6.2.2 Καμπύλη αναφοράς και αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου

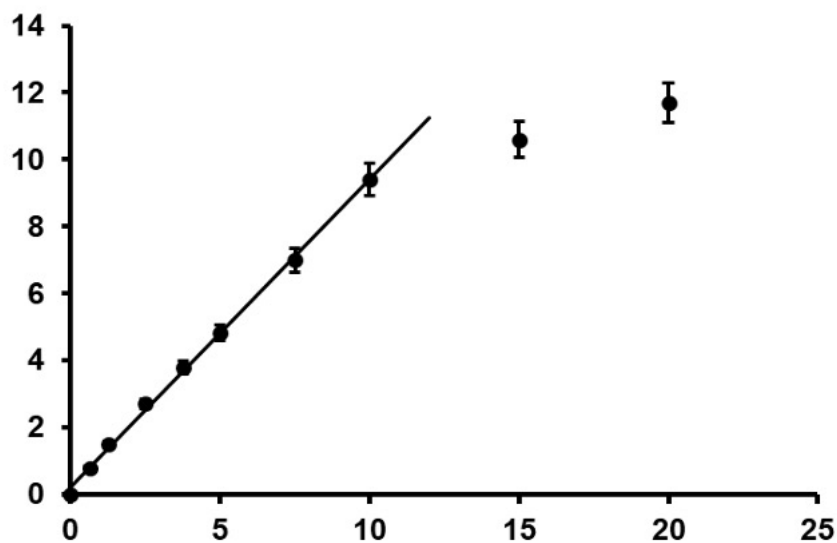
### 6.2.2.1 Προσδιορισμός αδενίνης

Η καμπύλη αναφοράς για την αδενίνη μαζί με τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στις εικόνες 28 και 27. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της αδενίνης χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V, ηλεκτρολύτη  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7) και εφαρμογή διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 27, ο προσδιορισμός αδενίνης παρουσίασε πολύ καλή γραμμικότητα με  $R^2=0,997$ .



**Εικόνα 27: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αδενίνης.**

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).

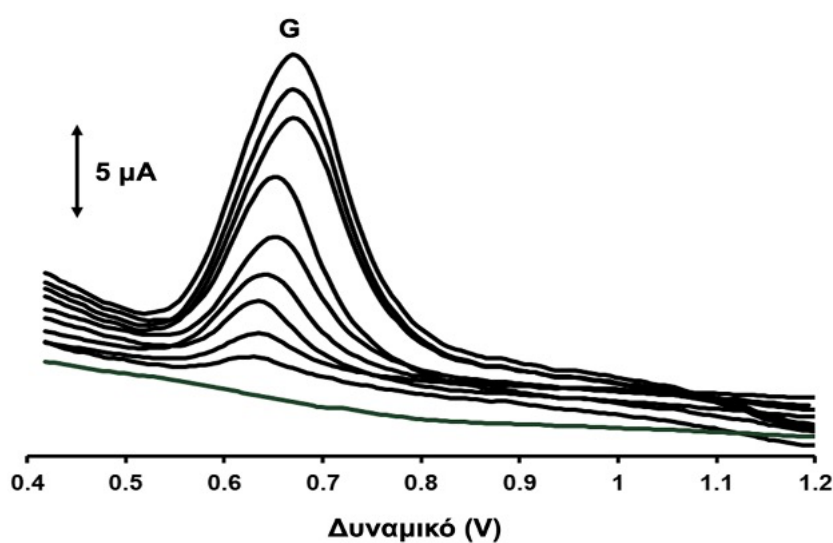


**Εικόνα 28: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού αδενίνης.**

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).

### 6.2.2.2 Προσδιορισμός γουανίνης

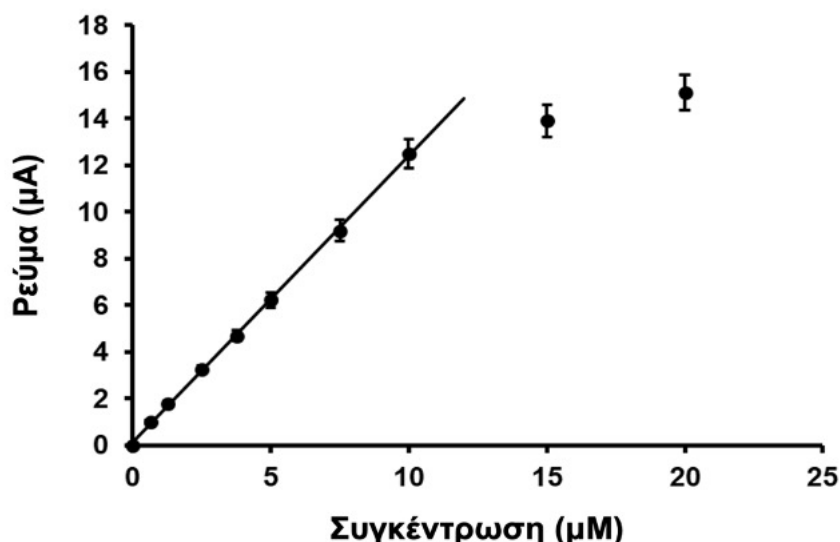
Αντίστοιχα, η καμπύλη αναφοράς για την γουανίνη μαζί με τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στις εικόνες 30 και 29. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της γουανίνης χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V, ηλεκτρολύτη Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M (pH=7) και εφαρμογή διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Ο προσδιορισμός γουανίνης παρουσίασε πολύ καλή γραμμικότητα με R<sup>2</sup>=0,997.



Εικόνα 29: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).



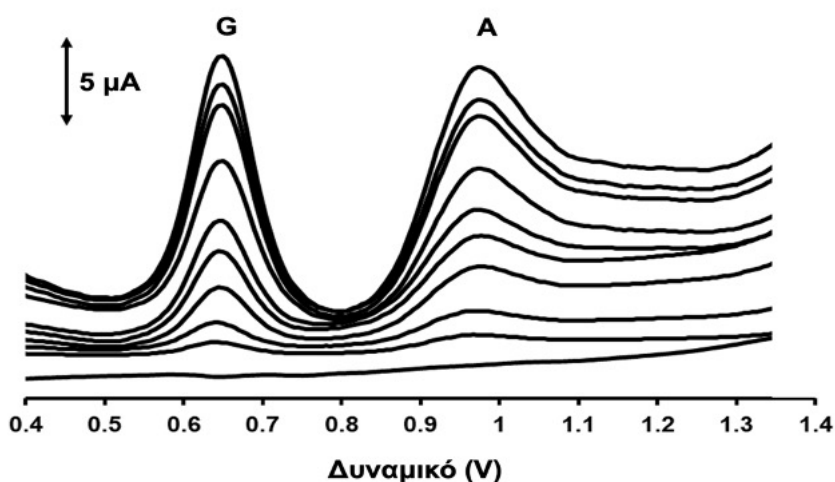


**Εικόνα 30:** Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).

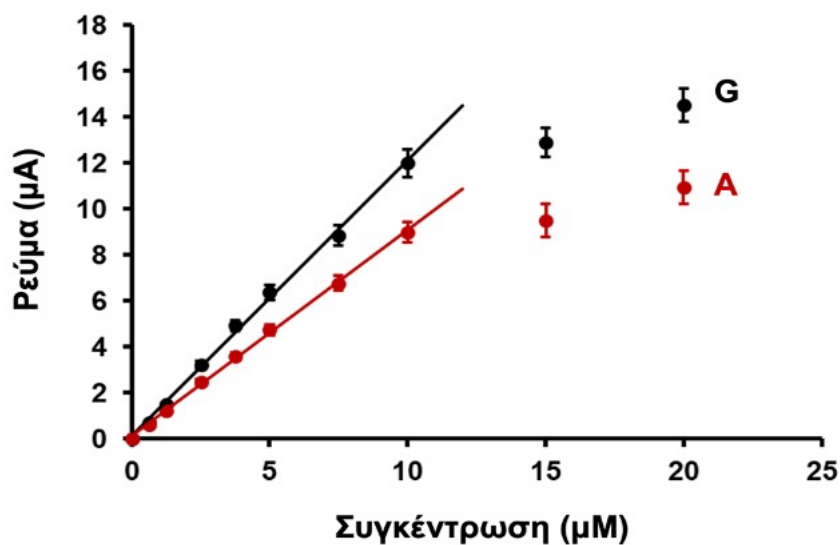
### 6.2.2.3 Ταυτόχρονος προσδιορισμός αδενίνης και γουανίνης

Η καμπύλη αναφοράς για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μαζί με τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στις εικόνες 32 και 31. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς αδενίνης - γουανίνης χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20μM με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V, ηλεκτρολύτη  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7) και εφαρμογή διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, και η αδενίνη και η γουανίνη έχουν πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,997$  για την αδενίνη και  $R^2=0,996$  για την γουανίνη. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε πρακτικά ως  $\text{LOD}= 0,19 \mu\text{M}$ , θεωρώντας τα 0,625μM ως όριο ποσοτικοποίησης LOQ ( $\text{LOD} = \text{LOQ}/3,3$ ).



**Εικόνα 31: Βολταμμογραφήματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αδενίνης – γουανίνης.**

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).



**Εικόνα 32: Καμπύλη αναφοράς αδενίνης - γουανίνης.**

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s, βήμα προσθήκης: 0,625μM 1,25μM 2,5μM 3,75μM 5μM 7,5μM 10μM 15μM και 20 μM).

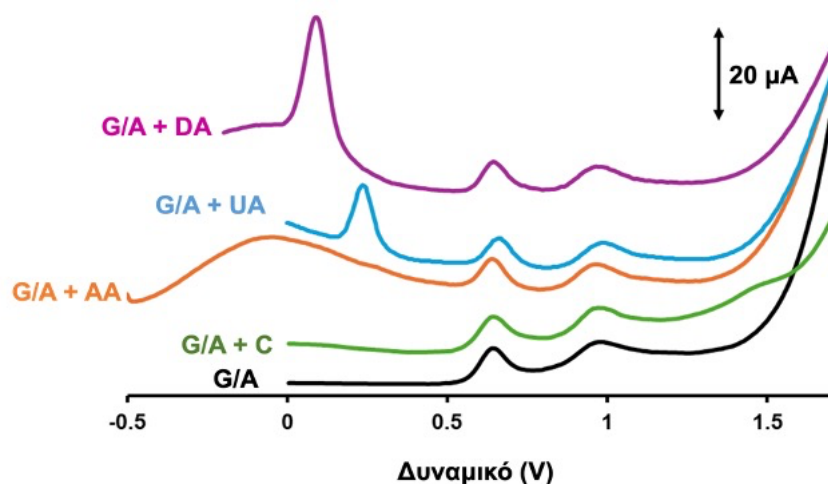
Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, %RSD) μεταξύ 10 διαδοχικών μετρήσεων του ίδιου δείγματος κάτω από ίδιες συνθήκες με την χρήση του ίδιου αισθητήρα και το %RSD μεταξύ διαφορετικών αισθητήρων.

