



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη και Εφαρμογές Τρισδιάστατα
Εκτυπωμένων Ηλεκτροχημικών Βιοαισθητήρων**

ΚΟΥΚΟΥΒΙΤΗ ΕΛΕΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Αθήνα
2025

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ανάπτυξη και εφαρμογές τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων»

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Κουκουβίτη Ελένη

A.M.: 002026

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Χρήστος Κόκκινος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Χρήστος Κόκκινος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Χαράλαμπος Προεστός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Χρήστος Κόκκινος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

2. Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

3. Χαράλαμπος Προεστός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

4. Ευάγγελος Γκίκας, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

5. Μάμας Προδρομίδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

6. Δημοσθένης Γκιώκας, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

7. Φώτιος Τσόπελας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 21/1/2025

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη χαμηλού κόστους φορητών ηλεκτροχημικών (βιο)αισθητήρων, αξιοποιώντας την καινοτόμο τεχνολογία της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Οι αισθητήρες που κατασκευάστηκαν εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών, καθώς και βαρέων μετάλλων, που σχετίζονται τόσο με τον κλινικό και περιβαλλοντικό έλεγχο όσο και με την ασφάλεια των τροφίμων.

Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τρισδιάστατα εκτυπωμένοι ηλεκτροχημικοί (βιο)αισθητήρες για τον προσδιορισμό πέντε βιοδεικτών (γλυκόζη, αιθανόλη, γαλακτικό οξύ, ουρικό οξύ και καφεΐνη) στον ανθρώπινο ιδρώτα, με την προοπτική ενσωμάτωσής τους σε έναν φορητό πολυπλεξικό αισθητήρα με τη μορφή βραχιολιού για έξυπνα ρολόγια (smart watches). Ακόμη, σχεδιάστηκαν και δημιουργήθηκαν δύο ολοκληρωμένες βιοδιατάξεις 4-ηλεκτροδίων, μέσω μιας διαδικασίας τρισδιάστατης εκτύπωσης ενός βήματος: μία για τον ταυτόχρονο ενζυματικό προσδιορισμό δύο καρδιακών βιοδεικτών (χολίνη και χοληστερόλη) στο αίμα, και μία για τον ταυτόχρονο ενζυματικό προσδιορισμό δύο δεικτών ποιότητας του οίνου (γλυκόζης και αιθανόλης). Επιπλέον, κατασκευάστηκε ένας αισθητήρας και μία ολοκληρωμένη μικροδιάταξη για τον μη ενζυματικό βολταμετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης στον ιδρώτα, χρησιμοποιώντας μη τοξικά και υδρόφοβα συνθετικά βιομιμητικά υλικά. Αυτά τα υλικά ήταν το βασικό βενζοϊκό σύμπλοκο Fe(III) και μία μεταλλο-οργανική κατασκευή Fe(II) .

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός νέου εύκαμπτου και αγώγιμου νήματος με ενσωματωμένους δύο διαφορετικούς τύπους μεταλλικών νανοσωματιδίων (Bi_2O_3 και CuO) με σκοπό την τρισδιάστατη εκτύπωση έτοιμων προς χρήση, πολυλειτουργικών ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Οι εκτυπωμένοι αισθητήρες χρησίμευσαν για τον άμεσο, εκλεκτικό και ευαίσθητο προσδιορισμό δύο βαρέων μετάλλων (Pb και Cd), που ποσοτικοποιήθηκαν βολταμετρικά μέσω δημιουργίας κραμάτων με τα νανοσωματίδια Bi που παράγονται από το Bi_2O_3 , και δύο βιοδεικτών (γλυκόζη και ουρικό οξύ), οι οποίοι προσδιορίστηκαν μη ενζυματικά. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης εκμεταλλεύτηκε τις ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες του CuO , ενώ το ουρικό οξύ οξειδώθηκε απευθείας στον αισθητήρα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ηλεκτροχημική ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Τρισδιάστατη εκτύπωση, Ηλεκτροχημικοί (Βιο)αισθητήρες, Γλυκόζη, Αιθανόλη, Γαλακτικό οξύ, Ουρικό οξύ, Καφεΐνη, Χολίνη, Χοληστερόλη, Μόλυβδος, Κάδμιο.

ABSTRACT

In this PhD thesis, the development of low-cost, portable electrochemical (bio)sensors was carried out, utilizing the innovative technology of 3D printing. The fabricated sensors were applied for the detection and quantification of biomarkers, as well as heavy metals, related to both clinical and environmental monitoring and food safety.

In particular, 3D printed electrochemical (bio)sensors for the determination of five biomarkers (glucose, ethanol, lactic acid, uric acid and caffeine) in human sweat, were fabricated with the prospect of integrating them into a wearable multiplex sensor in the form of a bracelet for smart watches. Furthermore, two 4-electrode biochips were designed and produced through a single-step 3D printing process: one for the simultaneous enzymatic determination of two cardiac biomarkers (choline and cholesterol) in blood, and one for the simultaneous enzymatic determination of two wine quality markers (glucose and ethanol). In addition, a sensor and an integrated microdevice for the non-enzymatic voltammetric determination of glucose in sweat was developed using non-toxic biomimetic materials. These materials were: the basic Fe(III) benzoate complex and a Fe(II) metal-organic framework.

Finally, the synthesis of a novel lab-made flexible and conductive filament with integrated two different types of metallic nanoparticles (Bi_2O_3 and CuO) was produced for the 3D printing of ready-to-use, multiplexed electrochemical sensors. The 3D printed sensors were used for the direct, selective and sensitive determination of two heavy metals (Pb and Cd), quantified voltammetrically through alloy formation with Bi nanoparticles produced from Bi_2O_3 , and two biomarkers (glucose and uric acid), determined in enzymatic-free modes. The determination of glucose took advantage of the electrocatalytic properties of CuO , while uric acid was directly oxidized on the sensor.

SUBJECT AREA: Electrochemical analysis

KEYWORDS: 3D Printing, Electrochemical (Bio)sensors, Glucose, Ethanol, Lactic Acid, Uric Acid, Caffeine, Choline, Cholesterol, Lead, Cadmium.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	29
ΜΕΡΟΣ Ι	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΑΡΧΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	
2.1 Εισαγωγή	33
2.2 Ηλεκτρική διπλοστιβάδα	34
2.3 Ηλεκτροδιακές διεργασίες	35
2.4 Γαλβανικά και ηλεκτρολυτικά στοιχεία	36
2.5 Ρεύματα στα ηλεκτροχημικά στοιχεία	39
2.6 Μεταφορά μάζας στα ηλεκτροχημικά στοιχεία	41
2.7 Είδη ηλεκτροαναλυτικών μεθόδων	41
2.8 Αμπερομετρία	42
2.8.1 Αρχές της αμπερομετρίας	43
2.8.2 Χρονοαμπερομετρία	43
2.8.3 Χαρακτηριστικά των αμπερομετρικών μετρήσεων	45
2.9 Βολταμμετρία	46
2.9.1 Κυκλική βολταμμετρία και βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης	46
2.9.2 Παλμική βολταμμετρία	48
2.9.2.1 Βολταμμετρία κανονικού παλμού	49
2.9.2.2 Βολταμμετρία διαφορικού παλμού	49
2.9.2.3 Βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος	50
2.9.3 Αναδιαλυτική βολταμμετρία	51
2.9.3.1 Ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία	52
2.9.3.2 Καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία	52
2.9.3.3 Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία	52
2.10 Οργανολογία	56
2.10.1 Ηλεκτρόδιο εργασίας	57
2.10.2 Ηλεκτρόδιο αναφοράς	58
2.10.3 Βοηθητικό ηλεκτρόδιο	59
2.10.4 Ποτενσιοστάτης	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	
3.1 Εισαγωγή	60

3.2 Βιοαισθητήρες	61
3.2.1 Ορισμός	61
3.2.2 Ταξινόμηση	62
3.3 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες	64
3.3.1 Αμπερομετρικοί ενζυμικοί βιοαισθητήρες	64
3.3.2 Κατασκευή ενζυμικών βιοαισθητήρων	66
3.3.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά	72
3.4 Ηλεκτροχημικοί μη-ενζυμικοί αισθητήρες	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ	77
4.1 Διαδικασία τρισδιάστατης εκτύπωσης	78
4.2 Τεχνικές τρισδιάστατης εκτύπωσης	80
4.2.1 Φωτοπολυμερισμός	80
4.2.2 Συντηγμένη εναπόθεση	81
4.2.3 Κονιοποιημένη πρώτη ύλη	82
4.2.4 Πρώτη ύλη σε φύλλα	84
4.3 Η τρισδιάστατη εκτύπωση στην ηλεκτροχημεία	84
4.4 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες κατασκευασμένοι μέσω FDM	85
4.5 Προεπεξεργασία της επιφάνειας των τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροδίων	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΓΩΓΙΜΩΝ ΘΕΡΜΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ	
5.1 Θερμοπλαστικό	90
5.2 Πλαστικοποιητής	93
5.3 Αγωγή υλικό πλήρωσης	94
5.4 Σύνθεση νήματος	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ	
6.1 Γλυκόζη	98
6.2 Χολίνη	100
6.3 Χοληστερόλη	102
6.4 Αιθανόλη	104
6.5 Γαλακτικό οξύ	106
6.6 Ουρικό οξύ	107
6.7 Καφεΐνη	109
6.8 Βαρέα μέταλλα	110
6.8.1 Μόλυβδος	111

6.8.2 Κάδμιο	111
--------------	-----

ΜΕΡΟΣ II

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ – ΟΡΓΑΝΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 Πρωτόκολλο κατασκευής ηλεκτροχημικού αισθητήρα	113
7.1.1 Υλικά – Όργανα	113
7.1.2 Σχεδίαση – Κατασκευή	114
7.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροχημικών μετρήσεων	116
7.2.1 Διαλύτες – Αντιδραστήρια	116
7.2.2 Διαλύματα εργασίας	118
7.2.3 Πολυμερική μεμβράνη PVA	121
7.2.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός	122
7.3 Πρωτόκολλο σύνθεσης αγώγιμου νήματος	124
7.3.1 Υλικά – Αντιδραστήρια	124
7.3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	124
7.3.3 Διαδικασία σύνθεσης	124

ΜΕΡΟΣ III

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΙΔΡΩΤΑ

8.1 Επιλογή αγώγιμου νήματος εκτύπωσης βιοαισθητήρων	129
8.2 Προσδιορισμός γλυκόζης	131
8.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου	131
8.2.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα γλυκόζης	132
8.2.3 Καμπύλες αναφοράς	134
8.2.4 Παρεμποδίσεις	138
8.2.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	138
8.2.6 Απόκριση βιοαισθητήρα γλυκόζης σε πραγματικό ιδρώτα	139
8.3 Προσδιορισμός αιθανόλης	141
8.3.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου	141
8.3.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα αιθανόλης	141
8.3.3 Καμπύλες αναφοράς	143
8.3.4 Παρεμποδίσεις	145
8.3.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	145

8.3.6 Απόκριση βιοαισθητήρα αιθανόλης σε πραγματικό ιδρώτα	146
8.4 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος	148
8.4.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου	148
8.4.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος	149
8.4.3 Καμπύλες αναφοράς	150
8.4.4 Παρεμποδίσεις	153
8.4.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	154
8.4.6 Απόκριση βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε πραγματικό ιδρώτα	154
8.5 Ταυτόχρονος προσδιορισμός ουρικού οξέος και καφεΐνης	156
8.5.1 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων	156
8.5.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα	157
8.5.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού ουρικού οξέος και καφεΐνης	159
8.5.4 Καμπύλες αναφοράς	160
8.5.5 Παρεμποδίσεις	163
8.5.6 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	164
8.5.7 Απόκριση αισθητήρα ουρικού οξέος και καφεΐνης σε πραγματικό ιδρώτα	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΒΙΟΣΥΣΚΕΥΕΣ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	
9.1 Ταυτόχρονος προσδιορισμός χολίνης και χοληστερόλης	166
9.1.1 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων	167
9.1.2 Χαρακτηρισμός των ενζυμικών βιοαισθητήρων χολίνης και χοληστερόλης	168
9.1.3 Βελτιστοποίηση ηλεκτροχημικής μεθόδου	169
9.1.4 Καμπύλες αναφοράς	171
9.1.5 Αναπαραγωγιμότητα και σταθερότητα βιοαισθητήρων	173
9.1.6 Εκλεκτικότητα και παρεμποδίσεις	174
9.1.7 Εφαρμογή σε συνθετικό αίμα	176
9.2 Ταυτόχρονος προσδιορισμός γλυκόζης και αιθανόλης	177
9.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων	177
9.2.2 Καμπύλες αναφοράς	178
9.2.3 Εφαρμογή σε δείγματα οίνων	179
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο: ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	
10.1 Προσδιορισμός γλυκόζης με σύμπλοκο σιδήρου (III)	183
10.1.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου	183