Η %RSD των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων στον ίδιο αισθητήρα βρέθηκε ίση με 5,9% για την αδενίνη και 4,3 % για την γουανίνη σε συγκέντρωση 5μM αδενίνης-γουανίνης (αριθμός μετρήσεων,  $n=8$ ) με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s. Ενώ η %RSD ανάμεσα σε πέντε διαφορετικούς αισθητήρες υπολογίστηκε ίση με 7,8% για την αδενίνη και 6,6% για την γουανίνη σε συγκέντρωση 5μM αδενίνης-γουανίνης ( $n=8$ ) με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s.

### **6.2.3 Μελέτη παρεμποδίσεων**

#### **6.2.3.1 Μελέτη παρεμπόδισης ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης, ντοπαμίνης και κυτοσίνης**

Μελετήθηκε η επίδραση 5μM αδενίνης – γουανίνης σε διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), χρόνο προσυγκέντρωσης 30s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V με διαφορική παλμική βολταμετρία. Προστέθηκαν 100μM ασκορβικού οξέος (AA), 100μM ουρικού οξέος (UA), 100μM ουρίας (U), 100μM γλυκόζης (GLU), 100μM ντοπαμίνης (DA) και 100μM κυτοσίνης (C). Από το βολταμμογράφημα στην εικόνα 33 παρατηρούμε ότι δεν επηρεάστηκε ο προσδιορισμός αδενίνης και γουανίνης σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ενώ το σχετικό σφάλμα ήταν μικρότερο από  $\pm 10\%$ .

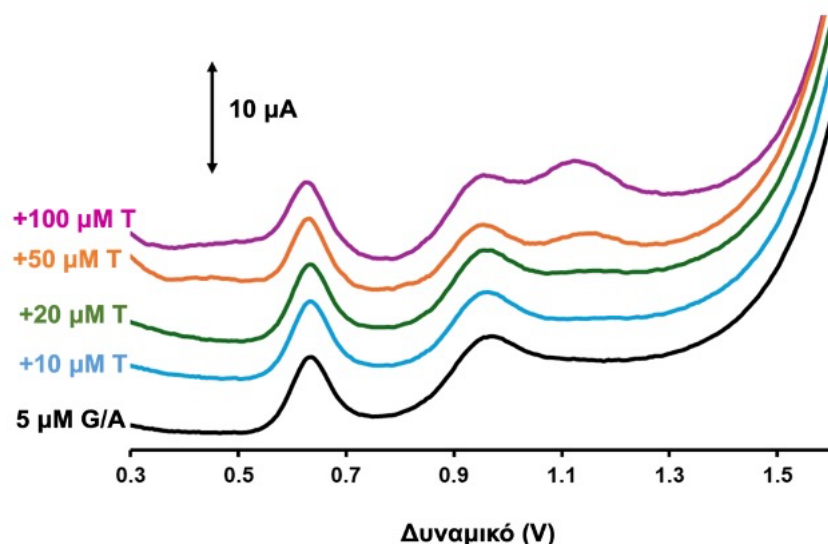


**Εικόνα 33:** Επίδραση ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης, ντοπαμίνης και κυτοσίνης σε 5μM αδερίνης – γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).

### 6.2.3.2 Μελέτη παρεμπόδισης θυμίνης

Μελετήθηκε η επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων θυμίνης σε 5μM αδερίνης – γουανίνης σε διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), με χρόνο προσυγκέντρωσης 30s και δυναμικό προσυγκέντρωσης -0,9V με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Προστέθηκαν διαδοχικά 10μM, 20μM, 50μM, και 100μM θυμίνης. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 34, η κορυφή οξειδωσης της γουανίνης παρέμεινε στατιστικά ανεπηρέαστη, ενώ η κορυφή οξειδωσης της αδερίνης άρχισε να επηρεάζεται από την παρουσία 20 μM θυμίνης κατά -15%, ενώ παρουσία 50μM και 100μM θυμίνης κατά -30% και -35% αντίστοιχα.



**Εικόνα 34:** Επίδραση παρουσίας θυμίνης στο ύψος κορυφών 5μM αδενίνης – γουανίνης.

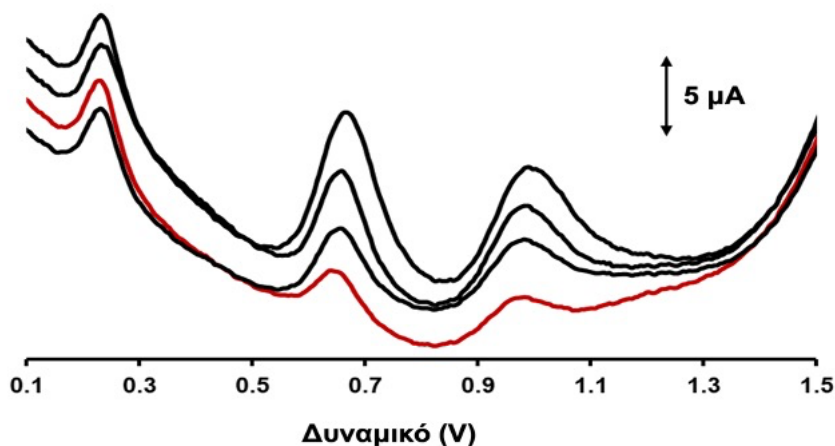
(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).

## 6.2.4 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Ο προσδιορισμός της αδενίνης και της γουανίνης έγινε σε επιμολυσμένο δείγμα ούρων και σε επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν χρειάστηκαν κάποια κατεργασία εκτός από την αραιώσή τους. Η συγκέντρωση της αδενίνης και της γουανίνης στα επιμολυσμένα δείγματα υπολογίσθηκαν με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων, ενώ υπολογίσθηκαν και οι αντίστοιχες % ανακτήσεις (%R) στα δείγματα.

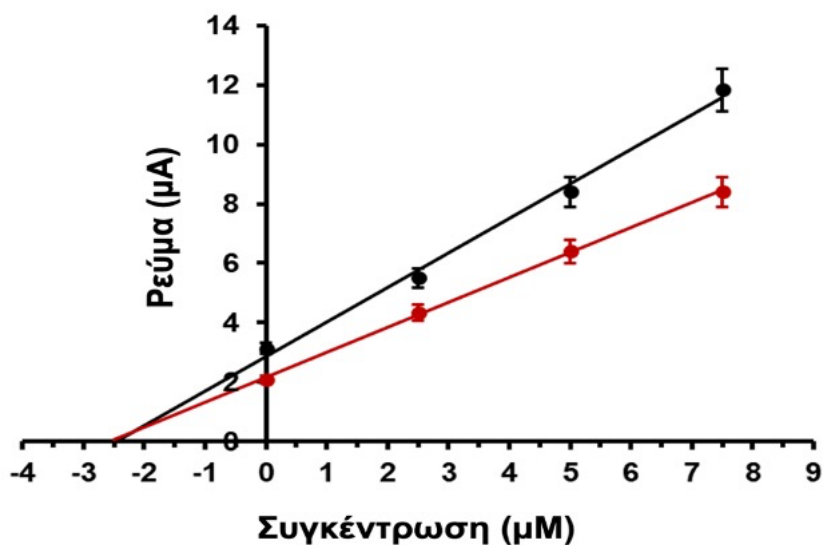
### 6.2.4.1 Επιμολυσμένο δείγμα ούρων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης σε δείγμα ούρων, 100μL δείγματος ούρων αραιώθηκαν με 9900 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7). Το δείγμα ούρων επιμολύνθηκε με αδενίνη και γουανίνη τελικής συγκέντρωσης 2,5μM. Το επιμολυσμένο δείγμα υποβλήθηκε σε ανάλυση με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Η ανάκτηση (% recovery, R) ήταν 103% για την αδενίνη και 98% για την γουανίνη. Τα βολταμμογραφήματα καθώς και η καμπύλη σταθερής προσθήκης που λήφθηκε παρουσιάζονται στην εικόνα 35 και στην εικόνα 36 αντίστοιχα.



**Εικόνα 35:** Βολταμμογραφήματα προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα ούρων με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το βολταμμογράφημα των επιμολυσμένων ούρων και με μαύρο οι 3 σταθερές προσθήκες 2,5μM αδενίνης – γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).

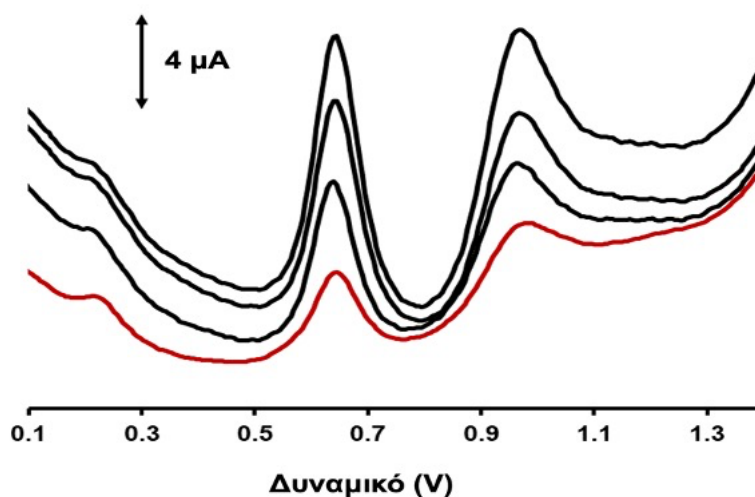


**Εικόνα 36:** Καμπύλες γνωστής προσθήκης προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολύσμένο δείγμα ούρων. Με κόκκινο χρώμα η καμπύλη προσδιορισμούς της αδενίνης και με μαύρο χρώμα της γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).

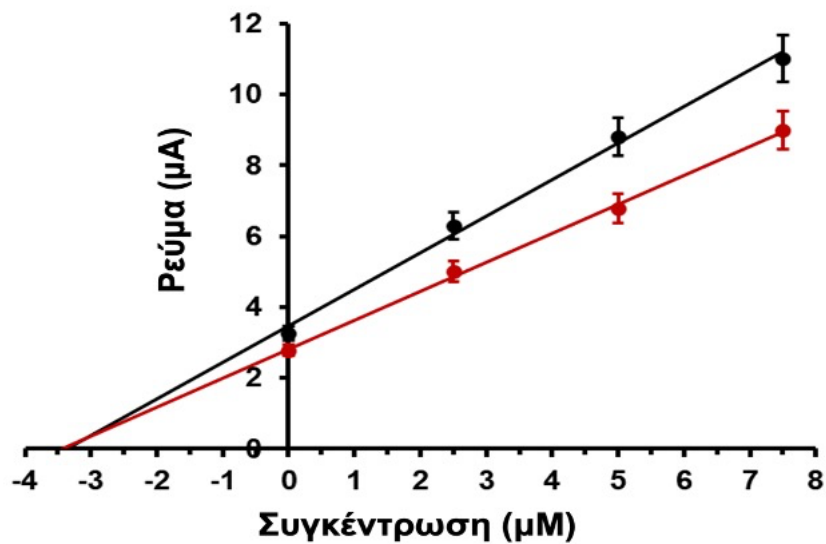
#### 6.2.4.2 Επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης σε δείγμα πλάσματος, 100μL δείγματος πλάσματος αραιώθηκαν με 9900 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7) και το δείγμα πλάσματος επιμολύνθηκε με αδενίνη και γουανίνη τελικής συγκέντρωσης 3,5μM. Το επιμολυσμένο δείγμα υποβλήθηκε σε ανάλυση με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Η ανάκτηση (% recovery, R) ήταν 98% για την αδενίνη και 96% για την γουανίνη. Τα βολταμμογραφήματα καθώς και η καμπύλη καμπύλη σταθερής προσθήκης που λήφθηκε παρουσιάζονται στην εικόνα 37 και στην εικόνα 38 αντίστοιχα.



Εικόνα 37: Βολταμμογραφήματα προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολυσμένο δείγμα πλάσματος με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το βολταμμογράφημα του επιμολυσμένου πλάσματος και με μαύρο οι 3 σταθερές προσθήκες 2,5μM αδενίνης – γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).



**Εικόνα 38:** Καμπύλες γνωστής προσθήκης προσδιορισμού αδενίνης και γουανίνης σε επιμολύσμένο δείγμα πλάσματος. Με κόκκινο χρώμα η καμπύλη προσδιορισμούς της αδενίνης και με μαύρο χρώμα της γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7), δυναμικό προσυγκέντρωσης:-0,9V, χρόνος προσυγκέντρωσης 30s).



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΠΑΛΜΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΟΞΕΙΔΙΟ ΧΑΛΚΟΥ**

### **7.1 Αρχή μεθόδου προσδιορισμού**

Για το προσδιορισμός της κρεατινίνης χρησιμοποιήθηκαν 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια που εκτυπώθηκαν από το νημάτιο που είχε ενσωματωμένο οξείδιο χαλκού (Cu/PLA/CB). Ο προσδιορισμός της κρεατινίνης στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή της με τα ιόντα χαλκού Cu(II), σχηματίζοντας σύμπλοκο και μειώνοντας τη χαρακτηριστική κορυφή οξειδωσης του χαλκού. Τα ιόντα χαλκού προκύπτουν από την οξειδοαναγωγή του CuO που υπάρχει ενσωματωμένο στο ηλεκτρόδιο κατά τη βολταμμετρική σάρωση από τα αρνητικά προς τα θετικά δυναμικά. Στα αρνητικά δυναμικά το CuO ανάγεται σε μεταλλικό Cu στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και στη συνέχεια κατά τη σάρωση προς τα θετικά δυναμικά οξειδώνεται σε Cu(II). Με την προσθήκη κρεατινίνης που προσροφάται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου σχηματίζεται σύμπλοκο Cu(II)-κρεατινίνης, όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 4, προκαλώντας μείωση του Cu(II) και άρα του ρεύματος κορυφής οξειδωσης του χαλκού.

### **7.2 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού**

Ο ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της κρεατινίνης σε υδατικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (DPV), χρησιμοποιώντας 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια από το νημάτιο CB/PLA με ενσωματωμένο CuO, κατασκευασμένα σύμφωνα με όσο περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 5. Αναλυτικότερα, ο αισθητήρας βυθιζόταν στο διάλυμα του δείγματος, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν 10mL οξικού οξέος, CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa 0,1M (pH=4,5) ως φέρον ηλεκτρολύτης. Εφαρμόστηκε δυναμικό προσρόφησης -1V για 10s υπό ανάδευση και ταχύτητα σάρωσης 50mVs<sup>-1</sup>. Επίσης, εφαρμόστηκε και στάδιο καθαρισμού με δυναμικό 2V για 10s. Μετά το πέρας των 10s η ανάδευση διακοπτόταν, το διάλυμα αφηνόταν σε ηρεμία και ακολουθούσε σάρωση DPV σε

διάστημα από  $-0,2V$  έως  $+0,8V$ . Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε για συγκεντρώσεις  $0\mu M$ ,  $5\mu M$ ,  $10\mu M$ ,  $15\mu M$ ,  $20\mu M$ ,  $25\mu M$ ,  $30\mu M$ ,  $35\mu M$  και  $40\mu M$ . Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ούρα.

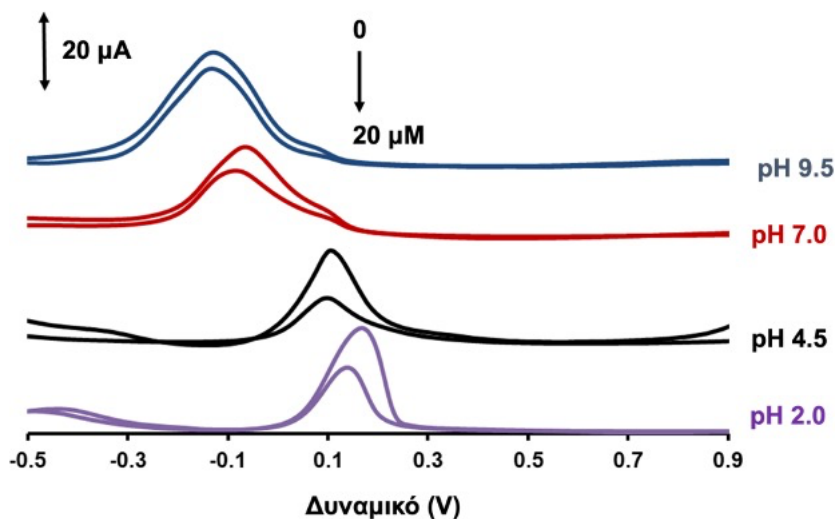
### 7.3 Πειραματικά αποτελέσματα

#### 7.3.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων

##### 7.3.1.1 Επίδραση φέροντος ηλεκτρολύτη

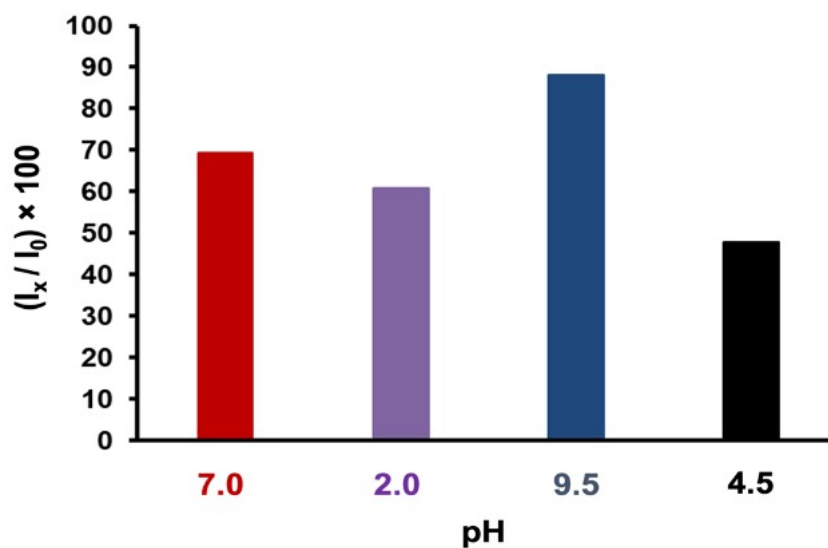
Η μελέτη για την επιλογή του φέροντος ηλεκτρολύτη πραγματοποιήθηκε σε εύρος pH από 2 έως 9,5. Τα τέσσερα διαλύματα ηλεκτρολυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: α) διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, HCl με  $pH=2$ , β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών  $CH_3COOH-CH_3COONa$   $0,1M$  με  $pH=4,5$ , γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών,  $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$   $0,1M$  με  $pH=7$  και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών,  $NH_3-NH_4Cl$   $0,1M$  με  $pH=9,5$ . Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην υποενότητα 6.1, με δυναμικό προσρόφησης  $-1V$  για  $10s$ .

Το δυναμικό οξειδωσης του ρεύματος κορυφής μετατοπιζόταν σε πιο αρνητικές τιμές όσο αυξανόταν το pH, υποδεικνύοντας έτσι, πως η οξειδωση είναι άμεσα εξαρτώμενη από την τιμή του pH του ηλεκτρολύτη (εικόνα 39). Η επιλογή στηρίχτηκε στο λόγο  $(I_x / I_o) * 100$ , όπου  $I_x$  το ρεύμα κορυφής που αντιστοιχεί σε  $20\mu M$  κρεατινίνης και  $I_o$  το ρεύμα κορυφής που αντιστοιχεί σε  $0\mu M$  κρεατινίνης. Μεγαλύτερη πτώση έδειξε το διάλυμα οξικών  $CH_3COOH-CH_3COONa$   $0,1M$  ( $pH=4,5$ ), όπου και τελικά επιλέχθηκαν. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι στους υπόλοιπους δεν υπήρχε καλή γραμμικότητα.



Εικόνα 39: Βολταμμογραφήματα διαφορετικής παλμικής βολταμμετρίας διαλύματος μείγματος 20μM κρεατινίνης και 0μM κρεατινίνης σε διαφορετικούς ηλεκτρολύτες με διαφορετικές τιμές pH α) διάλυμα HCl με pH=2, β) ρυθμιστικό διάλυμα οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M με pH 7 και, δ) ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνιακών,  $\text{NH}_3-\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 M με pH 9,5.

(Συνθήκες: δυναμικό προσυγκέντρωσης: -1V, χρόνος προσυγκέντρωσης: 10s).

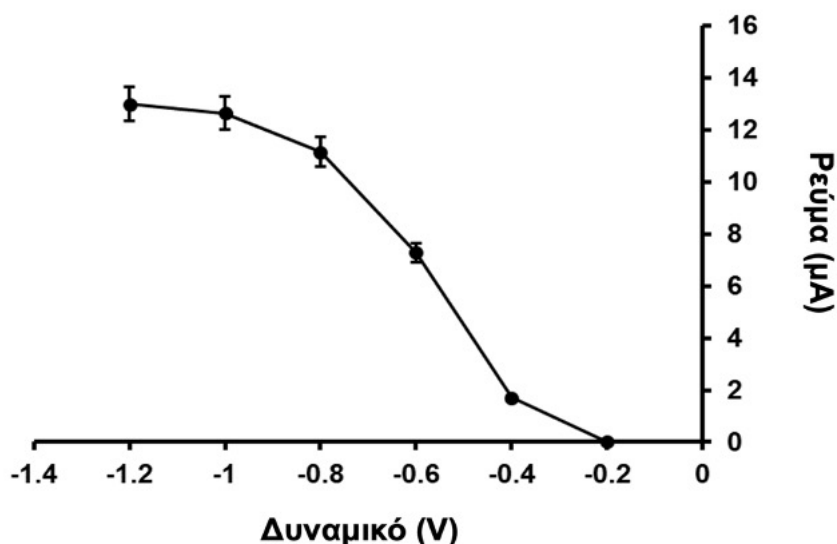


Εικόνα 40: Γράφημα που απεικονίζει την πτώση του σήματος κορυφής οξείδωσης του χαλκού παρουσία 20μM κρεατινίνης σε διάφορους ηλεκτρολύτες με διαφορετικό pH.