10.1.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα	185
10.1.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης	187
10.1.4 Καμπύλη αναφοράς	190
10.1.5 Σταθερότητα αισθητήρα	191
10.1.6 Παρεμποδίσεις	191
10.1.7 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	192
10.2 Προσδιορισμός γλυκόζης με μεταλλο-οργανική κατασκευή σιδήρου (II)	194
10.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου	195
10.2.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα	196
10.2.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης	198
10.2.4 Καμπύλη αναφοράς	201
10.2.5 Σταθερότητα αισθητήρα	201
10.2.6 Παρεμποδίσεις	202
10.2.7 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα	203
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο: ΑΓΩΓΙΜΟ ΘΕΡΜΟΠΛΑΣΤΙΚΟ ΝΗΜΑ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	205
11.1 Επιλογή μορφής άνθρακα	206
11.2 Επιλογή πλαστικοποιητή	209
11.3 Μορφοποίηση αγώγιμου νήματος με Bi ₂ O ₃ και CuO	210
11.4 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων	216
11.5 Χαρακτηρισμός νήματος και αισθητήρα	217
11.6 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού Pb(II) και Cd(II)	220
11.7 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης	222
11.8 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού ουρικού οξέος	223
11.9 Καμπύλες αναφοράς	225
11.10 Αναπαραγωγιμότητα	227
11.11 Εφαρμογή σε δείγματα	228
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	231
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	234
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	236
Δημοσιεύσεις στα πλαίσια της παρούσας διατριβής	238
Ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια	239
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	241

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Γαλβανικό ηλεκτροχημικό στοιχείο με γέφυρα άλατος.	37
Σχήμα 2. Καμπύλες ρεύματος-τάσης ενός ιδανικά πολωμένου (αριστερά) και μη πολωμένου ηλεκτροδίου (δεξιά). Με διακεκομμένες γραμμές αποδίδονται οι αποκλίσεις από την ιδανική συμπεριφορά των πραγματικών ηλεκτροδίων.	39
Σχήμα 3. Τυπικό χρονοαμπερομετρικό πείραμα: (A) δυναμικό ως συνάρτηση του χρόνου, και (B) παραγόμενο ρεύμα ως συνάρτηση του χρόνου.	44
Σχήμα 4. Διάγραμμα κυματομορφής του δυναμικού σε συνάρτηση με το χρόνο στην κυκλική βολταμμετρία.	47
Σχήμα 5. Τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για μια αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική διαδικασία.	48
Σχήμα 6. Διαγράμματα μεταβολής του δυναμικού σε σχέση με το χρόνο σε: A) βολταμμετρία κανονικού παλμού, B) βολταμμετρία διαφορικού παλμού και Γ) βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος.	51
Σχήμα 7. Τυπικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελούμενο από μία ηλεκτροχημική κυψελίδα, που περιέχει το ηλεκτρολυτικό διάλυμα, στο οποίο εμβαπτίζονται τα τρία ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια αυτά συνδέονται με έναν ποτενσιοστάτη, ο οποίος με τη σειρά του είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή.	57
Σχήμα 8. Ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, KCl (s).	58
Σχήμα 9. Διάταξη ποτενσιοστάτη με τρία ηλεκτρόδια.	59
Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα.	62
Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων τύπων βιοαισθητήρων.	63
Σχήμα 12. Αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα.	65
Σχήμα 13. Μέθοδοι ακινητοποίησης των ενζύμων στους βιοαισθητήρες: 1) Προσρόφηση, 2) Παγίδευση, 3) Ομοιοπολική δέσμευση, 4) Εγκλωβισμός.	67
Σχήμα 14. Ενζυμικοί αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες γλυκόζης A) πρώτης, B) δεύτερης γενιάς.	68
Σχήμα 15. Ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου.	70
Σχήμα 16. Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα.	71
Σχήμα 17. Σχηματική αναπαράσταση των αρχών λειτουργίας για τις διαφορετικές γενιές των ηλεκτροχημικών αισθητήρων γλυκόζης.	74
Σχήμα 18. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των MOFs.	76

Σχήμα 19. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης ενός μη-ενζυμικού αισθητήρα γλυκόζης μέσω μεταλλο-οργανικών κατασκευών.	76
Σχήμα 20: Διαφορές προσθετικής και αφαιρετικής κατασκευής: Α) Αφαιρετική κατασκευή, και Β) Προσθετική κατασκευή.	77
Σχήμα 21. Η διαδικασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης: ένα ψηφιακό μοντέλο της κατασκευής του αντικειμένου, χρησιμοποιώντας λογισμικό CAD ή τρισδιάστατο σαρωτή (3D scanner) ή με τη λήψη πολλών φωτογραφιών. Το τρισδιάστατο μοντέλο μετατρέπεται σε αρχείο STL και η τρισδιάστατη εικόνα μετατρέπεται σε συνεχόμενες δισδιάστατες στιβάδες δίνοντας ένα αρχείο G-code. Τέλος, τυπώνεται το τρισδιάστατο αντικείμενο σε διαδοχικές δισδιάστατες στιβάδες.	78
Σχήμα 22. Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής FDM: η κεφαλή πληρωμένη με το θερμοσκληρυνόμενο πολυμερές μετακινείται σε τρεις διαστάσεις και εναποθέτει στιβάδα προς στιβάδα στην πλατφόρμα κατασκευής, το ρευστό πολυμερές.	81
Σχήμα 23. (Α) Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής του ψεκασμού συνδετικού υλικού (binder jetting). (Β) Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής της επιλεκτικής συσσωμάτωσης λέιζερ – SLS ή επιλεκτικής σύντηξης λέιζερ – SLM.	83
Σχήμα 24: Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής κατασκευής αντικειμένων με ελασμάτωση.	88
Σχήμα 25. Χημική δομή ορισμένων κοινών θερμοπλαστικών που χρησιμοποιούνται στην προσθετική κατασκευή, όπου PETG : γλυκόλη τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου, ABS : ακρυλονιτρίλιο βουταδιένιο στυρένιο, PLA : πολυ(γαλακτικό οξύ), PEEK : κετόνη πολυ(αιθέρα-αιθέρα) και TPU : θερμοπλαστική πολυουρεθάνη.	93
Σχήμα 26. Διαδικασία σύνθεσης αγώγιμων πολυμερικών νημάτων με χρήση διαλύτη και με χρήση θέρμανσης.	96
Σχήμα 27. Αναπαράσταση της αντίδρασης του ενζύμου GOx.	100
Σχήμα 28. Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων χολίνης: Α) Μονο-ενζυμικό, Β) Δι-ενζυμικό σύστημα.	102
Σχήμα 29. Πορεία αντίδρασης του ενζύμου οξειδάση της χοληστερόλης.	104
Σχήμα 30. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης καταλυτικής οξειδωσης της αιθανόλης από το AOX, με απευθείας ανίχνευση H ₂ O ₂ .	105
Σχήμα 31. Σχηματική αναπαράσταση της άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων σε έναν LOx βιοαισθητήρα.	107
Σχήμα 32. Συντακτικός τύπος ουρικού οξέος.	108
Σχήμα 33. Συντακτικός τύπος καφεΐνης.	109

- Σχήμα 34.** Σχηματική απεικόνιση των τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροδίων και διατάξεων που κατασκευάστηκαν, και οι διαστάσεις σε εκατοστά. 114
- Σχήμα 35.** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας τρισδιάστατης εκτύπωσης με χρήση τρισδιάστατου εκτυπωτή δύο κεφαλών. 115
- Σχήμα 36.** Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροχημικής διάταξης. 123
- Σχήμα 37.** Διαδικασία σύνθεσης πολυμερικού αγωγίμου νήματος προς εκτύπωση ηλεκτροδίων. 125
- Σχήμα 38.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις διαδοχικών προσθηκών $1,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ σε αναδευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) σε τυπωμένα με νήμα αιθάλης ηλεκτρόδια εργασίας από: ABS (μπλε) και PLA (μαύρο). 129
- Σχήμα 39.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε εκτυπωμένο 3D ηλεκτρόδιο CB/PLA: σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (πράσινο), παρουσία 2:2 και 4:4 $\text{mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα). Ρυθμός σάρωσης: 50 mV s^{-1} . 130
- Σχήμα 40.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης γλυκόζης στο ηλεκτρόδιο εργασίας, όπου PB_{ox} : η οξειδωμένη μορφή και PB_{red} : η ανηγμένη μορφή του εναποτιθέμενου Prussian Blue. 132
- Σχήμα 41.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα γλυκόζης PB/GOx απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (κόκκινη γραμμή). 133
- Σχήμα 42.** Η επίδραση της ποσότητας του Prussian Blue στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε διαδοχικές προσθήκες $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Ο διαμεσολαβητής επιστρώθηκε στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα με δέκα συνεχόμενους κύκλους κυκλικής βολταμμετρίας σε εύρος δυναμικού από $-0,9 \text{ V}$ έως $1,0 \text{ V}$ (μαύρη γραμμή) και με έναν κύκλο (κόκκινη γραμμή). 133
- Σχήμα 43.** Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) που περιέχει $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. 134
- Σχήμα 44.** Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης γλυκόζης ($375 - 1500 \text{ U mL}^{-1}$) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. 134
- Σχήμα 45.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε 8 διαδοχικές προσθήκες $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4). Κάτω: η σχετική καμπύλη αναφοράς. 135

- Σχήμα 46.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις ενός βιοαισθητήρα γλυκόζης παρουσία 0 έως 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (ανά 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} με pH 4. Κάτω: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. 136
- Σχήμα 47.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης έναντι στην προσθήκη 10 mmol L^{-1} ουρίας, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος, 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ασκορβικού οξέος και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. 138
- Σχήμα 48.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε δείγμα επιμολυσμένου με γλυκόζη συνθετικού ιδρώτα ακολουθούμενο από τρεις διαδοχικές προσθήκες 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο. 139
- Σχήμα 49.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης με μεμβράνη PVA πριν από την τοποθέτηση του ανθρώπινου δακτύλου (μαύρες γραμμές), μετά την τοποθέτηση δακτύλου νηστικού ατόμου (κόκκινη γραμμή), και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου 20 λεπτά κατόπιν κατανάλωσης γεύματος (πράσινη γραμμή). 140
- Σχήμα 50.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης της αιθανόλης στον βιοαισθητήρα. 141
- Σχήμα 51.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα αιθανόλης απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 20 mmol L^{-1} αιθανόλης (κόκκινη γραμμή). 142
- Σχήμα 52.** Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} με pH 4, που περιέχει 12 mmol L^{-1} αιθανόλης. 142
- Σχήμα 53.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε 10 διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} αιθανόλης σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 4). Η σχετική καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται ως ένθετο. 143
- Σχήμα 54.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις ενός βιοαισθητήρα αιθανόλης παρουσία 0 έως 36 mmol L^{-1} αιθανόλης (ανά 4 mmol L^{-1} από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} με pH 4. Κάτω: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. 144

- Σχήμα 55.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης έναντι στην προσθήκη $170 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης, 10mmol L^{-1} ουρίας, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος, 55mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ασκορβικού οξέος και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες 5mmol L^{-1} αιθανόλης. 145
- Σχήμα 56.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε δείγμα επιμολυσμένου με αιθανόλη συνθετικού ιδρώτα ακολουθούμενο από τρεις διαδοχικές προσθήκες 4mmol L^{-1} αιθανόλης. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο. 146
- Σχήμα 57.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις βιοαισθητήρα αιθανόλης με μεμβράνη PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση δακτύλου που προηγουμένως είχε βουτηχθεί σε διάλυμα αιθανόλης 20mmol L^{-1} (κόκκινη γραμμή). 147
- Σχήμα 58.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης του γαλακτικού οξέος στον βιοαισθητήρα. 148
- Σχήμα 59.** Βολταμμογραφήματα γραμμικής σάρωσης που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 40mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (κόκκινη γραμμή). 149
- Σχήμα 60.** Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε $0,1 \text{mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4) που περιέχει 20mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος. 150
- Σχήμα 61.** Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης γαλακτικού οξέος ($24,6 - 98,4 \text{U mL}^{-1}$) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε διάλυμα 8mmol L^{-1} . 150
- Σχήμα 62.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε 10 διαδοχικές προσθήκες 4mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{mol L}^{-1}$ (pH 4). Η σχετική καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται ως ένθετο. 151
- Σχήμα 63.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος παρουσία 0 έως 40mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (ανά 4mmol L^{-1} από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{mol L}^{-1}$ με pH 4. Κάτω: η σχετική καμπύλη αναφοράς. 152
- Σχήμα 64.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος έναντι στην προσθήκη $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης, 6mmol L^{-1} ασκορβικού οξέος, 6mmol L^{-1}

- ουρικού οξέος, $66 \mu\text{mol L}^{-1}$ παρακεταμόλης και έπειτα σε τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος. 153
- Σχήμα 65.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε προσθήκη $350 \mu\text{L}$ συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με 80 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος και έπειτα σε τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο. 154
- Σχήμα 66.** Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος με PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου, που είχε προηγουμένως βουτηχθεί σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 10 mmol L^{-1} (κόκκινη γραμμή). 155
- Σχήμα 67.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης ουρικού οξέος στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας. 157
- Σχήμα 68.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης καφεΐνης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας. 157
- Σχήμα 69.** Κυκλικά βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν με μη ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας σε διάλυμα $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl απουσία (μπλε γραμμή) και παρουσία 10 mmol L^{-1} $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (κόκκινη γραμμή) και με ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο για 100 (πράσινη γραμμή) και 200 δευτερόλεπτα (μωβ γραμμή), παρουσία 10 mmol L^{-1} $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. 158
- Σχήμα 70.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), παρουσία $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος και $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνης, σε μη ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας (μπλε) και σε ηλεκτρόδιο με ενεργοποίηση για 100 (κόκκινο) και 200 δευτερόλεπτα (πράσινο). 159
- Σχήμα 71.** Μεταβολή του ύψους των κορυφών οξειδωσης του ουρικού οξέος (UA) και της καφεΐνης (CAF) συγκέντρωσης $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ και $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), συναρτήσε του δυναμικού εφαρμογής. Χρόνος εφαρμογής: 120 s. 159
- Σχήμα 72.** Μεταβολή του ύψους των κορυφών οξειδωσης του ουρικού οξέος (UA) και της καφεΐνης (CAF) συγκέντρωσης $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ και $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), συναρτήσε του χρόνου εφαρμογής. Δυναμικό εφαρμογής: $-1,4 \text{ V}$. 160
- Σχήμα 73.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για το ουρικό οξύ και την καφεΐνη που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα σε εύρος συγκέντρωσης $5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα (ανά $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω),

σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 4) με εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s . Οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται ως ένθετο. 161

Σχήμα 74. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα με εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s , σε συνθετικό ιδρώτα επιμολυσμένο με ουρικό οξύ σε συγκέντρωση 25 μmol L^{-1} και καφεΐνη 15 μmol L^{-1} (μπλε) και παρουσία γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης, κιτρικού οξέος (100 μmol L^{-1} το καθένα), ασκορβικού οξέος (50 μmol L^{-1}), γαλακτικού οξέος ($5,5 \text{ mmol L}^{-1}$) και ουρίας (10 mmol L^{-1}) (κόκκινο). 163

Σχήμα 75. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης σε συνθετικό ιδρώτα επιμολυσμένο με 10 μmol L^{-1} ουρικό οξύ και 15 μmol L^{-1} καφεΐνη με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Από κάτω προς τα πάνω: προσθήκη δείγματος και κατόπιν τρεις σταθερές προσθήκες των 10 μmol L^{-1} ουρικού οξέος και καφεΐνης. Εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s πριν τη σάρωση. Οι αντίστοιχες καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετο. 164

Σχήμα 76. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του αισθητήρα με PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου που είχε προηγουμένως βουτηχθεί σε διάλυμα ουρικού οξέος και καφεΐνης συγκέντρωσης 10 μmol L^{-1} το καθένα (κόκκινη γραμμή). 165

Σχήμα 77. Προτεινόμενοι μηχανισμοί αντίδρασης χοληστερόλης και χολίνης στους βιοαισθητήρες. 167

Σχήμα 78. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε: A) 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα χοληστερόλης παρουσία 0 (μαύρη γραμμή), 60 (ανοιχτή πράσινη γραμμή) και 240 μmol L^{-1} χοληστερόλης (πράσινη γραμμή), B) 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα χολίνης παρουσία 0 (μαύρη γραμμή), 1 (ροζ γραμμή) και 4 μmol L^{-1} χολίνης (κόκκινη γραμμή). 168

Σχήμα 79. Η επίδραση του pH στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης (πράσινη γραμμή) και του βιοαισθητήρα χολίνης (κόκκινη γραμμή) σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB που περιέχει 120 μmol L^{-1} χοληστερόλης και 2 μmol L^{-1} χολίνης. Εφαρμοζόμενο δυναμικό: $-0,7 \text{ V}$. Τα σημεία στις καμπύλες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$). 170

Σχήμα 80. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης (πράσινη γραμμή) και του βιοαισθητήρα χολίνης (κόκκινη γραμμή) σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7) που περιέχει 120 μmol L^{-1}

χοληστερόλης και $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης. Κάθε σημείο στις καμπύλες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 170

Σχήμα 81. Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης της χοληστερόλης ($250\text{--}1000 \text{ U mL}^{-1}$) και της οξειδάσης της χολίνης ($125\text{--}500 \text{ U mL}^{-1}$) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε διάλυμα $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ (πράσινες μπάρες) και του βιοαισθητήρα χολίνης σε διάλυμα $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (κόκκινες μπάρες). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 171

Σχήμα 82. Η επίδραση της % κ.ο. συγκέντρωσης του Nafion στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χολίνης σε διάλυμα $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. 171

Σχήμα 83. Ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις της μικροδιάταξης σε 8 διαδοχικές προσθήκες $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης (WE_1) και $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης (WE_2) σε μη αναδευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Ένθετο: Αποκρίσεις της μικροδιάταξης στην παρουσία $210 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης, ακολουθούμενες από μία προσθήκη $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης. 172

Σχήμα 84. Οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς για τη χοληστερόλη και τη χολίνη. Κάθε σημείο στα διαγράμματα είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 172

Σχήμα 85. Η σταθερότητα των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και χολίνης της 3D εκτυπωμένης διάταξης, που αντιστοιχεί σε αμπερομετρικές αποκρίσεις σε $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης (πράσινα σημεία) και $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης (κόκκινα σημεία) κατά τη διάρκεια 15 ημερών από την κατασκευή. 173

Σχήμα 86. Ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και χολίνης: Α) σε τυφλό διάλυμα, Β) μετά από δύο διαδοχικές προσθήκες $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης, και Γ) μετά από δύο διαδοχικές προσθήκες $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης. 174

Σχήμα 87. Ταυτόχρονες αποκρίσεις των βιοαισθητήρων χοληστερόλης (WE_1) και χολίνης (WE_2) έναντι στην προσθήκη $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ γλυκόζης, 6 mmol L^{-1} ουρικού οξέος, 6 mmol L^{-1} ασκορβικού οξέος, 7 mmol L^{-1} παρακεταμόλης και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης. 175

Σχήμα 88. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού ενός Α) εκτυπωμένου ως έχει ηλεκτροδίου CB/PLA σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα, Β) βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα που περιέχει $30 \mu\text{mol L}^{-1}$

- χοληστερόλης, και Γ) βιοαισθητήρα χολίνης σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα που περιέχει $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης. 176
- Σχήμα 89.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις της βιοδιάταξης σε 10 διαδοχικές προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και 10mmol L^{-1} αιθανόλης σε μη αναδευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{mol L}^{-1}$ (pH 7). Οι σχετικές καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται ως ένθετα (κάτω). 179
- Σχήμα 90.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης λευκού ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα. 180
- Σχήμα 91.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης κόκκινου ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα. 181
- Σχήμα 92.** Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης ροζέ ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα. 182
- Σχήμα 93.** Δομή $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$. [Όπου: Fe: πορτοκαλί, C: γκρι, H: τρκουάζ, O: κόκκινο]. 183
- Σχήμα 94.** Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης γλυκόζης στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας από νήμα CB/PLA. 185
- Σχήμα 95.** Α) Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο αισθητήρα γλυκόζης απουσία (μαύρο) και παρουσία 1mmol L^{-1} γλυκόζης (κόκκινο). Β) Διάγραμμα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) του $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$ σε εύρος θερμοκρασίας από $25-800 \text{ }^\circ\text{C}$. 186
- Σχήμα 96.** Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού ενός 3D ηλεκτροδίου από CB/PLA, μορφοποιημένου με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$ (6 % κ.ο σε αιθανόλη) (μπλε και μαύρο) και ενός ηλεκτροδίου μορφοποιημένου με Fe_2O_3 (6 % κ.ο. σε αιθανόλη) (πράσινο και κόκκινο) έναντι $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών με pH 4. Στάδιο προσυγκέντρωσης για το σύμπλοκο Fe (III): $-1,4 \text{ V}$ για 360 s. Για το Fe_2O_3 δεν εφαρμόστηκε στάδιο προσυγκέντρωσης. 187
- Σχήμα 97.** Η επίδραση της συγκέντρωσης του $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι

200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4) και τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού (2, 4, 6 και 8 % κ.ο. από κάτω προς τα πάνω). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). Στάδιο προσυγκέντρωσης: $-1,4$ V για 360 s. 188

Σχήμα 98. Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$, εφαρμόζοντας δυναμικό προσυγκέντρωσης $-1,4$ V. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 189

Σχήμα 99. Η επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$, εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 360 s. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 189

Σχήμα 100. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού προσδιορισμού γλυκόζης, που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα σε εύρος συγκέντρωσης 0 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 και 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω), σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 4) με στάδιο προσυγκέντρωσης $-1,4$ V για 360 s. Εσωκλείεται: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 190

Σχήμα 101. Η επίδραση των διαφόρων βιοδεικτών του ιδρώτα στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος, που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ σε συνθετικό ιδρώτα, επιμολυσμένο με 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (μπλε μπάρα), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (μωβ μπάρα), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 220 mmol L^{-1} ουρίας (πράσινη μπάρα), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (πορτοκαλί μπάρα), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος + 220 mmol L^{-1} ουρίας + 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (γκρι μπάρα). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 192

Σχήμα 102. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον προσδιορισμό γλυκόζης, που ελήφθησαν με τον μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ 3D αισθητήρα σε δείγμα συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$

γλυκόζης. Εσωκλείεται: το αντίστοιχο διάγραμμα σταθερής προσθήκης. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 193

Σχήμα 103. Δομή Fe(II)-MOF [Όπου Fe: πορτοκαλί, C: γκρι, O: κόκκινο, τα H παραλείπονται για λόγους καλύτερης απεικόνισης της δομής]. 195

Σχήμα 104. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν με το 3D-τυπωμένο ηλεκτρόδιο από CB/PLA (κόκκινο) και το 3D-τυπωμένο ηλεκτρόδιο από CB/PLA, μορφοποιημένο με το νανοένζυμο Fe(II)-MOF (μαύρο) παρουσία 1 mmol L^{-1} γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4). 197

Σχήμα 105. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη, απουσία (μπλε) και παρουσία (μαύρο) $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Ο 3D αισθητήρας CB/PLA μορφοποιήθηκε με 0,6% κ.ο. Fe(II)-MOF και εφαρμόστηκε δυναμικό πόλωσης στα $-1,4 \text{ V}$ για 120 s. 198

Σχήμα 106. Η επίδραση της συγκέντρωσης του Fe(II)-MOF στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας της 3D διάταξης, στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). Στάδιο προσυγκέντρωσης: $-1,4 \text{ V}$ για 120 s. 199

Σχήμα 107. Η επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν με μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη, εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 120 s. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 200

Σχήμα 108. Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν σε μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη, εφαρμόζοντας δυναμικό προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 200

Σχήμα 109. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τη γλυκόζη, που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε εύρος συγκέντρωσης $0 - 600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 και $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω), σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με στάδιο προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$ για 120 s. Εσωκλείεται: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 201

Σχήμα 110. Η επίδραση των διαφόρων βιοδεικτών του ιδρώτα στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος, που ελήφθησαν σε μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε συνθετικό ιδρώτα, επιμολυσμένο με 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (μαύρη μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 220 mmol L^{-1} ουρίας (μπλε μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (κόκκινη μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (πορτοκαλί μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος + 220 mmol L^{-1} ουρίας + 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (γκρι μπάρα). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 203

Σχήμα 111. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον προσδιορισμό γλυκόζης, που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε δείγμα συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Εσωκλείεται: το αντίστοιχο διάγραμμα σταθερής προσθήκης. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 204

Σχήμα 112. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει γραφίτη (Gr) σε διάφορες αναλογίες, σε διάλυμα 10:10 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε 0,1 mol L^{-1} KCl. (B) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών, έναντι 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ UA σε 0,1 mol L^{-1} ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). Η σύσταση του κάθε νήματος φαίνεται στο ένθετο του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος. 207

Σχήμα 113. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει αιθάλη (CB) σε διάφορες αναλογίες και από ένα εμπορικό νήμα (ProtoPasta), σε διάλυμα 10:10 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε 0,1 mol L^{-1} KCl. (B) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών έναντι 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ UA σε 0,1 mol L^{-1} ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). (Γ) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει αιθάλη (CB) 27,5 % κ.β., γραφίτη (Gr) 50 % κ.β. και από ένα εμπορικό νήμα (ProtoPasta), σε διάλυμα 10:10 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε 0,1 mol L^{-1} KCl. (Δ) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών έναντι 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ UA σε 0,1 mol L^{-1} ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). Η σύσταση του κάθε νήματος φαίνεται στα δύο ένθετα του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος. 208

Σχήμα 114. Α) DP βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) έναντι: (i) 60 μg L⁻¹ Pb(II), Cd(II) μετά την εφαρμογή ενός σταδίου προσυγκέντρωσης στα -1,6 V για 360 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0,1 mol L⁻¹, pH 4,8), (ii) 1000 μmol L⁻¹ γλυκόζης χωρίς εφαρμογή προσυγκέντρωσης, σε NaOH (pH 13) και (iii) 80 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος μετά από προσυγκέντρωση στα -1,0 V για 120 s, σε PB (0,1 mol L⁻¹, pH 7). Β) Συγκριτικά DPASV βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από νήματα Bi/Cu/CB/PLA με διαφορετική σύσταση Bi₂O₃ και CuO και από εμπορικό νήμα (ProtoPasta), έναντι 60 μg L⁻¹ Pb(II), Cd(II), μετά την εφαρμογή σταδίου προσυγκέντρωσης στα -1,6 V για 360 s. Γ) Συγκριτικές αμπερομετρικές αποκρίσεις ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από διαφορετικά νήματα Bi/Cu/CB/PLA και από εμπορικό νήμα (ProtoPasta) σε πέντε διαδοχικές προσθήκες 200 μmol L⁻¹ γλυκόζης. Δ) Συγκριτικά DP βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από διαφορετικά νήματα Bi/Cu/CB/PLA έναντι 80 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος. Ε) Σύγκριση των % σχετικών αποκρίσεων έναντι Pb(II), Cd(II) και γλυκόζης των ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από νήματα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) και (5_{Bi} : 5_{Cu}). Η σύσταση κάθε νήματος Bi/Cu/CB/PLA σε Bi₂O₃ και CuO φαίνεται στο ένθετο του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα Bi/Cu/CB/PLA απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος. 215