### 7.3.1.2 Επίδραση δυναμικού εναπόθεσης

Η επιλογή του καταλληλότερου δυναμικού εναπόθεσης για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε διάστημα από  $-1,2\text{V}$  έως  $-0,2\text{V}$  παρουσιάζεται στην εικόνα 41. Αναλυτικότερα, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα το οποίο περιείχε  $20\mu\text{M}$  κρεατινίνης σε  $10\text{mL}$  διάλυμα οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,1\text{M}$  με  $\text{pH}$   $4,5$ . Ο χρόνος προσυγκέντρωσης ήταν  $10\text{s}$  υπό ανάδευση και χρήση του εξεταζόμενου δυναμικού ως δυναμικό εναπόθεσης, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 6.1.

Παρατηρείται, ότι σε πιο αρνητικά δυναμικά αυξάνεται το ύψος κορυφής  $20\mu\text{M}$  κρεατινίνης, μιας και περισσότερη ποσότητα μεταλλικού  $\text{Cu}$  σχηματίζεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από την αναγωγή του  $\text{CuO}$  και επομένως μεγαλύτερη ποσότητα  $\text{Cu(II)}$  ελευθερώνεται. Σε λιγότερο αρνητικά δυναμικά, το ηλεκτρόδιο δεν είναι αρκετά πολωμένο ώστε να προκαλέσει αναγωγή του  $\text{CuO}$  σε μεταλλικό  $\text{Cu}$  και οξείδωσή του σε  $\text{Cu(II)}$ . Επομένως, το βέλτιστο δυναμικό προσυγκέντρωσης για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης που επιλέχτηκε για τις υπόλοιπες μετρήσεις ήταν το  $-1\text{V}$ .



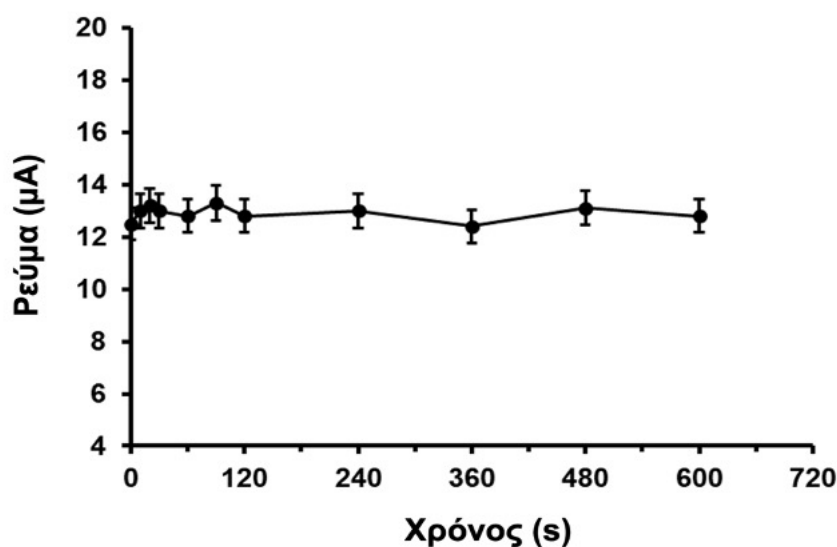
Εικόνα 41: Επίδραση του δυναμικού εναπόθεσης στο ύψος κορυφής του χαλκού παρουσία  $20\mu\text{M}$  κρεατινίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$   $0,1\text{M}$  με  $\text{pH}$   $4,5$ , χρόνος προσυγκέντρωσης:  $10\text{s}$ ).

### 7.3.1.3 Επίδραση χρόνου εναπόθεσης

Άλλη μία παράμετρος που μελετήθηκε για την επίδραση στο ύψος της κορυφής του χαλκού με την προσθήκη κρεατινίνης είναι ο χρόνος εναπόθεσης. Συγκεκριμένα, για την επιλογή του ιδανικότερου χρόνου εναπόθεσης, έγινε μελέτη λαμβάνοντας βολταμμογραφήματα σε εύρος 0-600s υπό ανάδευση και δυναμικό προσυγκέντρωσης -1V. Το διάλυμα περιείχε 20μM κρεατινίνης σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, με την χρήση 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα, τροποποιημένου με οξείδιο του χαλκού.

Στην καμπύλη που φαίνεται στην εικόνα 42, παρατηρείται ότι με αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης το ρεύμα διατηρείται πρακτικά σταθερό, γεγονός το οποίο δείχνει ότι ο χρόνος εναπόθεσης δεν επηρεάζει τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, μιας και ο σχηματισμός του συμπλόκου είναι ταχύτατος. Έτσι, για πρακτικούς λόγους, επιλέχθηκε η τιμή των 10s για χρόνο προσυγκέντρωσης.

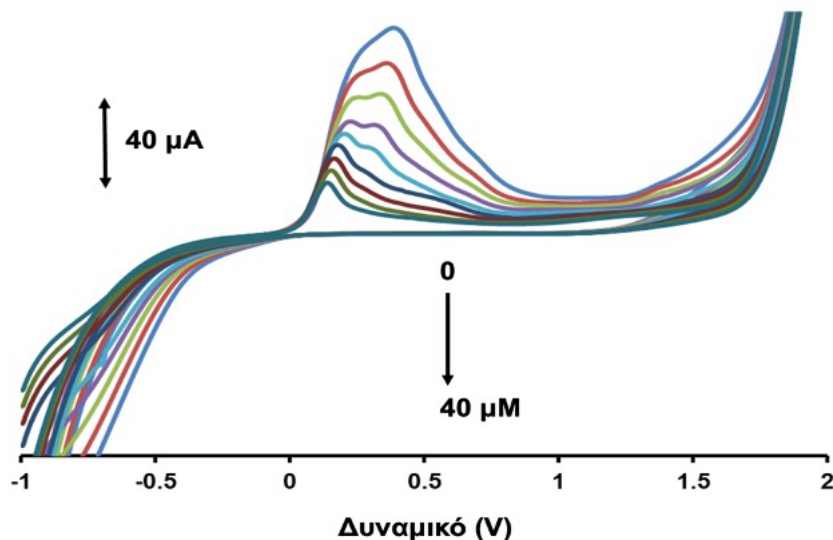


Εικόνα 42: Επίδραση του χρόνου εναπόθεσης στον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε διάλυμα 20μM αδενίνης-γουανίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V).

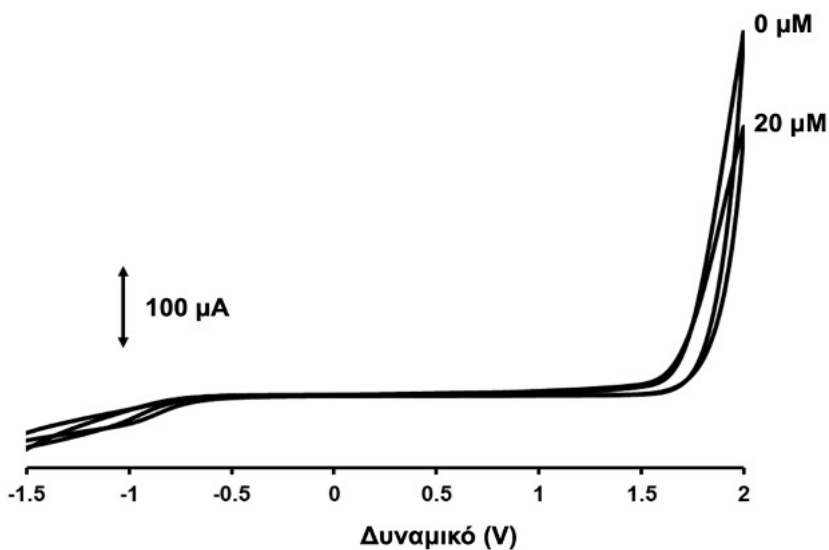
#### 7.3.1.4 Κυκλικό βολταμμετρικό προφίλ

Στην εικόνα 43 απεικονίζεται το βολταμμογράφημα της κυκλικής βολταμμετρίας . Το δυναμικό προσρόφησης είναι  $-1V$  και ο χρόνος προσρόφησης  $10s$ , παρουσία  $10mL$  ρυθμιστικού διαλύματος οξικών  $CH_3COOH-CH_3COONa$   $0,1M$  με  $pH$   $4,5$ . Παρατηρείται, ότι στα αρνητικά δυναμικά το  $CuO$  ανάγεται σε μεταλλικό  $Cu$  στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και στη συνέχεια κατά τη σάρωση προς τα θετικά δυναμικά οξειδώνεται σε  $Cu(II)$ . Με την προσθήκη κρεατινίνης σχηματίζεται σύμπλοκο  $Cu(II)$ -κρεατινίνη, προκαλώντας μείωση του  $Cu(II)$  και άρα του σήματος οξείδωσης. Άρα, αύξηση της συγκέντρωσης της κρεατινίνης έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση της κορυφής οξείδωσης του χαλκού. Αντίθετα, τα 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αιθάλης που δεν περιείχαν  $CuO$  δεν μπορούσαν να προσδιορίσουν την κρεατινίνη (εικόνα 44).



**Εικόνα 43:** Κυκλικό βολταμμογράφημα της κρεατινίνης σε 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια Cu/CB/PLA.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).



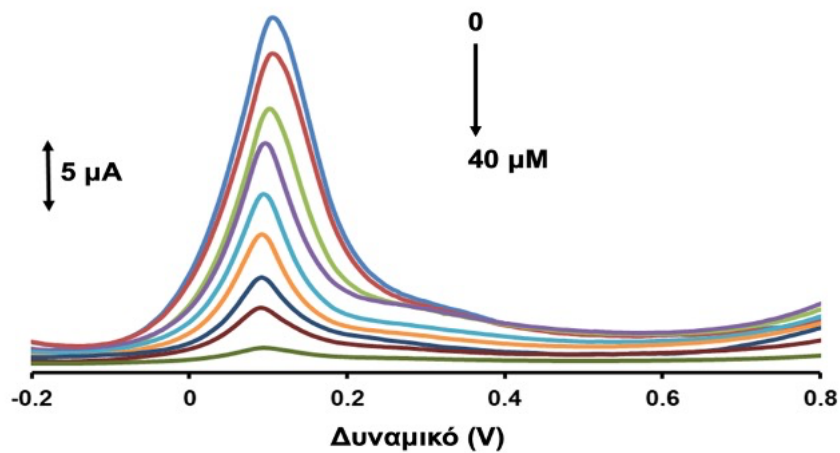
**Εικόνα 44:** Κυκλικό βολταμμογράφημα της κρεατινίνης σε 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια CB/PLA.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).

### 7.3.2 Καμπύλη αναφοράς

Η καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης μαζί με τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στις εικόνες 46 και 45. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κρεατινίνης χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0μM 5μM 10μM 15μM 20μM 25μM 30μM 35μM και 40 μM με χρόνο προσυγκέντρωσης 10s,

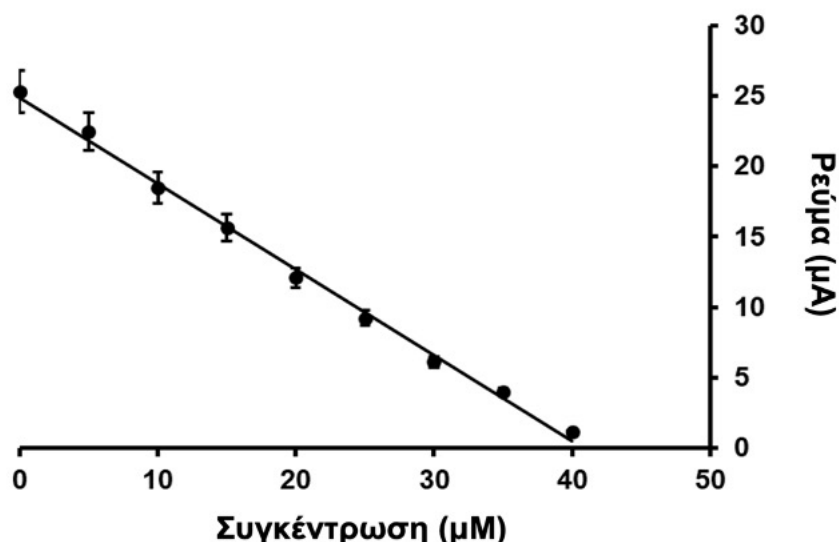
δυναμικό προσυγκέντρωσης -1V, διάλυμα οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5 και εφαρμογή διαφορικής παλμικής βολταμετρίας. Επίσης, εφαρμόστηκε και στάδιο καθαρισμού με δυναμικό 2V για 10s. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 47, και η κρεατινίνη έχει πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2=0,996$ . Το όριο ανίχνευσης είναι  $\text{LOD}=1,5\mu\text{M}$  και υπολογίζεται θεωρώντας τα  $5\mu\text{M}$  ως όριο ποσοτικοποίησης  $\text{LOQ}$  ( $\text{LOD} = \text{LOQ}/3,3$ ).



**Εικόνα 45: Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις  $0\mu\text{M}$   $5\mu\text{M}$   $10\mu\text{M}$   $15\mu\text{M}$   $20\mu\text{M}$   $25\mu\text{M}$   $30\mu\text{M}$   $35\mu\text{M}$  και  $40\mu\text{M}$ .**

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης: -1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).





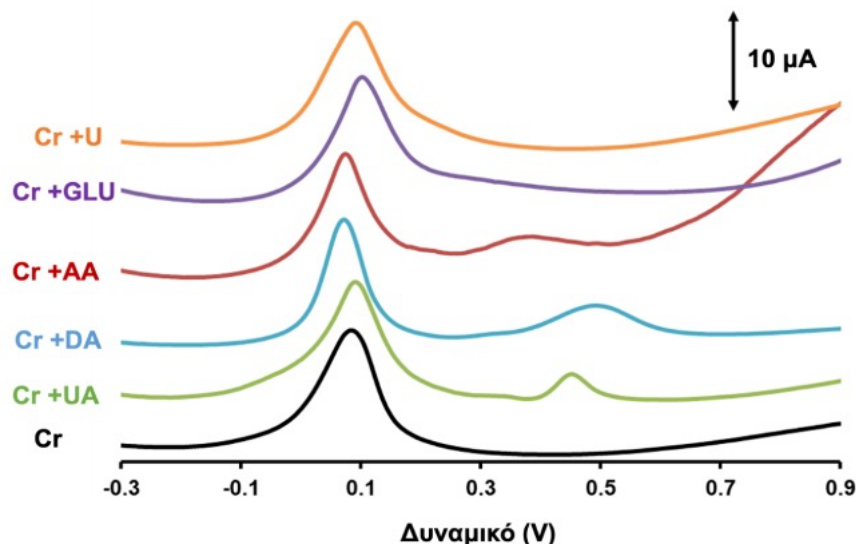
**Εικόνα 46:** Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s, βήμα προσθήκης: 0μM 5μM 10μM 15μM 20μM 25μM 30μM 35μM και 40 μM).

Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση % RSD για 8 μετρήσεις στον ίδιο αισθητήρα και βρέθηκε ίση με 5,6% και μεταξύ 5 διαφορετικών αισθητήρων ίση με 8,9% σε συγκέντρωση 20μM κρεατινίνης.

### 7.3.3 Μελέτη παρεμπόδισης ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, ντοπαμίνης και γλυκόζης

Μελετήθηκε η επίδραση ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, ντοπαμίνης και γλυκόζης στον προσδιορισμό της κρεατινίνης, σε διάλυμα οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, χρόνο προσυγκέντρωσης 10s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -1V με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Μελετήθηκε η επίδραση 100μM ασκορβικού οξέος (AA), 100μM ουρικού οξέος (UA), 100μM ουρίας, 100μM γλυκόζης και 100μM ντοπαμίνης (DA) σε 20μM κρεατινίνης. Από τα βολταμμογραφήματα στην εικόνα 47 παρατηρούμε ότι δεν επηρεάστηκε ο προσδιορισμός της κρεατινίνης σε αυτές τις συγκεντρώσεις, ενώ το σχετικό σφάλμα ήταν μικρότερο από  $\pm 10\%$ .



**Εικόνα 47:** Επίδραση 100μM ασκορβικού οξέος, ουρικού οξέος, ουρίας, γλυκόζης και ντοπαμίνης στον προσδιορισμό 20μM κρεατινίνης.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).

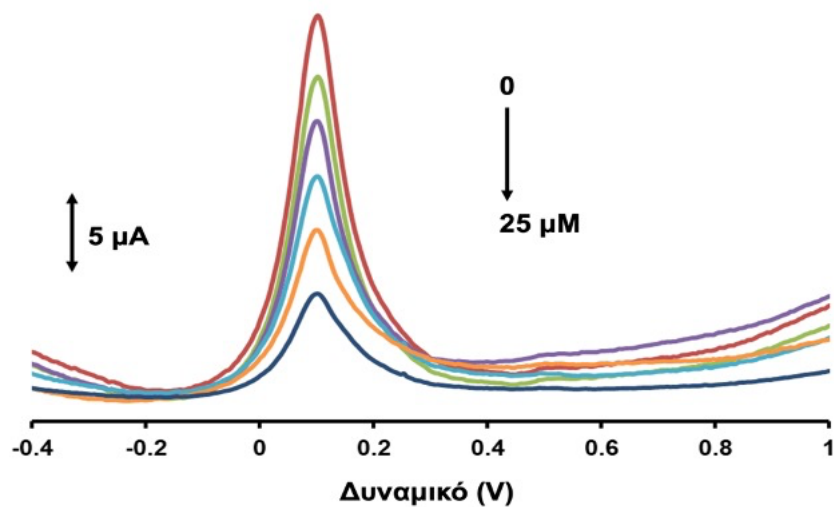
### 7.3.4 Εφαρμογές σε πραγματικά δείγματα – Ανακτήσεις

Ο προσδιορισμός της κρεατινίνης έγινε σε συνθετικά ούρα και σε δείγμα ούρων. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν χρειάστηκε κάποια κατεργασία εκτός από την αραιώσή του. Η συγκέντρωση της κρεατινίνης στα δείγματα υπολογίστηκε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων, ενώ υπολογίσθηκαν και οι αντίστοιχες % ανακτήσεις (%R) στα δείγματα.

#### 7.3.4.1 Προσδιορισμός κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα

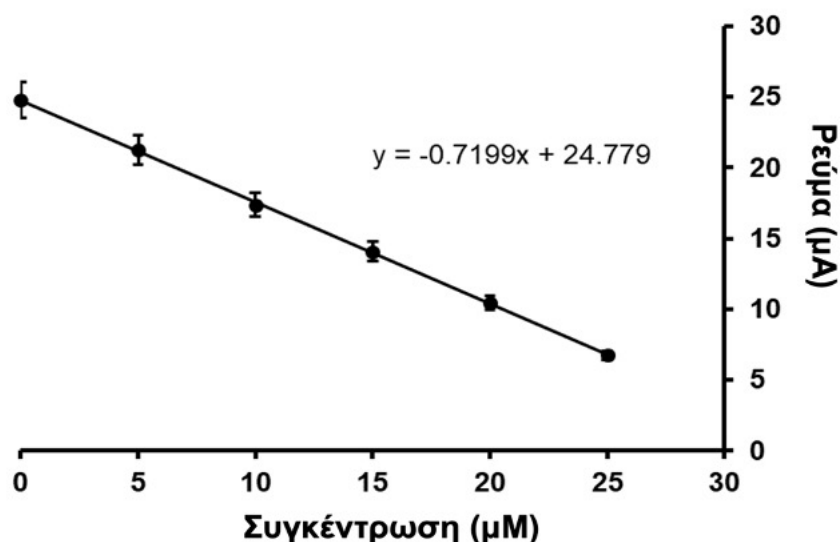
Για την παρασκευή συνθετικών ούρων, απουσία κρεατινίνης, ζυγίστηκαν 2,427g ουρίας, 0,034g ουρικού οξέος, 0,297g of  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 0,634g  $\text{NaCl}$ , 0,450  $\text{KCl}$ , 0,161g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,089g  $\text{CaCl}_2$ , 0,100g of  $\text{MgSO}_4$ , 0,034g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,003g  $\text{NaC}_2\text{O}_4$ , 0,258g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,100g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , και 0,011g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και διαλύθηκαν σε 200mL δισαπτεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, 50μL από συνθετικά ούρα, προστέθηκαν στην κυβελίδα που περιείχε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5 και ακολούθησαν προσθήκες κρεατινίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο προσδιορισμός κρεατινίνης έγινε με διαφορική παλμική

βολταμμετρία εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 10s, δυναμικό προσυγκέντρωσης -1V. Το φυσιολογικό επίπεδο κρεατινίνης στα ούρα κυμαίνεται μεταξύ 20-320 mg/dL, δηλαδή 1,8 - 28,8mM. Οι συγκεντρώσεις κρεατινίνης στα ούρα για τον πληθυσμό των ΗΠΑ κυμαίνεται σε εύρος 30-300 mg/dL, δηλαδή 2,6 mM - 26,5 mM, ενώ το 8% των δειγμάτων ήταν λιγότερο από 2,65 mM και το 3% είχε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 26,5 mM. Επιπλέον, σε μια μελέτη που αφορά την χρόνια νεφρική νόσο (XNN), η κρεατινίνη ούρων εκτιμήθηκε ότι είναι περίπου 80-95 mg/dL, δηλαδή 7,1-8,4 mM. [88]



**Εικόνα 48:** Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν σε συνθετικά ούρα παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις από 0-25μM.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).