Σχήμα 115. Βολταμμογραφήματα γραμμικής σάρωσης του τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροδίου που εκτυπώθηκε από το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) μετά από πόλωση στα -1,6 V για 120 s (κόκκινη γραμμή), 360 s (μαύρη γραμμή) και 600 s (μπλε γραμμή) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,8). 217

Σχήμα 116. Διαγράμματα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) για PLA, εμπορικό CB/PLA (ProtoPasta) και εργαστηριακό CB/PLA για νήματα (0_{Bi} : 0_{Cu}) και (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}). 219

Σχήμα 117. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού προσυγκέντρωσης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}), στα ύψη των κορυφών του Pb(II) και του Cd(II) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,8) που περιείχε 40 μg L⁻¹ Pb(II) και Cd(II). Χρόνος προσυγκέντρωσης: 360 s. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης ± SD (n = 3). 221

Σχήμα 118. Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}), στα ύψη των κορυφών του Pb(II) και του Cd(II) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,8) που περιείχε 40 μg L⁻¹ Pb(II) και

Cd(II). Δυναμικό προσυγκέντρωσης: $-1,6$ V. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 222

Σχήμα 119. Βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού που λήφθηκε στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) παρουσία 1 mmol L^{-1} γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH. 223

Σχήμα 120. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην αμπερομετρική απόκριση έναντι $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$). 223

Σχήμα 121. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στο ύψος της κορυφής του ουρικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) που περιείχε $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος. Χρόνος εφαρμογής: 120 s . Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 224

Σχήμα 122. Επίδραση του χρόνου εφαρμογής δυναμικού στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στο ύψος της κορυφής του ουρικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) που περιείχε $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος. Δυναμικό εφαρμογής: $-1,0$ V. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 224

Σχήμα 123. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που λήφθηκαν σε ένα 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) σε εύρος συγκεντρώσεων Pb(II) και Cd(II): $0-90 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (ανά $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω). Οι καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στο ένθετο. Κάθε σημείο στις καμπύλες αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 225

Σχήμα 124. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) σε δέκα διαδοχικές προσθήκες $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 226

Σχήμα 125. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) για εύρος συγκέντρωσης ουρικού οξέος $0-100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (ανά $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω). Η καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται στο ένθετο. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). 227

Σχήμα 126. Βολταμμογραφήματα αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού και καμπύλη σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό του Pb και του Cd

σε επιμολυσμένο δείγμα εμφιαλωμένου νερού. Δείγμα επιμολυσμένο με Pb(II), Cd(II) (κόκκινη γραμμή) και τρεις σταθερές προσθήκες 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II), Cd(II) (μαύρες γραμμές). 229

Σχήμα 127. Αμπερομετρικές αποκρίσεις και καμπύλη σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό γλυκόζης σε εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού. Δείγμα (κόκκινη γραμμή) και τρεις διαδοχικές προσθήκες 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (μαύρη γραμμή). 229

Σχήμα 128. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού και διάγραμμα σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό ουρικού οξέος σε επιμολυσμένο εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού. Δείγμα (κόκκινη γραμμή) και τρεις σταθερές προσθήκες 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (μαύρες γραμμές). 230

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** Τρισδιάστατος εκτυπωτής δύο κεφαλών Creator Pro (Flashforge). 113
- Εικόνα 2.** Φωτογραφία της πορώδους πολυμερικής μεμβράνης υδρογέλης PVA. 120
- Εικόνα 3.** Φωτογραφίες του νήματος Bi/Cu/CB/PLA μετά την εξώθηση (αριστερά), ευθυγραμμισμένου (δεξιά πάνω) και κυρτωμένου (δεξιά κάτω). Οι φωτογραφίες αναδεικνύουν την ευκαμψία και εκτυπωσιμότητα του διαμορφωμένου νήματος. 126
- Εικόνα 4.** 3D εκτυπωμένη συσκευή για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων προσδιορισμού βιοδεικτών σε ιδρώτα. 128
- Εικόνα 5.** 3D εκτυπωμένος βιοαισθητήρας αφής για την ανίχνευση βιοδεικτών σε ιδρώτα. 128
- Εικόνα 6.** Φωτογραφίες της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό χολίνης/χοληστερόλης. 166
- Εικόνα 7.** Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας: Α) εκτυπωμένου ως έχει, Β) μορφοποιημένου με ChlOx / Nafion και Γ) με ChOx /Nafion. 169
- Εικόνα 8.** Φωτογραφίες της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για ταυτόχρονο προσδιορισμό γλυκόζης/αιθανόλης. 177
- Εικόνα 9.** 3D εκτυπωμένος αισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό γλυκόζης με χρήση συμπλόκου σιδήρου. 184
- Εικόνα 10.** Φωτογραφία της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για μη ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης. 194
- Εικόνα 11.** (Α) Αγώγιμο πολυμερικό υλικό που αποτελείται από PLA και 27,5 % κ.β. CB. (Β),(Γ) Αγώγιμο πολυμερικό υλικό που αποτελείται από PLA, 27,5 % κ.β. CB και 10 % κ.β. PEG-500. 210
- Εικόνα 12.** Εικόνες SEM-EDX της επιφάνειας του ηλεκτροδίου που εκτυπώθηκε από νήμα ($7,5_{\text{Bi}}$: $2,5_{\text{Cu}}$) μετά από πόλωση στα $-1,6 \text{ V}$ για 360 s, (Α) εικόνα SEM, (Β) χαρτογράφηση EDX που δείχνει τα CuNPs, (Γ) χαρτογράφηση EDX που δείχνει τα BiNPs. 218

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ηλεκτροαναλυτικές μέθοδοι, όπου i =ένταση ρεύματος, E =τάση, V =όγκος τιτλοδότη, t =χρόνος, AC =εναλλασσόμενο ρεύμα, $1/R$ =αγωγιμότητα.	42
Πίνακας 2. Περίληψη τεχνικών τρισδιάστατης εκτύπωσης.	79
Πίνακας 3. Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι αισθητήρες μέσω της τεχνικής FDM. Όπου: «-»: δεν έχει υποστεί επεξεργασία ή εφαρμοστεί σε δείγμα.	88-89
Πίνακας 4. Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι βιοαισθητήρες μέσω της τεχνικής FDM. Όπου: «-»: δεν έχει υποστεί επεξεργασία ή εφαρμοστεί σε δείγμα.	90
Πίνακας 5. Νήματα ιδιοκατασκευής για 3D εκτύπωση ηλεκτροχημικών αισθητήρων με FDM.	97
Πίνακας 6. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ενζυμικών βιοαισθητήρων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό γλυκόζης, συγκριτικά με τον βιοαισθητήρα της παρούσας εργασίας.	137
Πίνακας 7. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ηλεκτροδίων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό ουρικού οξέος.	162
Πίνακας 8. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ηλεκτροδίων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό καφεΐνης.	162
Πίνακας 9. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και συνθήκες εφαρμογής άλλων μη-ενζυμικών μορφοποιημένων αισθητήρων γλυκόζης.	191
Πίνακας 10. Σύγκριση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς μη-ενζυμικών αισθητήρων γλυκόζης που βασίζονται σε μεταλλο-οργανικές κατασκευές. Η γραμμικότητα και τα όρια ανίχνευσης εκφράζονται σε $\mu\text{mol L}^{-1}$.	202
Πίνακας 11. Σύνοψη της σύστασης των Bi/Cu/CB/PLA/PEG νημάτων.	211

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποτέλεσε η ανάπτυξη χαμηλού κόστους ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων πλήρως κατασκευασμένων μέσω της τρισδιάστατης εκτύπωσης.

Η πειραματική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Διδακτορικών Σπουδών, με σκοπό την απόκτηση του ανώτατου ακαδημαϊκού τίτλου σπουδών στην Αναλυτική Χημεία, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή, Χρήστου Κόκκινου, ως προς τον οποίο εκφράζω την αμέριστη εκτίμηση για την πολύτιμη βοήθεια και τις υποδείξεις του κατά την πειραματική διαδικασία, την επιστημονική και ηθική του συμπαράσταση, για τις διορθώσεις και τις επισημάνσεις του επί του παρόντος κειμένου.

Ακόμη ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές του Τμήματος χημείας, Αναστάσιο Οικονόμου και Χαράλαμπο Προεστό, για την αποδοχή συμμετοχής τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον κατά την εκπόνηση της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή Ιωάννη Παπαευσταθίου και την ερευνητική του ομάδα για τη σύνθεση βιομιμητικών υλικών σιδήρου, που χρησιμοποιήθηκαν για τον μη-ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης.

Τέλος, αφιερώνω το παρόν σύγγραμμα στους γονείς μου, Ιουλία και Δημήτρη, για τον τρόπο με τον οποίο με στηρίζουν πάντα στις επιλογές μου, καθώς και για την αγάπη με την οποία με περιβάλλουν.

Κουκουβίτη Ελένη
Αθήνα, Ιανουάριος 2025

Μέρος της συγκεκριμένης έρευνας χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ), υπό τον τίτλο «ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ», συγχρηματοδοτούμενο από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) στο πλαίσιο του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) 2014-2020, για την πράξη με τίτλο: «Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι φορητοί αισθητήρες βασισμένοι σε Μεταλλο-Οργανικές Κατασκευές για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό γλυκόζης σε ιδρώτα».



ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS • ENTREPRENEURSHIP • INNOVATION

ΜΕΡΟΣ Ι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την αντικατάσταση του θεμελιώδους αναλυτικού μοντέλου μέτρησης βιοδεικτών, που βασίζεται στην πραγματοποίηση δειγματοληψίας, μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο, ανάλυση του δείγματος και έκδοση του αποτελέσματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις ρουτίνας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βιοδεικτών (όπως ραδιοχημικές και χρωματογραφικές) είναι γενικά χρονοβόρες και απαιτούν εξειδικευμένα, ακριβή και ογκώδη οργανολογία^[1-4]. Από την άλλη πλευρά, οι ηλεκτροχημικοί (βιο)αισθητήρες θεωρούνται ως ιδανικές πλατφόρμες προσδιορισμού βιοδεικτών, επειδή συνδυάζουν την ευαισθησία με την εκλεκτικότητα, κάνουν χρήση φορητής και φθηνής οργανολογίας και παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών αναλυτών. Οι ηλεκτροχημικοί (βιο)αισθητήρες αναπτύσσονται ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, παρέχοντας απλούς, γρήγορους και χαμηλού κόστους προσδιορισμούς στο πεδίο (on site) ή στο σημείο φροντίδας των ασθενών (point of care)^[1-5]. Παρότι στη βιβλιογραφία υπάρχουν πάρα πολλές εργασίες που ασχολούνται με τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό βιοδεικτών, η πλειοψηφία τους χρησιμοποιεί κοινά ηλεκτρόδια (κυρίως υαλώδους ή πάστας άνθρακα ή εκτύπωσης μέσω πλέγματος), ενώ οι μετρήσεις πραγματοποιούνται κατά βάση σε μεγάλες κυψέλες^[6-9]. Η τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing) αποτελεί καινοτόμο τεχνική για την κατασκευή ολοκληρωμένων ηλεκτροχημικών αισθητήρων μικρών διαστάσεων, κάνοντας χρήση φθηνού και φορητού εξοπλισμού. Επίσης, η τρισδιάστατη εκτύπωση παρέχει μεγάλη ευελιξία στο σχεδιασμό και τα υλικά κατασκευής των αισθητήρων, έχει μεγάλη ταχύτητα κατασκευής (μόλις μερικά λεπτά) και τέλος, είναι φιλική προς το περιβάλλον καθώς, ως προσθετική τεχνική, δεν παράγει απόβλητα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζεται η ανάπτυξη νέας γενιάς φορητών ηλεκτροχημικών (βιο)διατάξεων πλήρως κατασκευασμένων με τρισδιάστατη εκτύπωση. Τα ηλεκτρόδια εργασίας είναι μορφοποιημένα είτε με ένζυμα, είτε με βιομιμητικά υλικά, όπως μεταλλο-οργανικές κατασκευές [metal-organic frameworks (MOFs)], ή σύμπλοκα ή οξειδία μετάλλων, ώστε να είναι εκλεκτικά κάθε φορά στον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό του εκάστοτε βιοαναλύτη. Οι ενζυμικοί 3D εκτυπωμένοι

(βιο)αισθητήρες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών (όπως γλυκόζη, χολίνη, χοληστερόλη, ουρικό οξύ κ.α.) σε ανθρώπινο ορό και ιδρώτα. Επίσης, μικρές ολοκληρωμένες 3D εκτυπωμένες βιοδιάταξεις, εφαρμόζονται στον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο βιοδεικτών κλινικής σημασίας στο αίμα καθώς και δύο δεικτών ποιότητας σε οίνους. Επιπλέον, νέας γενιάς συνθετικά βιομιμητικά υλικά χρησιμοποιούνται για τον εκλεκτικό μη-ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης στον ιδρώτα. Τέλος, αγώγιμο θερμοπλαστικό νήμα με ενσωματωμένα δύο λειτουργικά υλικά συντίθεται και χρησιμοποιείται για την κατασκευή έτοιμων προς χρήση πολυλειτουργικών αισθητήρων, για τον απευθείας και ταυτόχρονο προσδιορισμό βαρέων μετάλλων (όπως κάδμιο, μόλυβδος) σε υδατικά δείγματα, καθώς και τον μη-ενζυματικό προσδιορισμό βιοδεικτών (όπως γλυκόζης και ουρικού οξέος) σε ανθρώπινο ορό.