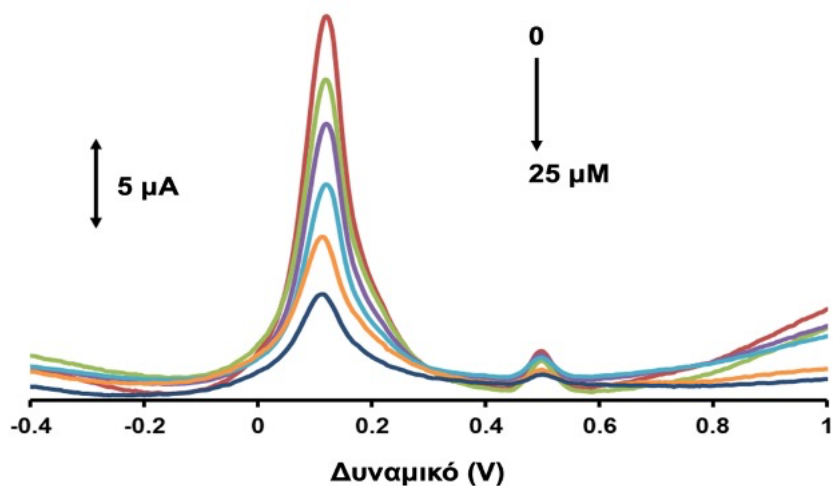


**Εικόνα 49:** Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s).

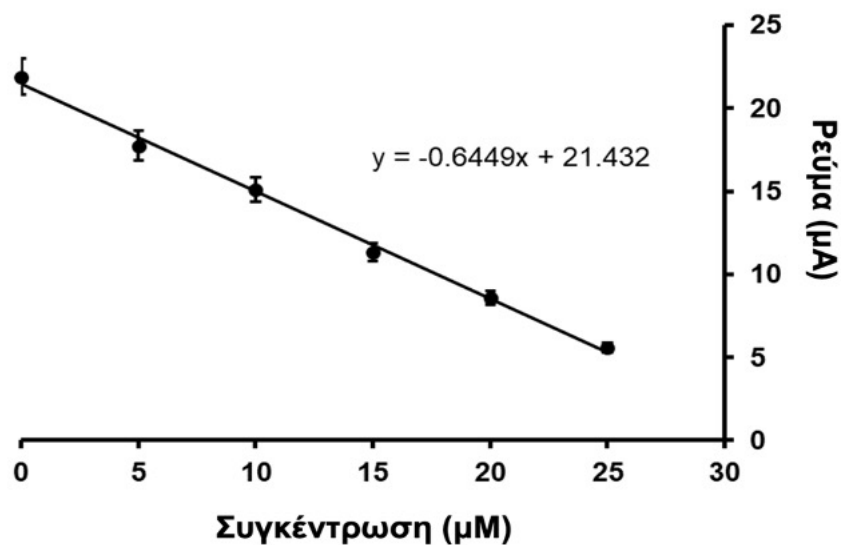
#### 7.3.4.2 Προσδιορισμός κρεατινίνης σε δείγμα ούρων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κρεατινίνης σε δείγμα ούρων, 50μL από τα ούρα προστέθηκαν στην κυψελίδα που περιείχε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5 και ακολούθησαν προσθήκες διαλύματος κρεατινίνης συγκεντρώσεων 0μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM και 25μM. Η ευαισθησία σε εύρος συγκεντρώσεων 0-25 μM σε σύγκριση με τα συνθετικά ούρα είναι 89,6%, όπως προκύπτει από τον λόγο των κλίσεων των δύο καμπυλών στα ούρα και στα συνθετικά ούρα.



**Εικόνα 50:** Βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν σε δείγμα ούρα παρουσία κρεατινίνης με συγκεντρώσεις από 0-25μΜ.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s, βήμα προσθήκης: 0μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM και 25μM).



**Εικόνα 51:**Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού κρεατινίνης σε συνθετικά ούρα.

(Συνθήκες: ηλεκτρολύτης:  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1M με pH 4,5, δυναμικό προσυγκέντρωσης:-1V, χρόνος προσυγκέντρωσης 10s, βήμα προσθήκης: 0μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM και 25μM).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή, κατασκευάστηκαν αγώγιμα πολυμερικά νημάτια τροποποιημένα με νανοσωματίδια από τα οποία εκτυπώθηκαν με τρισδιάστατη εκτύπωση ηλεκτροχημικοί αισθητήρες, οι οποίοι εφαρμόστηκαν στον ταυτόχρονο προσδιορισμό αδενίνης και γουανίνης καθώς, επίσης, και στον προσδιορισμό της κρεατινίνης με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Μετά την βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων, η εκλεκτικότητα των μεθόδων μελετήθηκε με την συνύπαρξη άλλων συστατικών τα οποία μπορούν να εμποδίσουν την πρακτική εφαρμογή των προτεινόμενων αισθητήρων και εξετάστηκε και η ακρίβεια των μεθόδων με την εφαρμογή τους σε πραγματικά δείγματα υπολογίζοντας την περιεκτικότητα των μελετώμενων βιοδεικτών σε αυτά με την χρήση της μεθόδου σταθερής προσθήκης (ώστε να μετριάσει η επιρροή της μήτρας) και τον επακόλουθο υπολογισμό της ανάκτησης.

Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αδενίνης και γουανίνης με διαφορική παλμική βολταμμετρία και την χρήση 3D εκτυπωμένων ηλεκτροχημικών αισθητήρων CB/PLA μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν διάφοροι παράμετροι της βολταμμετρικής μεθόδου, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου και του δυναμικού προσυγκέντρωσης και του pH του φέροντος ηλεκτρολύτη. Πιο συγκεκριμένα, ως χρόνος προσυγκέντρωσης επιλέχθηκαν τα 30s και δυναμικό προσυγκέντρωσης τα -0,9V, ενώ ως φέρον ηλεκτρολύτη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης επιλέχθηκε το διάλυμα φωσφορικού οξέος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH=7). Επίσης, μελετήθηκε και η επίδραση του ασκορβικού οξέος, του ουρικού οξέος, της ουρίας, της γλυκόζης, της ντοπαμίνης και της κυτοσίνης, όπου παρατηρήθηκε ότι δεν επηρεάστηκε ο προσδιορισμός της αδενίνης και της γουανίνης, ενώ το σχετικό σφάλμα ήταν μικρότερο από  $\pm 10\%$ . Ωστόσο, η μελέτη επίδρασης της θυμίνης έδειξε πως η κορυφή της γουανίνης παρέμεινε στατιστικά ανεπηρέαστη, ενώ η κορυφή 5μM αδενίνης άρχισε να επηρεάζεται κατά -15% παρουσία 20μM θυμίνης και κατά -30% και -35% παρουσία 50μM και 100μM θυμίνης, αντίστοιχα. Τέλος, η μέθοδος που αναπτύχθηκε παρουσίασε πολύ χαμηλό όρια ανίχνευσης ίσα με 0,19 μM για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης.

Επίσης, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της βολταμετρικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης με διαφορική παλμική βολταμετρία χρησιμοποιώντας 3D εκτυπωμένους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες από νημάτιο CB/PLA με ενσωματωμένο CuO. Ο προσδιορισμός της κρεατινίνης στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή της με τα ιόντα χαλκού Cu(II), σχηματίζοντας σύμπλοκο και μειώνοντας τη χαρακτηριστική κορυφή οξειδωσης του χαλκού. Στην μέθοδο χρησιμοποιήθηκε CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa 0,1M (pH=4,5) ως φέρον ηλεκτρολύτης, ενώ εφαρμόστηκε δυναμικό προσρόφησης -1V για 10s και στάδιο καθαρισμού στα 2V για 10s. Επιπλέον, δεν επηρεάστηκε ο προσδιορισμός της κρεατινίνης από το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, την ουρία, την ντοπαμίνη και την γλυκόζη, παρουσιάζοντας σχετικό σφάλμα μικρότερο από ±10%. Τέλος, η μέθοδος είχε πολύ χαμηλό LOD ίσο με 1,5 μM.

Συμπερασματικά, οι αισθητήρες που κατασκευάστηκαν στην εργασία αυτή, αποδείχθηκαν κατάλληλοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αδενίνης και της γουανίνης αλλά και της κρεατινίνης σε πραγματικά δείγματα, όπως ούρα και πλάσμα αίματος. Οι αισθητήρες μπορούν να ενσωματωθούν επιτυχώς σε ολοκληρωμένες τρισδιάστατα εκτυπωμένες διατάξεις, απλοποιώντας ακόμη περισσότερο την πειραματική οργανολογία και την ανάλυση στο πεδίο. Τέλος, οι 3D εκτυπωμένοι αισθητήρες είναι φιλικόι προς το περιβάλλον, απαιτούν απλή και χαμηλού κόστους οργανολογία κατασκευής και παράλληλα παρουσιάζουν πολύ καλή ευαισθησία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhou, J. (2024). Electrospun biosensors for biomarker detection. *Colloid and Interface Science Communications*.
2. Wahab, M. R. A., Palaniyandi, T., Ravi, M., Viswanathan, S., Baskar, G., Surendran, H., Gangadharan, S. G. D., & Rajendran, B. K. (2023). Biomarkers and biosensors for early cancer diagnosis, monitoring and prognosis. *Pathology - Research and Practice*, 250, 154812. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154812>
3. Yadav, N., Narang, J., Chhillar, A. K., Rana, J. S., Mohd Siddique, M. U., Kenawy, E.-R., Alkahtani, S., Ahsan, M. N., Nayak, A. K., & Hasnain, M. S. (2024). Diagnostic methods employing kidney biomarkers clinching biosensors as promising tools. *Sensors International*, 5, 100253. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100253>
4. Vinoth, V., Kaimal, R., Selvamani, M., Michael, R., Pugazhenthiran, N., Mangalaraja, R. V., Valdés, H., & Anandan, S. (2023). Synergistic impact of nanoarchitected GQDs-AgNCs(APTS) modified glassy carbon electrode in the electrochemical detection of guanine and adenine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 934, 117302. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2023.117302>
5. Chetankumar, K., Swamy, B. E. K., & Naik, H. S. B. (2021). MgO and MWCNTs amplified electrochemical sensor for guanine, adenine and epinephrine. *Materials Chemistry and Physics*, 267, 124610. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124610>
6. Ng, K. L., & Khor, S. M. (2017). Graphite-Based Nanocomposite Electrochemical Sensor for Multiplex Detection of Adenine, Guanine, Thymine, and Cytosine: A Biomedical Prospect for Studying DNA Damage. *Analytical Chemistry*, 89(18), 10004–10012. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02432>
7. Zhou, J., Li, S., Noroozifar, M., & Kerman, K. (2020). Graphene Oxide Nanoribbons in Chitosan for Simultaneous Electrochemical Detection of Guanine, Adenine, Thymine and Cytosine. *Biosensors*, 10(4), 30. <https://doi.org/10.3390/bios10040030>
8. Wang, S., Ferrag, C., Noroozifar, M., & Kerman, K. (2020). Simultaneous Determination of Four DNA bases at Graphene Oxide/Multi-Walled Carbon Nanotube Nanocomposite-Modified Electrode. *Micromachines*, 11(3), 294. <https://doi.org/10.3390/mi11030294>