Με την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθοδολογίας ξεπερνώνται τα πιο σημαντικά μειονεκτήματα τόσο των συμβατικών μεθόδων ανάλυσης βιοδεικτών όσο και των υφιστάμενων ηλεκτροχημικών (βιο)αισθητήρων, που σχετίζονται με το μέγεθος και το κόστος του εξοπλισμού κατασκευής, την ταχύτητα κατασκευής, την απλότητα λειτουργίας, την ταχύτητα και το κόστος ανάλυσης, τη δυνατότητα εφαρμογής στο πεδίο και τη φιλικότητα προς το περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΑΡΧΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

Ο κλάδος της *ηλεκτροχημείας* μελετά τη σχέση του ηλεκτρισμού με τη χημεία και πιο συγκεκριμένα τη σχέση του ηλεκτρικού ρεύματος, του δυναμικού ή του φορτίου με χημικές αντιδράσεις. Η ηλεκτροχημεία έχει βρει πολλές εφαρμογές στον έλεγχο του περιβάλλοντος, στον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων στη βιομηχανία και τελευταία στη βιοχημεία και την ιατρική^[10,11].

Η *ηλεκτροχημική ανάλυση* περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες βασίζονται στις ηλεκτρικές ιδιότητες ενός διαλύματος και του αναλύτη, όταν αυτά αποτελούν τμήμα ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου. Ένα *ηλεκτροχημικό στοιχείο* αποτελείται συνήθως από δύο ηλεκτρικούς αγωγούς (ηλεκτρόδια) που το καθένα είναι βυθισμένο σε διάλυμα κατάλληλου ηλεκτρολύτη (ιοντικός αγωγός), του οποίου ο ρόλος είναι η αγωγή του ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς και το εξωτερικό ηλεκτρικό κύκλωμα ή το κύκλωμα μέτρησης, το οποίο χρησιμοποιείται για την εφαρμογή και μέτρηση ηλεκτρικών σημάτων. Τα ηλεκτρικά μεγέθη, που συνήθως μετρούνται, είναι η ένταση και το δυναμικό του ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς και η αγωγιμότητα (αντίσταση), από μόνα τους ή ακόμη και σε συνδυασμό και τελικά με βάση τις μετρούμενες τιμές πραγματοποιείται η χημική ανάλυση, που έγκειται στην ποιοτική ή την ποσοτική ανάλυση^[12,13,14].

Ως αρχή των ηλεκτροχημικών μεθόδων θεωρείται η ηλεκτροσταθμική ανάλυση που αναπτύχθηκε από τον Wolcott Gibbs το 1865^[15,16]. Η κουλομετρία είναι μια παρόμοια μέθοδος, που βασίζεται στο νόμο του Faraday και χρησιμοποιήθηκε κατά το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα για τον προσδιορισμό ατομικών μαζών και λεπτών μεταλλικών ελασμάτων^[17]. Μία ακόμη αναλυτική μέθοδος αποτελεί η αγωγιμομετρία, η οποία εφαρμοζόταν ήδη από το 18^ο αιώνα χρησιμοποιώντας συνεχές ρεύμα και έγινε αποτελεσματική το 1860 με τη χρήση εναλλασσόμενου ρεύματος από τον Friedrich Kohlrausch. Το 1889 η εξίσωση του Nernst έθεσε τα θεμέλια για την άμεση ποτενσιομετρία. Το 1922 εφευρέθηκε η πολαρογραφία από τον Jaroslav Heyrovsky, με τη χρήση ηλεκτροδίου σταγόνας υδραργύρου^[18]. Κατόπιν, αναπτύχθηκαν πλήθος σπουδαίων μεθόδων, όπως βολταμμετρία και αναδιαλυτικές τεχνικές^[19].

Στην περαιτέρω ανάπτυξη της ηλεκτροανάλυσης συνέβαλε η κατασκευή νέων ηλεκτροδίων και υλικών όπως το *υγρό ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου*,

το στερεό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα και τα χημικά μορφοποιημένα ηλεκτρόδια^[20,21]. Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα έχει στραφεί προς τη δημιουργία μικρών βιοαισθητήρων, όπως οι ενζυμικοί αμπερομετρικοί αισθητήρες, οι βολταμμετρικοί ανοσοαισθητήρες και οι αισθητήρες DNA^[22,23].

2.2 Ηλεκτρική διπλοστιβάδα

Η διεπιφάνεια δεν είναι απλά η ενδιάμεση επιφάνεια επαφής των φάσεων του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη, αλλά η ετερογενής περιοχή που αποτελείται από δύο επιμέρους περιοχές σε επαφή. Η μία περιοχή της διεπιφάνειας επεκτείνεται από το ηλεκτρόδιο (ημιστοιχείο) προς τον ηλεκτρολύτη, χωρίς να έχει τις ίδιες ιδιότητες και σύνθεση με εκείνες της κύριας μάζας του ηλεκτρολύτη, και η άλλη εκτείνεται από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου προς το εσωτερικό του, χωρίς να έχει τις ίδιες ιδιότητες και σύνθεση με εκείνες της κύριας μάζας του ηλεκτροδίου. Λόγω της συσσώρευσης αντίθετων ηλεκτρικών φορτίων, η διεπιφάνεια αποκτά ιδιότητες πυκνωτή και γι' αυτό ονομάζεται και *ηλεκτρική διπλοστιβάδα*. Η διεπιφάνεια είναι εξ' ορισμού ο χώρος που πραγματοποιείται κάθε ηλεκτροδιακή ημιαντίδραση, δηλαδή μία αντίδραση στην οποία συμμετέχουν ηλεκτροενεργά αντιδρώντα ή προϊόντα^[12].

Διάφορα πρότυπα έχουν αναπτυχθεί για την ηλεκτρική διπλοστιβάδα:

- ✓ Το *πρότυπο του Helmholtz*, όπου σύμφωνα με αυτό, το επιφανειακό φορτίο του ηλεκτροδίου έλκει ηλεκτροστατικά πάνω στην επιφάνειά του (που έρχεται σε επαφή με το ηλεκτρολυτικό διάλυμα), στιβάδα ιόντων ίσου και αντίθετου φορτίου. Η στιβάδα αυτή κατανέμεται ομοιόμορφα πάνω σε επίπεδο παράλληλο προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (εξωτερικό επίπεδο Helmholtz) και σε πολύ μικρή απόσταση από αυτή. Έτσι, η δομή της ηλεκτρισμένης διεπιφάνειας είναι ανάλογη με αυτή ενός πυκνωτή με επίπεδες πλάκες. Η διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτρολύτη και του ηλεκτροδίου, μεταβάλλεται γραμμικά από το ηλεκτρόδιο ως το εξωτερικό επίπεδο Helmholtz, πέρα από το οποίο, όμως, παραμένει σταθερή. Στην ύπαρξη των αντίθετα φορτισμένων στιβάδων οφείλεται ο όρος ηλεκτρική διπλοστιβάδα (electric double layer).
- ✓ Το *πρότυπο των Gouy-Chapman*, στο οποίο θεωρούν ότι η κατανομή των ιόντων στην πλευρά του διαλύματος είναι το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού ανάμεσα στην ηλεκτροστατική επίδραση και στη χαοτική θερμική κίνηση των ιόντων. Κοντά στην επιφάνεια κυριαρχεί η ηλεκτροστατική επίδραση, ενώ μακριά από αυτή, η χαοτική

κίνηση των ιόντων. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μιας διάχυτης στιβάδας, όπου η συγκέντρωση των αντίθετα προς το ηλεκτρόδιο φορτισμένων ιόντων παίρνει τη μέγιστη τιμή κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και ελαττώνεται προοδευτικά κατά την απομάκρυνση από την επιφάνεια.

✓ Το *πρότυπο του Stern*, το οποίο αποτελεί συνδυασμό των δύο προηγούμενων προτύπων. Θεωρεί μια σταθερή στιβάδα αντίθετα φορτισμένων ιόντων σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και στη συνέχεια μια διάχυτη στιβάδα.

✓ Το *πρότυπο του Grahame*, στο οποίο θεωρείται ότι η σταθερή στιβάδα αποτελείται από δύο επιμέρους στιβάδες. Η πρώτη αποτελείται από ειδικά προσροφημένα συστατικά, που ονομάζονται τασενεργές ουσίες ή τασενεργά, τα οποία συγκρατούνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με φυσική ρόφηση (δηλαδή με δυνάμεις *van der Waals*) ή με χημειορρόφηση (δηλαδή με *χημικό δεσμό*) και όχι με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Η δεύτερη, που βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αποτελείται από μη ειδικά προσροφημένα επιδιαλυτωμένα ιόντα, τα οποία έλκονται με δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσης. Το επίπεδο που διέρχεται από τα μέσα των ειδικά προσροφημένων συστατικών ονομάζεται εσωτερικό επίπεδο Helmholtz (IHP), ενώ το επίπεδο που διέρχεται από τα μέσα των μη ειδικά προσροφημένων ιόντων ονομάζεται εξωτερικό επίπεδο Helmholtz (OHP). Στη συνέχεια ακολουθεί, όπως στα προηγούμενα πρότυπα, η διάχυτη στιβάδα.

Σήμερα έχουν διατυπωθεί ακόμη πιο σύγχρονες θεωρίες για τη δομή της διπλοστιβάδας, στις οποίες λαμβάνεται υπόψη η παρουσία των μορίων του διαλύτη στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας, καθώς και η ειδική προσρόφηση οργανικών μορίων^[11,24].

2.3 Ηλεκτροδιακές διεργασίες

Οι ηλεκτροδιακές διεργασίες διακρίνονται σε *φαρανταϊκές* και *μη φαρανταϊκές*, ανάλογα με το αν το παρατηρούμενο ρεύμα έχει ως αποτέλεσμα ή είναι αποτέλεσμα ηλεκτροδιακών αντιδράσεων ή όχι.

Φαρανταϊκό ονομάζεται το ρεύμα που προκύπτει από τη μεταφορά ηλεκτρικού φορτίου μεταξύ των ηλεκτροδίων και της ύλης που τα περιβάλλει ως αποτέλεσμα αντιδράσεων οξειδωσης ή αναγωγής ηλεκτροενεργών ουσιών στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Στην περίπτωση φαρανταϊκών διεργασιών υπάρχει άμεση συσχέτιση

του διερχόμενου ηλεκτρικού φορτίου (Q) και του συνολικού αριθμού των χημικών ισοδυνάμων (eq) των ηλεκτροενεργών ουσιών που συμμετέχουν στις ηλεκτροδιακές ημιαντιδράσεις (νόμος *Faraday*). Οι ηλεκτροενεργές ουσίες μπορεί να είναι: α) ουσίες διαλυμένες στον ηλεκτρολύτη ή και ο ίδιος ο διαλύτης, β) δυσδιάλυτες ενώσεις επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, γ) χημικά σωματίδια προσροφημένα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και δ) το ίδιο το υλικό του ηλεκτροδίου.

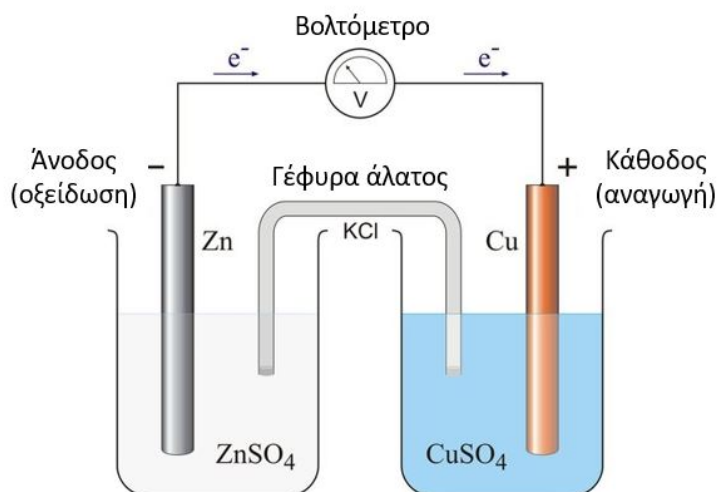
Στις *μη φαρανταϊκές* διεργασίες περιλαμβάνονται η προσρόφηση και η εκρόφηση ιόντων και μορίων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων, όπως και κάθε χημική ή φυσική ηλεκτροδιακή διεργασία, η οποία μπορεί να προκαλέσει διέλευση ρεύματος έστω και παροδική, χωρίς όμως να διασχίσει ηλεκτρικό φορτίο τη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου – διαλύματος.

Σε μια ηλεκτροχημική κυψέλη πραγματοποιούνται τόσο φαρανταϊκές όσο και μη φαρανταϊκές διεργασίες. Το πρώτο που εξετάζεται σε μια ηλεκτροδιακή αντίδραση είναι οι φαρανταϊκές διεργασίες, παρόλα αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και οι μη φαρανταϊκές όταν χρησιμοποιούμε ηλεκτροχημικά δεδομένα για να εξάγουμε συμπεράσματα για την ανταλλαγή φορτίων και τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα [12].