9. Huang, K.-J., Niu, D.-J., Sun, J.-Y., Han, C.-H., Wu, Z.-W., Li, Y.-L., & Xiong, X.-Q. (2011). Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.014>
10. Goyal, R. N., Chatterjee, S., & Bishnoi, S. (2009). Voltammetric Determination of 2'-Deoxyadenosine and Adenine in Urine of Patients with Hepatocellular Carcinoma Using Fullerene-C<sub>60</sub>-modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 21(12), 1369–1378. <https://doi.org/10.1002/elan.200804533>
11. Abbaspour, A., & Noori, A. (2008). Electrochemical studies on the oxidation of guanine and adenine at cyclodextrin modified electrodes. *The Analyst*, 133(12), 1664. <https://doi.org/10.1039/b806920d>
12. Shantharaja, Nemakal, M., Giddaerappa, Gopal Hegde, S., & Koodlur Sannegowda, L. (2022). Novel biocompatible amide phthalocyanine for simultaneous electrochemical detection of adenine and guanine. *Microchemical Journal*, 175, 107223. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107223>
13. Papavasileiou, A. V., Trachioti, M. G., Hrbac, J., & Prodromidis, M. I. (2022). Simultaneous determination of guanine and adenine in human saliva with graphite sparked screen-printed electrodes. *Talanta*, 239, 123119. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123119>
14. Anu Prathap, M. U., Srivastava, R., & Satpati, B. (2013). Simultaneous detection of guanine, adenine, thymine, and cytosine at polyaniline/MnO<sub>2</sub> modified electrode. *Electrochimica Acta*, 114, 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.064>
15. Wang, M., Guo, H., Xue, R., Guan, Q., Zhang, J., Zhang, T., Sun, L., Yang, F., & Yang, W. (2021). A novel electrochemical sensor based on MWCNTs-COOH/metal-covalent organic frameworks (MCOFs)/Co NPs for highly sensitive determination of DNA base. *Microchemical Journal*, 167, 106336. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106336>
16. Wang, P., Wu, H., Dai, Z., & Zou, X. (2011). Simultaneous detection of guanine, adenine, thymine and cytosine at choline monolayer supported multiwalled carbon nanotubes film. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(7), 3339–3345. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.011>
17. Huang, K.-J., Wang, L., Wang, H.-B., Gan, T., Wu, Y.-Y., Li, J., & Liu, Y.-M.

- (2013). Electrochemical biosensor based on silver nanoparticles–polydopamine–graphene nanocomposite for sensitive determination of adenine and guanine. *Talanta*, 114, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.017>
18. Niedziałkowski, P., Ossowski, T., Zięba, P., Cirocka, A., Rochowski, P., Pogorzelski, S. J., Ryl, J., Sobaszek, M., & Bogdanowicz, R. (2015). Poly-L-lysine-modified boron-doped diamond electrodes for the amperometric detection of nucleic acid bases. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 756, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.08.006>
19. Švorc, L., & Kalcher, K. (2014). Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194, 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.104>
20. Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2015). Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. *Analytical Chemistry*, 87(1), 230–249. <https://doi.org/10.1021/ac5039863>
21. Nguyen, N. X. A., Viet Hai, L., Nguyen, T. K. N., Pham, T. N., Nguyen, T. T., Huynh, L. T. N., Pham, V. V., Nguyen, T. T. T., Thai Hoang, N., & Dai Lam, T. (2021). Efficient nickel or copper oxides decorated graphene–polyaniline interface for application in selective methanol sensing. *RSC Advances*, 11(46), 28573–28580. <https://doi.org/10.1039/D1RA04164A>
22. Yari, A., & Derki, S. (2016). New MWCNT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA-Ag nanocomposite as a novel sensing element of an electrochemical sensor for determination of guanine and adenine contents of DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227, 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.088>
23. Wang, D., Huang, B., Liu, J., Guo, X., Abudukeyoumu, G., Zhang, Y., Ye, B.-C., & Li, Y. (2018). A novel electrochemical sensor based on Cu@Ni/MWCNTs nanocomposite for simultaneous determination of guanine and adenine. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.051>
24. Lu, Y., Luo, L., Ding, Y., Wang, Y., Zhou, M., Zhou, T., Zhu, D., & Li, X. (2015). Electrospun nickel loaded porous carbon nanofibers for simultaneous determination of adenine and guanine. *Electrochimica Acta*, 174, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.05.165>

25. Ensafi, A. A., Jafari-Asl, M., Rezaei, B., & Allafchian, A. R. (2013). Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA based on NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles decorated MWCNTs as a novel electrochemical sensor using adsorptive stripping voltammetry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.028>
26. Arvand, M., Ghodsi, N., & Zanjanchi, M. A. (2016). A new microplatform based on titanium dioxide nanofibers/graphene oxide nanosheets nanocomposite modified screen printed carbon electrode for electrochemical determination of adenine in the presence of guanine. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.055>
27. Fan, Y., Huang, K.-J., Niu, D.-J., Yang, C.-P., & Jing, Q.-S. (2011). TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposite for electrochemical sensing of adenine and guanine. *Electrochimica Acta*, 56(12), 4685–4690. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.114>
28. Zhang, S., Zhuang, X., Chen, D., Luan, F., He, T., Tian, C., & Chen, L. (2019). Simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine using MnO<sub>2</sub> nanosheets and ionic liquid-functionalized graphene combined with a permeation-selective polydopamine membrane. *Microchimica Acta*, 186(7), 450. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3577-4>
29. Wang, G., Shi, G., Chen, X., Yao, R., & Chen, F. (2015). A glassy carbon electrode modified with graphene quantum dots and silver nanoparticles for simultaneous determination of guanine and adenine. *Microchimica Acta*, 182(1–2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1335-1>
30. Geng, X., Bao, J., Huang, T., Wang, X., Hou, C., Hou, J., Samalo, M., Yang, M., & Huo, D. (2019). Electrochemical Sensor for the Simultaneous Detection of Guanine and Adenine Based on a PPyox/MWNTs-MoS<sub>2</sub> Modified Electrode. *Journal of The Electrochemical Society*, 166(6), B498–B504. <https://doi.org/10.1149/2.1221906jes>
31. Yang, T., Yang, R., Chen, H., Nan, F., Ge, T., & Jiao, K. (2015). Electrocatalytic Activity of Molybdenum Disulfide Nanosheets Enhanced by Self-Doped Polyaniline for Highly Sensitive and Synergistic Determination of Adenine and Guanine. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(4), 2867–2872. <https://doi.org/10.1021/am5081716>
32. Wei, Y., Huang, Q.-A., Li, M.-G., Huang, X.-J., Fang, B., & Wang, L. (2011).

- CeO<sub>2</sub> nanoparticles decorated multi-walled carbon nanotubes for electrochemical determination of guanine and adenine. *Electrochimica Acta*, 56(24), 8571–8575. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.07.048>
33. Fang, B., Zhang, W., Wang, G., Liu, H., & Wei, S. (2008). Microwave-assisted preparation of a carbon nanotube/La(OH)<sub>3</sub> nanocomposite, and its application to electrochemical determination of adenine and guanine. *Microchimica Acta*, 162(1–2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0901-1>
34. Shen, Q., & Wang, X. (2009). Simultaneous determination of adenine, guanine and thymine based on β-cyclodextrin/MWNTs modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 632(1–2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.04.009>
35. Wang, Z., Xiao, S., & Chen, Y. (2006). β-Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 589(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.02.014>
36. Deng, C., Xia, Y., Xiao, C., Nie, Z., Yang, M., & Si, S. (2012). Electrochemical oxidation of purine and pyrimidine bases based on the boron-doped nanotubes modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.11.018>
37. Wu, C., Tang, Y., Wan, C., Liu, H., & Wu, K. (2015). Enhanced-oxidation and highly-sensitive detection of acetaminophen, guanine and adenine using NMP-exfoliated graphene nanosheets-modified electrode. *Electrochimica Acta*, 166, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.088>
38. Liu, X., Zhang, L., Wei, S., Chen, S., Ou, X., & Lu, Q. (2014). Overoxidized polyimidazole/graphene oxide copolymer modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, guanine and adenine. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.017>
39. Hasoň, S., Fojt, L., Šebest, P., & Fojta, M. (2009). Improved Electrochemical Detection of Purine Nucleobases at Mechanically Roughened Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 21(3–5), 666–670. <https://doi.org/10.1002/elan.200804437>
40. Zhang, J., Han, D., Wang, S., Zhang, X., Yang, R., Ji, Y., & Yu, X. (2019). Electrochemical detection of adenine and guanine using a three-dimensional WS<sub>2</sub>

- nanosheet/graphite microfiber hybrid electrode. *Electrochemistry Communications*, 99, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.01.007>
41. Ren, S., Wang, H., Zhang, H., Yu, L., Li, M., & Li, M. (2015). Direct electrocatalytic and simultaneous determination of purine and pyrimidine DNA bases using novel mesoporous carbon fibers as electrocatalyst. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 750, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.05.020>
42. Bhuvaneshwari, C., Elangovan, A., Sudhan, N., Vinodhkumar, G., Saravanan, S., Balasubramanian, V., Sharmila, C., & Karuppaiah, S. (2023). A low-cost hybrid GQDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polypyrrole nanocomposite based chemo-sensor for electrochemical non-enzymatic selective determination of creatinine in biological samples. *Microchemical Journal*, 194, 109259. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109259>
43. Domínguez-Aragón, A., Conejo-Dávila, A. S., Zaragoza-Contreras, E. A., & Dominguez, R. B. (2023). Pretreated Screen-Printed Carbon Electrode and Cu Nanoparticles for Creatinine Detection in Artificial Saliva. *Chemosensors*, 11(2), 102. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020102>
44. Raveendran, J., P.E., R., T., R., G. Nair, B., & Satheesh Babu, T. G. (2017). Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.158>
45. Chen, C.-H., & Lin, M. S. (2012). A novel structural specific creatinine sensing scheme for the determination of the urine creatinine. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.043>
46. Gao, X., Gui, R., Guo, H., Wang, Z., & Liu, Q. (2019). Creatinine-induced specific signal responses and enzymeless ratiometric electrochemical detection based on copper nanoparticles electrodeposited on reduced graphene oxide-based hybrids. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.057>
47. Rakesh Kumar, R. K., Shaikh, M. O., & Chuang, C.-H. (2021). A review of recent advances in non-enzymatic electrochemical creatinine biosensing. *Analytica Chimica Acta*, 1183, 338748. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338748>
48. Jadhav, R. B., Patil, T., & Tiwari, A. P. (2024). Trends in sensing of creatinine by electrochemical and optical biosensors. *Applied Surface Science Advances*, 19,

100567. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100567>
49. Fekry, A. M., Abdel-Gawad, S. A., Tammam, R. H., & Zayed, M. A. (2020). An electrochemical sensor for creatinine based on carbon nanotubes/folic acid /silver nanoparticles modified electrode. *Measurement*, 163, 107958. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.107958>
50. Pundir, C. S., Kumar, P., & Jaiwal, R. (2019). Biosensing methods for determination of creatinine: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 707–724. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.031>
51. Teekayupak, K., Aumnate, C., Lomae, A., Preechakasedkit, P., Henry, C. S., Chailapakul, O., & Ruecha, N. (2023). Portable smartphone integrated 3D-Printed electrochemical sensor for nonenzymatic determination of creatinine in human urine. *Talanta*, 254, 124131. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124131>
52. Singh, P., Mandal, S., Roy, D., & Chanda, N. (2021). Facile Detection of Blood Creatinine Using Binary Copper–Iron Oxide and rGO-Based Nanocomposite on 3D Printed Ag-Electrode under POC Settings. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(7), 3446–3458. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c00484>
53. Zahoor, N., Danilenko, U., & Vesper, H. W. (2019). A fully automated high-throughput liquid chromatography tandem mass spectrometry method for measuring creatinine in urine. *Clinical Mass Spectrometry*, 11, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2018.11.002>
54. Liu, Y., Cánovas, R., Crespo, G. A., & Cuartero, M. (2020). Thin-Layer Potentiometry for Creatinine Detection in Undiluted Human Urine Using Ion-Exchange Membranes as Barriers for Charged Interferences. *Analytical Chemistry*, 92(4), 3315–3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05231>
55. Grochocki, W., Markuszewski, M. J., & Quirino, J. P. (2017). Simultaneous determination of creatinine and acetate by capillary electrophoresis with contactless conductivity detector as a feasible approach for urinary tract infection diagnosis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137, 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.032>
56. Panagiotopoulou, M., Beyazit, S., Nestora, S., Haupt, K., & Tse Sum Bui, B. (2015). Initiator-free synthesis of molecularly imprinted polymers by polymerization of self-initiated monomers. *Polymer*, 66, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.04.012>
57. Nur Ashakirin, S., Zaid, M. H. M., Haniff, M. A. S. M., Masood, A., & Mohd Razip

- Wee, M. F. (2023). Sensitive electrochemical detection of creatinine based on electrodeposited molecular imprinting polymer modified screen printed carbon electrode. *Measurement*, 210, 112502. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2023.112502>
58. Han, P., Xu, S., Feng, S., Hao, Y., & Wang, J. (2016). Direct determination of creatinine based on poly(ethyleneimine)/phosphotungstic acid multilayer modified electrode. *Talanta*, 151, 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.017>
59. Lad, U., Khokhar, S., & Kale, G. M. (2008). Electrochemical Creatinine Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21), 7910–7917. <https://doi.org/10.1021/ac801500t>
60. Jayasekhar Babu, P., Tirkey, A., Mohan Rao, T. J., Chanu, N. B., Lalchandama, K., & Singh, Y. D. (2022). Conventional and nanotechnology based sensors for creatinine (A kidney biomarker) detection: A consolidated review. *Analytical Biochemistry*, 645, 114622. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114622>
61. Jankhunthod, S., Kaewket, K., Termsombut, P., Khamdang, C., & Ngamchuea, K. (2023). Electrodeposited copper nanoparticles for creatinine detection via the in situ formation of copper-creatinine complexes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(16), 3231–3242. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04699-3>
62. Mehta, D., Kafle, A., & Nagaiah, T. C. (2023). Flexible electrochemical sensor for highly sensitive and selective non-enzymatic detection of creatinine via electrodeposited copper over polymelamine formaldehyde. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(46), 11103–11109. <https://doi.org/10.1039/D3TB01528A>
63. Ngamchuea, K., Wannapaiboon, S., Nongkhunsan, P., Hirunsit, P., & Fongkaew, I. (2022). Structural and Electrochemical Analysis of Copper-Creatinine Complexes: Application in Creatinine Detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 169(2), 020567. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac5346>
64. Χατζηγιωάννου, Θ.Π.; Κουππάρη, Μ.Α. *Ενόργανη Ανάλυση, Πανεπιστήμιο Αθηνών 2017*, 48-51, 52-57, 58-60, 112, 132, 151, 152.
65. Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 6η έκδοση 2007*, 712-713, 715, 717-718, 721-724, 726-729, 738-743, 805, 818-819, 821-824, 842-845, 848-850, 853-855.
66. Ευσταθίου Κ.Η., Χατζηγιωάννου Θ.Π., *Ενόργανες Τεχνικές αναλύσεως, Τόμος Α, Πανεπιστήμιο Αθηνών, (1998)*. 27, 112-115, 122, 166- 176, 193, 198.
67. Wang, J. *Analytical Electrochemistry, John Wiley & Sons inc. 2006*, 4-6, 69, 77-

- 78, 85-87, 94-96, 115-127.
68. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
69. Molina, Á., Laborda, E., Rogers, E. I., Martínez-Ortiz, F., Serna, C., Limon-Petersen, J. G., Rees, N. V., & Compton, R. G. (2009). Theoretical and experimental study of Differential Pulse Voltammetry at spherical electrodes: Measuring diffusion coefficients and formal potentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 634(2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.07.011>
70. Gomaa, E.A.; Negm, A.; Abu-Qarn, R.M. Cyclic voltammetry study of the electrochemical behavior of vanadyl sulfate in absence and presence of antibiotic. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation* 2018, 125, 645–650.
71. Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9).
72. Michalkiewicz, S., Skorupa, A., & Jakubczyk, M. (2021). Carbon Materials in Electroanalysis of Preservatives: A Review. *Materials*, 14(24), 7630. <https://doi.org/10.3390/ma14247630>
73. Ariño, C., Serrano, N., Díaz-Cruz, J. M., & Esteban, M. (2017). Voltammetric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review. *Analytica Chimica Acta*, 990, 11–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.069>
74. Vyskočil, V., & Barek, J. (2009). Mercury Electrodes—Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 173–188. <https://doi.org/10.1080/10408340903011820>
75. Borrill, A. J., Reily, N. E., & Macpherson, J. V. (2019). Addressing the practicalities of anodic stripping voltammetry for heavy metal detection: A tutorial review. *The Analyst*, 144(23), 6834–6849. <https://doi.org/10.1039/C9AN01437C>
76. McCreery, R. L. (2008). Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, 108(7), 2646–2687. <https://doi.org/10.1021/cr068076m>
77. Zhao, X., Guo, H., Xue, R., Wang, M., Guan, Q., Fan, T., Yang, W., & Yang, W. (2021). Electrochemical sensing and simultaneous determination of guanine and adenine based on covalent organic frameworks/NH<sub>2</sub>-rG/MoS<sub>2</sub> modified glassy



- carbon electrode. *Microchemical Journal*, 160, 105759.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105759>
78. Pan, Z., Guo, H., Liu, B., Sun, L., Chen, Y., Zhang, H., Wu, N., Lu, Z., & Yang, W. (2022). A sensitive electrochemical sensing platform based on nitrogen-rich covalent organic framework for simultaneous detection of guanine and adenine. *Microporous and Mesoporous Materials*, 340, 112030.  
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.112030>
79. García-Miranda Ferrari, A., Carrington, P., Rowley-Neale, S. J., & Banks, C. E. (2020). Recent advances in portable heavy metal electrochemical sensing platforms. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 6(10), 2676–2690. <https://doi.org/10.1039/D0EW00407C>
80. Xiao, F., Zhao, F., Li, J., Liu, L., & Zeng, B. (2008). Characterization of hydrophobic ionic liquid-carbon nanotubes–gold nanoparticles composite film coated electrode and the simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine. *Electrochimica Acta*, 53(26), 7781–7788.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.05.053>
81. Pedrozo-Peñafiel, M. J., López, T., Gutiérrez-Beleño, L. M., Miranda-Andrades, J. R., Maia Da Costa, M. E. H., Larrudé, D. G., & Aucelio, R. Q. (2023). Determination of Creatinine in Urine by Voltammetry and Glassy Carbon Electrode Modified with Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes and Copper. *Electroanalysis*, 35(2), e202200081.  
<https://doi.org/10.1002/elan.202200081>
82. Katseli, V., Economou, A., & Kokkinos, C. (2019). Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications. *Electrochemistry Communications*, 103, 100–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.008>
83. Ambaye, A. D., Kefeni, K. K., Mishra, S. B., Nxumalo, E. N., & Ntsendwana, B. (2021). Recent developments in nanotechnology-based printing electrode systems for electrochemical sensors. *Talanta*, 225, 121951.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121951>
84. Vaněčková, E., Bouša, M., Nováková Lachmanová, Š., Rathouský, J., Gál, M., Sebechlebská, T., & Kolivoška, V. (2020). 3D printed polylactic acid/carbon black electrodes with nearly ideal electrochemical behaviour. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 857, 113745.

- <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113745>
85. Martins, G., Gogola, J. L., Budni, L. H., Janegitz, B. C., Marcolino-Junior, L. H., & Bergamini, M. F. (2021). 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. *Analytica Chimica Acta*, 1147, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.014>
86. Hamzah, H. H., Shafiee, S. A., Abdalla, A., & Patel, B. A. (2018). 3D printable conductive materials for the fabrication of electrochemical sensors: A mini review. *Electrochemistry Communications*, 96, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.09.006>
87. Gross, B., Lockwood, S. Y., & Spence, D. M. (2017). Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. *Analytical Chemistry*, 89(1), 57–70. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04344>
88. Kalasin, S., Sangnuang, P., Khownarumit, P., Tang, I. M., & Surareungchai, W. (2020). Evidence of Cu(I) Coupling with Creatinine Using Cuprous Nanoparticles Encapsulated with Polyacrylic Acid Gel-Cu(II) in Facilitating the Determination of Advanced Kidney Dysfunctions. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(2), 1247–1258. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b01664>