2.4 Γαλβανικά και ηλεκτρολυτικά στοιχεία

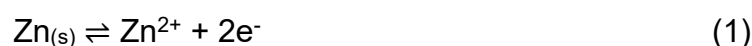
Έστω ότι έχουμε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο, το οποίο αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο ψευδαργύρου βυθισμένο σε διάλυμα θειικού ψευδαργύρου και από ένα ηλεκτρόδιο χαλκού βυθισμένο σε διάλυμα θειικού χαλκού (Σχήμα 1). Τα δύο διαλύματα συνδέονται με μια *γέφυρα άλατος* (*salt bridge*), η οποία αποτελείται από ένα σωλήνα γεμάτο με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου καλίου ή άλλου ηλεκτρολύτη. Τα δύο άκρα του σωλήνα φράσσονται με πορώδη βύσματα, τα οποία επιτρέπουν την κίνηση των ιόντων μέσω αυτών, αλλά αποτρέπουν το σιφωνισμό του υγρού από το ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη στο άλλο. Με τη γέφυρα επιτυγχάνεται απομόνωση των περιεχομένων των δύο τμημάτων του στοιχείου και συγχρόνως διατηρείται η μεταξύ τους ηλεκτρική επαφή. Η απομόνωση είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ των ιόντων χαλκού και του ηλεκτροδίου ψευδαργύρου. Το στοιχείο αυτό περιλαμβάνει δύο *υγρούς συνδέσμους* (*liquid junctions*). Ο ένας σύνδεσμος εξασφαλίζει την επαφή του διαλύματος θειικού ψευδαργύρου με το ένα άκρο της γέφυρας και ο άλλος την επαφή του διαλύματος θειικού χαλκού με το άλλο άκρο της γέφυρας. Σε κάθε επαφή

δημιουργείται ένα μικρό *δυναμικό συνδέσμου (junction potential)*, το οποίο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ακρίβεια της ανάλυσης^[12].



Σχήμα 1. Γαλβανικό ηλεκτροχημικό στοιχείο με γέφυρα άλατος^[25].

Η ολική αντίδραση στο στοιχείο είναι το άθροισμα των δύο ημιαντιδράσεων του στοιχείου, που αναγράφονται ως εξισώσεις:



Δηλαδή:



Το δυναμικό, το οποίο αναπτύσσεται στο στοιχείο αυτό, αποτελεί μέτρο της τάσης της προηγούμενης αντίδρασης να προχωρήσει προς την κατάσταση ισορροπίας. Επομένως, όταν οι ενεργότητες των ιόντων χαλκού και ψευδαργύρου είναι $0,0100 M$, αναπτύσσεται δυναμικό $1,100 V$, τιμή ενδεικτική του ότι η αντίδραση απέχει πολύ από την ισορροπία. Καθώς προχωρεί η αντίδραση, το δυναμικό μειώνεται συνεχώς, ώσπου να μηδενιστεί, οπότε το σύστημα βρίσκεται πια σε κατάσταση ισορροπίας.

Στοιχεία, σαν αυτό που απεικονίζεται στο Σχήμα 1, τα οποία λειτουργούν κατά τρόπο που παράγουν ηλεκτρική ενέργεια, ορίζονται ως *γαλβανικά στοιχεία*. Αντίθετα, τα στοιχεία που καταναλώνουν ηλεκτρική ενέργεια, ονομάζονται *ηλεκτρολυτικά στοιχεία*. Για παράδειγμα, το εξεταζόμενο στοιχείο θα μπορούσε να μετατραπεί σε

ηλεκτρολυτικό με σύνδεση του ηλεκτροδίου ψευδαργύρου με τον αρνητικό πόλο και του ηλεκτροδίου χαλκού με τον θετικό πόλο μιας πηγής συνεχούς τάσης. Εάν η τάση της πηγής ξεπεράσει τα 1,1 V, οι δύο ηλεκτροδιακές αντιδράσεις θα αντιστραφούν και η καθαρή ηλεκτροδιακή αντίδραση θα γίνει:



Στοιχείο, στο οποίο αντιστροφή στη φορά του ρεύματος προκαλεί αντιστροφή στις αντιδράσεις και των δύο ηλεκτροδίων καλείται *χημικώς αντιστρεπτό στοιχείο*.

Κάθοδος σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο είναι εξ ορισμού το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται αναγωγή, ενώ *άνοδος* είναι το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται οξειδωση. Οι ορισμοί αυτοί ισχύουν και για τα γαλβανικά και για τα ηλεκτρολυτικά στοιχεία. Για το γαλβανικό στοιχείο το οποίο απεικονίζεται στο Σχήμα 1, το ηλεκτρόδιο χαλκού είναι η κάθοδος και το ηλεκτρόδιο ψευδαργύρου είναι η άνοδος. Αντίθετα, αν το ίδιο στοιχείο λειτουργήσει ως ηλεκτρολυτικό, το ηλεκτρόδιο χαλκού θα είναι η άνοδος και το ηλεκτρόδιο ψευδαργύρου, η κάθοδος^[12].

Το δυναμικό ηλεκτροδίου οποιουδήποτε οξειδοαναγωγικού ζεύγους εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από την ενεργότητα του οξειδωτικού και του αναγωγικού του ζεύγους, γι' αυτό και εξαρτάται από οτιδήποτε επηρεάζει την ενεργότητα αυτή, όπως είναι η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η παρουσία συμπλεκτικών μέσων, το pH του διαλύματος, η φύση του διαλύτη. Η σχέση που συνδέει το δυναμικό μιας οξειδοαναγωγικής ημιαντίδρασης με τις ενεργότητες δίνεται από την *εξίσωση του Nernst*, που έχει τη μορφή^[13]:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\alpha_{\text{Aox}}}{\alpha_{\text{Aox}}} \quad (5)$$

Όπου,

E = δυναμικό ηλεκτροδίου (volt)

E° = κανονικό δυναμικό αναγωγής του ηλεκτροδίου (volt)

R = παγκόσμια σταθερά των αερίων = 8,31441 volt·coulomb·°K⁻¹·mol⁻¹

T = απόλυτη θερμοκρασία (°K)

F = σταθερά του Faraday = 96485,38 coulombs/eq

n = ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στη αντίδραση (eq/mol)

α_{Aox} = η ενεργότητα της ανηγμένης μορφής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους,

α_{Aox} = η ενεργότητα της οξειδωμένης μορφής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους.

2.5 Ρεύματα στα ηλεκτροχημικά στοιχεία

Με εξαίρεση τις ποτενσιομετρικές τεχνικές, όπου οι μετρήσεις πραγματοποιούνται πρακτικά σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος, στις υπόλοιπες τεχνικές υπάρχει ροή ηλεκτρικού ρεύματος και σε πολλές πραγματοποιούνται μετρήσεις ρεύματος. Για τον λόγο αυτό εξετάζεται η συμπεριφορά των στοιχείων, όταν αυτά διαρρέονται από σημαντικά ρεύματα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο ηλεκτρισμός μεταφέρεται μέσω του στοιχείου με κίνηση των ιόντων. Όταν τα ρεύματα είναι μικρά, ισχύει ο νόμος του Ohm: $E = IR$, όπου E η διαφορά δυναμικού σε volt, στην οποία οφείλεται η κίνηση των ιόντων, I είναι το ρεύμα σε ampère και R η αντίσταση του ηλεκτρολύτη στη ροή του ρεύματος σε ohm. Η αντίσταση εξαρτάται από το είδος των ιόντων και τις συγκεντρώσεις τους στο διάλυμα. Όταν το ηλεκτροχημικό στοιχείο διαρρέεται από συνεχές ρεύμα, το δυναμικό του στοιχείου κανονικά αποκλίνει από την τιμή, που προκύπτει με θερμοδυναμικούς υπολογισμούς. Η απόκλιση αυτή οφείλεται σε πολλά φαινόμενα, όπως η *ωμική αντίσταση* και μια ποικιλία *φαινομένων πόλωσης*, όπως η *υπέρταση μεταφοράς φορτίου*, η *υπέρταση αντίδρασης*, η *υπέρταση διάχυσης* και η *υπέρταση κρυστάλλωσης*. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού στα γαλβανικά στοιχεία ή την αύξηση του απαιτούμενου δυναμικού για να αρχίσει η ροή ρεύματος στα ηλεκτρολυτικά στοιχεία.

Όταν γίνει δυνατή η ροή ρεύματος μέσω ενός γαλβανικού ή ηλεκτρολυτικού στοιχείου, απαιτείται η εφαρμογή ενός δυναμικού για να αντισταθμιστεί η αντίσταση των ιόντων κατά την κίνησή τους προς την άνοδο ή την κάθοδο. Το δυναμικό αυτό υπακούει στο νόμο του Ohm και αναφέρεται ως *ωμικό δυναμικό (ohmic potential)* ή *πτώση IR (IR drop)*. Το καθαρό αποτέλεσμα της πτώσης IR είναι η αύξηση του δυναμικού, που απαιτείται για να αρχίσει η λειτουργία ενός ηλεκτρολυτικού στοιχείου και η μείωση του δυναμικού ενός γαλβανικού στοιχείου. Επομένως, η πτώση IR αφαιρείται πάντα από τη θεωρητική τιμή δυναμικού του στοιχείου και είναι:

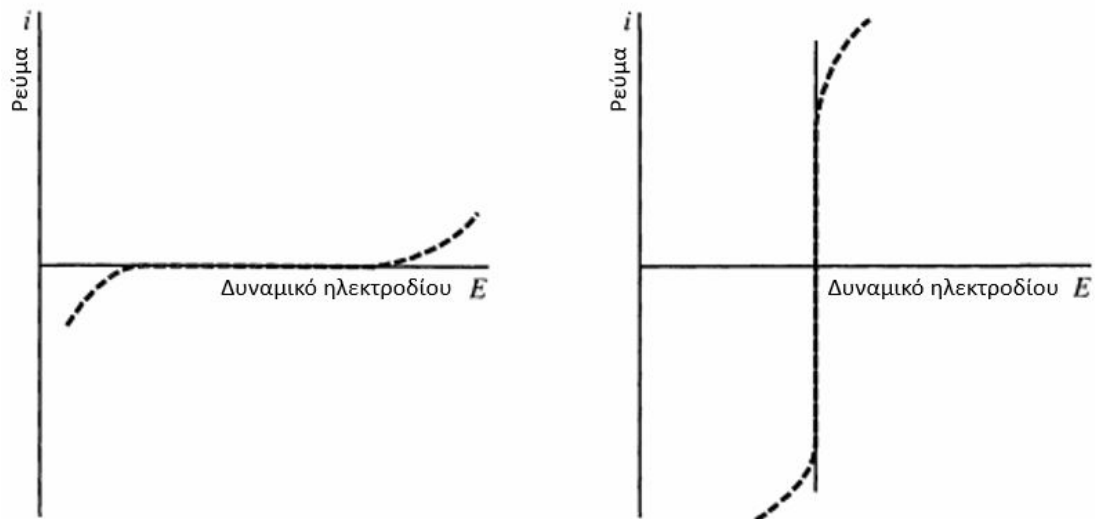
$$E_{\text{στοιχ}} = E_{\text{κάθοδου}} - E_{\text{άνοδου}} - IR \quad (6)$$

Αρκετές σημαντικές ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές βασίζονται στις *καμπύλες ρεύματος-τάσης*, οι οποίες προκύπτουν με μέτρηση των μεταβολών του ρεύματος, το οποίο διαρρέει ένα στοιχείο, όταν μεταβάλλεται το δυναμικό του. Από την εξίσωση (6) προβλέπεται ότι εάν τα δυναμικά των ηλεκτροδίων είναι σταθερά, τότε θα υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της τάσης στοιχείου και του ρεύματος. Στην πραγματικότητα παρουσιάζονται συχνά αποκλίσεις από τη γραμμικότητα. Στις περιπτώσεις αυτές

λέγεται ότι το στοιχείο είναι *πολωμένο (polarized)*. Η πόλωση μπορεί να οφείλεται στο ένα ή και στα δύο ηλεκτρόδια.

Η πόλωση ενός ηλεκτροδίου εξετάζεται ως προς ένα άλλο ηλεκτρόδιο, το οποίο δεν πολώνεται εύκολα. Ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο δεν πολώνεται εύκολα χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιφάνεια και η λειτουργία του βασίζεται σε μια ταχεία και αντιστρεπτή ημιαντίδραση.

Στο ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο το ρεύμα διατηρείται σταθερό και ανεξάρτητο του δυναμικού σε ευρεία περιοχή τιμών. Στο Σχήμα 2 (αριστερά), απεικονίζεται η καμπύλη ρεύματος-τάσης για ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο συμπεριφέρεται ως ιδανικά πολωμένο. Στο Σχήμα 2 (δεξιά), απεικονίζεται η καμπύλη ρεύματος-τάσης ενός ηλεκτροδίου, που συμπεριφέρεται ως ιδανικά μη πολωμένο (ή αποπολωμένο), όπου το δυναμικό δεν εξαρτάται από το ρεύμα^[12].



Σχήμα 2. Καμπύλες ρεύματος-τάσης ενός ιδανικά πολωμένου (αριστερά) και μη πολωμένου ηλεκτροδίου (δεξιά). Με διακεκομμένες γραμμές αποδίδονται οι αποκλίσεις από την ιδανική συμπεριφορά των πραγματικών ηλεκτροδίων^[26].

Μέτρο της πόλωσης ενός ηλεκτροδίου είναι η *υπέρταση (overvoltage)* ή το *υπερδυναμικό (overpotential)* η , το οποίο ισούται με τη διαφορά μεταξύ του *πραγματικού δυναμικού* του ηλεκτροδίου E και του *θερμοδυναμικού δυναμικού* ή *δυναμικού ισορροπίας* $E_{ισ}$. Δηλαδή:

$$\eta = E - E_{ισ} \quad (7)$$

όπου $E < E_{ισ}$. Η πόλωση μειώνει πάντοτε το δυναμικό ηλεκτροδίου ενός συστήματος^[12].

2.6 Μεταφορά μάζας στα ηλεκτροχημικά στοιχεία

Ένα ηλεκτρόδιο μπορεί να δράσει μόνο στην πολύ λεπτή στιβάδα διαλύματος που βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνειά του. Επομένως, για να συντηρηθεί ένα φαρανταϊκό ρεύμα απαιτείται συνεχής μεταφορά δραστικών σωματιδίων από την κύρια μάζα του διαλύματος προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η μεταφορά μάζας μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις μηχανισμούς: α) *μεταγωγή (convection)*, β) *μετανάστευση ή όδευση (migration)* και γ) *διάχυση (diffusion)*.

Μεταγωγή πραγματοποιείται με ανάδευση ή γενικά με εξαναγκασμένη ροή του διαλύματος προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Μετανάστευση είναι η κίνηση των ιόντων στο διάλυμα, η οποία οφείλεται σε ηλεκτροστατική έλξη τους από το φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Διάχυση είναι η κίνηση των σωματιδίων λόγω βαθμίδωσης της συγκέντρωσής τους^[12].

Στις περισσότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές η μεταφορά μάζας με όδευση δεν εξυπηρετεί κανένα αναλυτικό σκοπό, για αυτό και εξαλείφεται σχεδόν με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών. Ειδικότερα στη βολταμετρία, μεταφορά της ηλεκτροενεργού ουσίας γίνεται πρακτικά μόνο με διάχυση, γιατί η φυσική ροή ελαχιστοποιείται με πλήρη αταραξία του διαλύματος, ενώ η μεταφορά με ηλεκτροστατικές έλξεις καθίσταται αμελητέα με προσθήκες μεγάλης ποσότητας φέροντος ηλεκτρολύτη, σε συγκέντρωση τουλάχιστον εκατονταπλάσια της συγκέντρωσης της ηλεκτροενεργού ουσίας. Με αυτόν τον τρόπο, ο φέρων ηλεκτρολύτης γίνεται ο κύριος μεταφορέας φορτίου μέχρι το ηλεκτρόδιο, όπου η μεταφορά φορτίου γίνεται μόνο από την ηλεκτροενεργό ουσία, γιατί αυτός είναι ηλεκτρικά ανενεργός στη χρησιμοποιούμενη περιοχή τάσεων^[13].

2.7 Είδη ηλεκτροαναλυτικών μεθόδων

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι ανάλυσης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις **διεπιφανειακές ή μεσεπιφανειακές (interfacial)** και τις τεχνικές **κύριας μάζας (bulk)**. Οι τεχνικές διεπιφανείας βασίζονται σε διεργασίες, που πραγματοποιούνται στην περιοχή μεταξύ της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και της λεπτής στιβάδας του διαλύματος, που βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια αυτή. Αντίθετα, οι τεχνικές κύριας μάζας βασίζονται σε φαινόμενα, που πραγματοποιούνται στην κύρια μάζα του διαλύματος και αποφεύγονται οι διεπιφανειακές διεργασίες. Οι περισσότερο

χρησιμοποιούμενες είναι οι τεχνικές μεσεπιφάνειας, οι οποίες υποδιαιρούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: από τη μια υπάρχουν οι **τεχνικές ισορροπίας** ή **στατικές** (*equilibrium techniques*) και από την άλλη υπάρχουν οι **δυναμικές τεχνικές** (*dynamic techniques*), οι οποίες βασίζονται σε ηλεκτροχημικά στοιχεία, που λειτουργούν υπό συνθήκες απουσίας ή παρουσίας ρεύματος, αντίστοιχα. Οι στατικές τεχνικές αναφέρονται σε μετρήσεις δυναμικού (ποτενσιομετρία), παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω ταχύτητας και εκλεκτικότητας^[12].

Μέθοδος	Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος	Μετρούμενη φυσική ιδιότητα
Ποτενσιομετρία	$i=0$	E
Ποτενσιομετρική Ογκομέτρηση	$i=0$	E συναρτ. V
Χρονοποτενσιομετρία	i	E συναρτ. t
Βολταμμετρία	E	i συναρτ. E
Πολαρογραφία	E	i συναρτ. E
Αμπερομετρική Ογκομέτρηση	E	i συναρτ. V
Αναδιαλυτική Βολταμμετρία	E	i συναρτ. 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 συναρτ. V

Πίνακας 1. Ηλεκτροαναλυτικές μέθοδοι, όπου i =ένταση ρεύματος, E =τάση, V =όγκος τιτλοδότη, t =χρόνος, AC =εναλλασσόμενο ρεύμα, $1/R$ =αγωγιμότητα^[13].

2.8 Αμπερομετρία

Η **αμπερομετρία** είναι μία ηλεκτροαναλυτική τεχνική, που βασίζεται στην εφαρμογή σταθερού αναγωγικού ή οξειδωτικού δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας και την ακόλουθη μέτρηση του φαρανταϊκού ρεύματος που προκύπτει. Ο όρος αμπερομετρία προέρχεται από τη μονάδα μέτρησης της έντασης του ρεύματος, το «*Ampère*», και από τη λέξη «μετρώ». Η ένταση του μετρούμενου ρεύματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας που ανάχθηκε ή οξειδώθηκε^[26,27]. Οι αμπερομετρικές τεχνικές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην ανάπτυξη αισθητήρων και βιοαισθητήρων, όπως

του *kit παρακολούθησης γλυκόζης* που είναι εμπορικά διαθέσιμο, αλλά και σε άλλες εφαρμογές με *κλινικό, φαρμακευτικό, περιβαλλοντικό και βιομηχανικό* ενδιαφέρον.

2.8.1 Αρχές της αμπερομετρίας

Στην αμπερομετρία το ρεύμα που παράγεται από μια φαρανταϊκή αντίδραση σχετίζεται με τη συγκέντρωση του ηλεκτροενεργού αναλύτη. Η αντίδραση που μπορεί να λάβει χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, που είναι πολωμένο σε ένα συγκεκριμένο δυναμικό, μπορεί να συμβολιστεί με την παρακάτω σχέση:



όπου O_x και R_{ed} : η οξειδωμένη και η ανηγμένη μορφή του αναλύτη αντίστοιχα, και n_e : ο αριθμός ηλεκτρονίων, που συμμετέχουν στην αντίδραση. Σε σταθερό δυναμικό, η μεταφορά των ηλεκτρονίων συμβαίνει σε μια ελεγχόμενη τιμή διάχυσης, οπότε η διαδικασία πλέον ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας. Το ελεγχόμενο ρεύμα διάχυσης " i " εξαρτάται από την πυκνότητα της στιβάδας διάχυσης " δ ", το συντελεστή διάχυσης του αναλύτη " D ", τον αριθμό των μεταφερθέντων ηλεκτρονίων " n ", το εμβαδόν της επιφάνειας " A " του ηλεκτροδίου, τη συγκέντρωση του αναλύτη και τη σταθερά του Faraday " F " ($96,480 \text{ C mol}^{-1}$), όπως φαίνεται στην εξίσωση (9):

$$i = \frac{nFAD(C_{bulk} - C_{x=0})}{\delta} \quad (9)$$

όπου C_{bulk} και $C_{x=0}$, αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του αναλύτη στο φέροντα ηλεκτρολύτη και στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αντίστοιχα^[27].

2.8.2 Χρονοαμπερομετρία

Στη χρονοαμπερομετρία εφαρμόζεται ένα δυναμικό στο ηλεκτροχημικό στοιχείο και καταγράφεται το παραγόμενο ρεύμα συναρτήσει του χρόνου. Στο Σχήμα 3^A παρουσιάζεται γράφημα δυναμικού συναρτήσει χρόνου για τον προσδιορισμό θαλλίου (Tl). Κατά την εφαρμογή δυναμικού E_1 είναι σταθερό μόνο το Tl^+ , ενώ στο δυναμικό E_2 σταθεροποιείται μόνο το Tl^{3+} . Το αντίστοιχο χρονοαμπερογράφημα παρουσιάζεται στο Σχήμα 3^B. Αρχικά, παρατηρείται μια απότομη αύξηση του ρεύματος και στη συνέχεια φθίνει με ομαλό τρόπο μέχρι τελικά να μηδενιστεί. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εφαρμογής του δυναμικού και της χρονικής στιγμής που η ένταση του

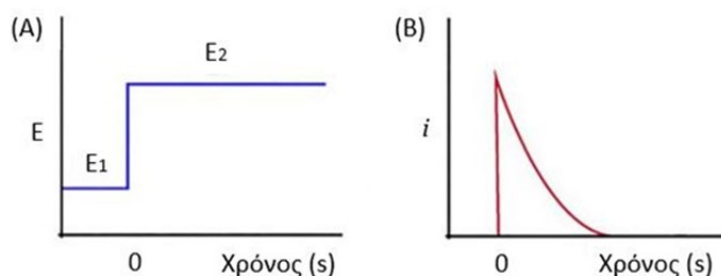
ρεύματος φθάνει την μέγιστη τιμή ονομάζεται *χρόνος αύξησης (rise time)*. Μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα το ηλεκτρόδιο έρχεται σε επαφή με μια περιοχή που δεν περιέχει ιόντα Tl^+ . Η συγκεκριμένη περιοχή ονομάζεται *κορεσμένη στιβάδα (depletion layer)* ή κάποιες φορές *στιβάδα Nernst (Nernst layer)*. Η διάχυση ελέγχει τη μεταφορά του αναλύτη από το κύριο διάλυμα στις περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης κοντά στο ηλεκτρόδιο. Συνεπώς, υπάρχει βαθμίδα συγκέντρωσης από το μέσο διάλυσης στην επιφάνεια του ηλεκτρολύτη. Αυτή η κατάσταση μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση *Cottrell*, η οποία ορίζει την εξάρτηση ρεύματος-χρόνου για γραμμικό έλεγχο διάχυσης σε ένα ηλεκτρόδιο:

$$I_{lim} = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (10)$$

Όπου:

- n : ο αριθμός των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων,
- F : η σταθερά Faraday,
- A : η ηλεκτροχημική επιφάνεια του ηλεκτροδίου,
- C : η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα,
- t : ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να μηδενιστεί το ρεύμα, και
- D : ο συντελεστής διάχυσης.

Αποκλίσεις από τη θεωρητική συμπεριφορά οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως η *μη γραμμική διάχυση*, η *φόρτιση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας* κατά την εφαρμογή των βημάτων δυναμικού και η *διεξαγωγή ομοιογενών αντιδράσεων*, οι οποίες τυχόν συνοδεύουν την κύρια αντίδραση μεταφοράς φορτίου [26,27].



Σχήμα 3. Τυπικό χρονοαμπερομετρικό πείραμα: (A) δυναμικό ως συνάρτηση του χρόνου, και (B) παραγόμενο ρεύμα ως συνάρτηση του χρόνου.

2.8.3 Χαρακτηριστικά των αμπερομετρικών μετρήσεων

Η αμπερομετρική μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης πλήθους ηλεκτροενεργών ουσιών, με την κατάλληλη επιλογή του εφαρμοζόμενου δυναμικού και του υλικού του ηλεκτροδίου εργασίας. Στην περίπτωση εφαρμογής ακατάλληλου δυναμικού, το ρεύμα που προκύπτει, ενδέχεται να προέρχεται από τη συνεισφορά πολλών διαφορετικών ηλεκτροενεργών ουσιών. Γενικά με την αύξηση του δυναμικού προς θετικές τιμές αυξάνεται ο αριθμός των ουσιών που οξειδώνονται, ενώ ο αριθμός των ουσιών που ανάγονται (που είναι λιγότερες από αυτές που οξειδώνονται) αυξάνεται όσο αρνητικότερο γίνεται το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Έτσι, προκειμένου να αποφεύγονται οι παρεμποδίσεις, είναι επιθυμητό να εφαρμόζονται χαμηλές τιμές δυναμικού, ώστε σε ένα τέτοιο χαμηλό δυναμικό (αρνητικότερο) να μην μπορούν να οξειδωθούν άλλες ουσίες παρά μόνον ο αναλύτης. Για αυτό τον λόγο, συνιστάται η χρήση *διαμεσολαβητών*, οι οποίοι έχουν χαμηλά δυναμικά οξειδοαναγωγής. Παραδείγματος χάριν, η οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου απαιτεί δυναμικό +0,65 V (έναντι Ag/AgCl) σε ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου, ενώ με παρουσία Πρωσσικού Μπλε ως διαμεσολαβητή, επιτρέπει τον προσδιορισμό του H₂O₂ στα 0 V, δυναμικό στο οποίο πολλές άλλες ουσίες δεν οξειδώνονται και άρα μειώνονται οι παρεμβολές.

Η εκλεκτικότητα αυτής της τεχνικής ως προς τα ηλεκτροενεργά είδη, συνεπώς ρυθμίζεται με κατάλληλη επιλογή του εφαρμοζόμενου δυναμικού και με κατάλληλη επιλογή του υλικού του ηλεκτροδίου εργασίας. Η κατάλληλη επιλογή του φέροντος ηλεκτρολύτη επίσης προσφέρει στην εκλεκτικότητα της μεθόδου. Σε περιπτώσεις, όπου παρεμποδίζει η αναγωγή του οξυγόνου, είναι αναγκαία η απομάκρυνσή του με απαέρωση του διαλύματος με αδρανές αέριο, όπως άζωτο ή αργό.

Αν και η αμπερομετρία έχει αρκετά πλεονεκτήματα, έχει επίσης και ορισμένα μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, μπορεί να υπάρξει βαθμιαία απώλεια της ευαισθησίας ανίχνευσης και ολίσθηση του σήματος, λόγω μίας σταδιακής «δηλητηρίασης» της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας (από προϊόντα ηλεκτροδιακών αντιδράσεων) με αποτέλεσμα την ανάγκη συχνού καθαρισμού της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Αυτό συμβαίνει όταν το προϊόν μιας αντίδρασης προσροφάται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εμποδίζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Μια μέθοδος για την αντιμετώπιση της προσρόφησης του προϊόντος μιας αντίδρασης πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, βασίζεται στην τεχνική της παλμικής αμπερομετρίας, όπου το εφαρμοζόμενο δυναμικό μεταβάλλεται με σταδιακό τρόπο. Με αυτή την προσέγγιση,

ο αμπερομετρικός ανιχνευτής μετράει το ρεύμα μόνο κατά τη διάρκεια του σύντομου διαστήματος εφαρμογής του παλμού, μειώνοντας έτσι το χρόνο μόλυνσης του ηλεκτροδίου. Έτσι το ηλεκτρόδιο εργασίας υπόκειται σε μια διαδικασία συνεχούς «αυτοκαθαρισμού» και «επανενεργοποίησης». Για παράδειγμα, στο ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα, που παρουσιάστηκε από τον Adams το 1958, τα προβλήματα μόλυνσης και προσρόφησης ξεπερνούνται με την ανανέωση της επιφάνειάς του έπειτα από κάθε χρήση [27,28].

2.9 Βολταμμετρία

Η **βολταμμετρία** είναι ηλεκτροαναλυτική μέθοδος, που βασίζεται στην μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος, το οποίο αναπτύσσεται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο, ως συνάρτηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού.

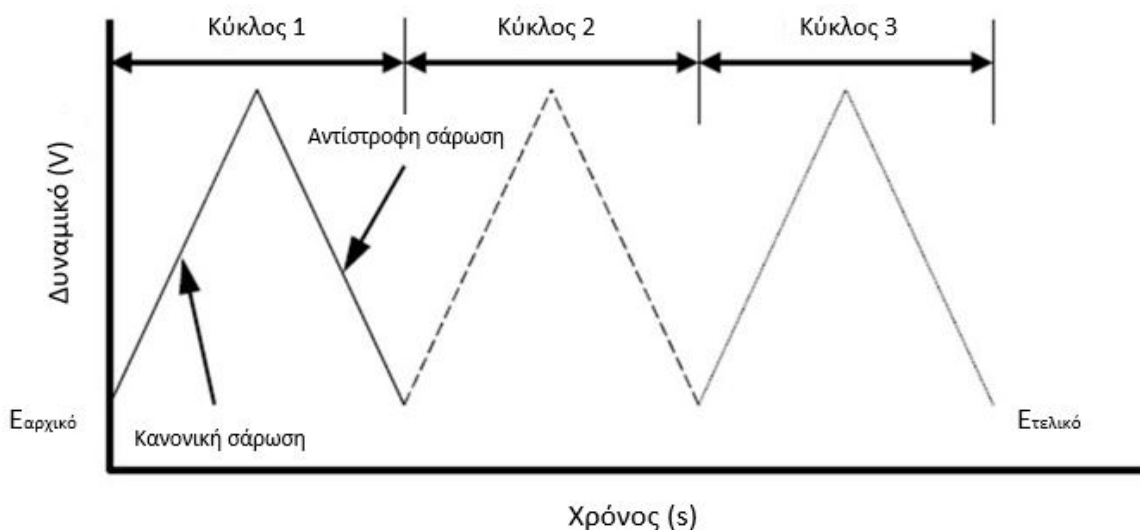
Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν αρκετές και ενδιαφέρουσες τροποποιήσεις των κλασικών βολταμμετρικών τεχνικών, που βελτίωσαν σημαντικά την ευαισθησία και εκλεκτικότητά τους. Επιπλέον, στο εμπόριο άρχισε να διατίθεται χαμηλού κόστους και φορητή οργανολογία εντείνοντας το ενδιαφέρον προς τις βολταμμετρικές τεχνικές και την εφαρμογή τους στον προσδιορισμό πλήθους ουσιών και ειδικότερα ουσιών *φαρμακευτικού, περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος* [12].

2.9.1 Κυκλική βολταμμετρία και βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης

Η *κυκλική βολταμμετρία (cyclic voltammetry, CV)* είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη λήψη ποιοτικών και ποσοτικών πληροφοριών για τις ηλεκτροχημικές δράσεις. Η κυκλική βολταμμετρία είναι συνήθως το πρώτο πείραμα που εκτελείται κατά την ηλεκτροχημική μελέτη μιας ένωσης ή ενός δείγματος. Συγκεκριμένα, παρέχει γρήγορο εντοπισμό των δυναμικών οξειδοαναγωγής των ηλεκτροενεργών ουσιών [10].

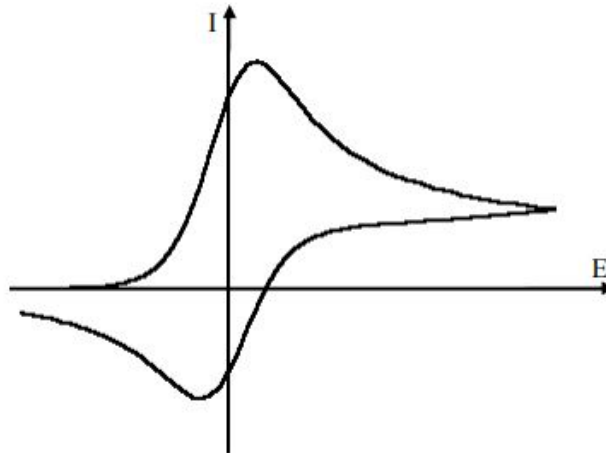
Στην κυκλική βολταμμετρία, καταγράφεται το ρεύμα, το οποίο διαρρέει ένα ακίνητο ηλεκτρόδιο σε στατικό διάλυμα, όταν το ηλεκτρόδιο υπόκειται σε τριγωνική κυματομορφή σάρωσης δυναμικού (Σχήμα 4). Αρχικά, το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά και μετά η φορά σάρωσης αλλάζει και το δυναμικό επιστρέφει στην αρχική του τιμή. Αυτός ο κύκλος διέγερσης (ή σάρωσης) μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές. Η κατεύθυνση της αρχικής σάρωσης μπορεί να είναι είτε προς αρνητικές, είτε προς θετικές τιμές, ανάλογα με τη σύσταση του δείγματος. Η σάρωση προς

κατεύθυνση θετικότερων δυναμικών καλείται *σάρωση ορθής φοράς* ή *κανονική (ανοδική) σάρωση* (forward scan), ενώ η σάρωση προς την αντίθετη κατεύθυνση λέγεται *σάρωση ανάστροφης φοράς* ή *αντίστροφη (καθοδική) σάρωση* (reverse scan)^[12]. Κατά τη σάρωση του δυναμικού, ο ποτενσιοστάτης μετράει το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Το γράφημα, που προκύπτει από το μετρούμενο ρεύμα σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό, ονομάζεται *κυκλικό βολταμμογράφημα* (Σχήμα 5)^[10].



Σχήμα 4. Διάγραμμα κυματομορφής του δυναμικού σε συνάρτηση με το χρόνο στην κυκλική βολταμμετρία^[29].

Γενικά, όταν σαρώνεται ανοδικά το δυναμικό, δηλαδή προς θετικότερες τιμές, τότε λαμβάνουν χώρα οξειδώσεις, ενώ αντίστροφα, όταν σαρώνεται καθοδικά το δυναμικό, δηλαδή προς αρνητικότερες τιμές, τότε λαμβάνουν χώρα αναγωγές. Οι οξειδώσεις και οι αναγωγές γίνονται αντιληπτές από το σχηματισμό ανοδικών και καθοδικών κορυφών αντίστοιχα, στο βολταμμογράφημα. Αυτές οι χαρακτηριστικές κορυφές σε ένα κυκλικό βολταμμογράφημα προκαλούνται από τη δημιουργία μιας στιβάδας διάχυσης κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου^[10]. Ένα τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για μια πλήρως αντιστρεπτή ημιαντίδραση φαίνεται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για μια αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική διαδικασία^[30].

Η βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης (*Linear Sweep Voltammetry, LSV*) του δυναμικού είναι η απλούστερη βολταμμετρική τεχνική για την πρόκληση αναγωγής ή οξείδωσης του συστατικού που πρόκειται να προσδιοριστεί. Στην περίπτωση αυτή το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο. Το ρεύμα κορυφής αυξάνεται με ταχύτερη σάρωση του δυναμικού. Το χωρητικό ρεύμα, όμως, που φορτίζει το ηλεκτρόδιο στο εφαρμοζόμενο δυναμικό, είναι επίσης ανάλογο της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. Έτσι, η αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού, με σκοπό να αυξηθεί το ρεύμα κορυφής, προκαλεί επίσης αύξηση στο ρεύμα φόρτισης. Δηλαδή, το χωρητικό ρεύμα περιορίζει το όριο ανίχνευσης με την τεχνική της βολταμμετρίας γραμμικής σάρωσης του δυναμικού. Παρ' όλα αυτά, εξαιτίας της οργανολογικής της απλότητας βρίσκει μεγάλη εφαρμογή^[12,28].

2.9.2 Παλμική βολταμμετρία

Στις *παλμικές τεχνικές*, κατά τη σάρωση, εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας μια σειρά παλμών δυναμικού (αυξομειώσεις του δυναμικού). Καθώς εφαρμόζεται ο παλμός, το *χωρητικό ρεύμα* αρχίζει να μειώνεται ταχέως (εκθετικά), με αποτέλεσμα κατά το τέλος του παλμού να είναι αμελητέο, ενώ το *φαρμανταϊκό ρεύμα* μειώνεται βραδύτερα. Έτσι, μετρώντας το ρεύμα στο τέλος του παλμού, μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός ανάμεσα στο χωρητικό και στο φαρμανταϊκό ρεύμα. Με τη χρήση των παλμών επιτυγχάνεται η μείωση των ορίων ανίχνευσης. Οι διάφορες

παλμικές τεχνικές, στην πραγματικότητα, διαφέρουν ως προς την κυματομορφή σάρωσης του δυναμικού^[31].

2.9.2.1 Βολταμμετρία κανονικού παλμού – Normal Pulse Voltammetry (NPV)

Στην τεχνική της κανονικής παλμικής βολταμμετρίας, το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας μεταβάλλεται με τη βοήθεια παλμών αυξανόμενου πλάτους, που υπερτίθενται σε ένα αρχικά σταθερό (βασικό) δυναμικό (Σχήμα 6^A). Ανάμεσα στους παλμούς το ηλεκτρόδιο εργασίας διατηρείται σε σταθερό δυναμικό, στο οποίο δεν αντιδρά ο αναλύτης. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται κατά το τέλος της εφαρμογής του παλμού, αφού τότε το χωρητικό ρεύμα έχει ελαττωθεί σημαντικά. Υπάρχει μία παραπλήσια τεχνική, η βολταμμετρία αντίστροφου παλμού, όπου η μορφή των παλμών είναι ακριβώς η κατοπτρική απεικόνιση των παλμών της βολταμμετρίας κανονικού παλμού^[10,32].

2.9.2.2 Βολταμμετρία διαφορικού παλμού – Differential Pulse Voltammetry (DPV)

Στην τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας, στο ηλεκτρόδιο εργασίας εφαρμόζονται παλμοί σταθερού πλάτους, οι οποίοι υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό (Σχήμα 6^B). Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού. Το πρώτο ρεύμα αφαιρείται από το δεύτερο και αυτή η διαφορά, σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό, παριστάνεται γραφικά στο βολταμμογράφημα. Το βολταμμογράφημα που προκύπτει, αποτελείται από κορυφές ρευμάτων, το ύψος των οποίων είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των αναλυτών. Η διαφορική παλμική βολταμμετρία είναι πιο ευαίσθητη από τη βολταμμετρία κανονικού παλμού, γι' αυτό είναι μια εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική για τη μέτρηση ιχνοποσοτήτων οργανικών και ανόργανων ουσιών^[10,32].

Η απόκριση των μετρήσεων της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας με τη μορφή κορυφής, έχει ως αποτέλεσμα τον ικανοποιητικό διαχωρισμό δύο ουσιών με παραπλήσιο δυναμικό οξειδοαναγωγής. Ωστόσο, σημαντικό ρόλο για τη μέτρηση, παίζει και το πλάτος της κορυφής. Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση μιγμάτων, λόγω της απόκρισης με τη μορφή κορυφών.

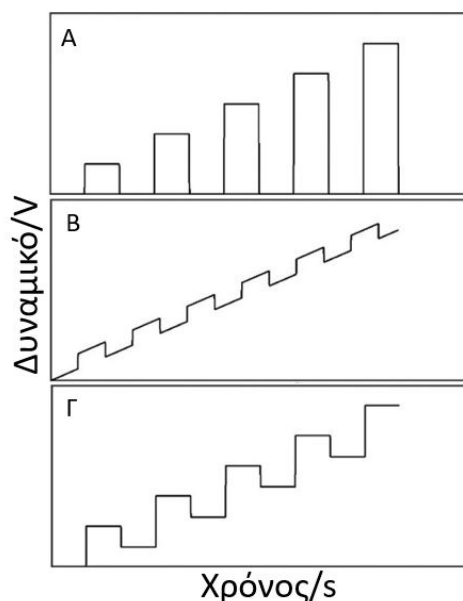
Η επιλογή του κατάλληλου πλάτους παλμού και ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού είναι δύσκολη, καθώς πρέπει να εξισορροπούνται πολλές παράμετροι,

όπως η ευαισθησία, η διαχωριστική ικανότητα και η ταχύτητα. Μεγαλύτερο πλάτος παλμού, για παράδειγμα, προκαλεί μεγαλύτερες και ευρύτερες κορυφές, με συνέπεια να επιτυγχάνεται υψηλότερη ευαισθησία, αλλά χαμηλότερη διαχωριστική ικανότητα. Μη αντιστρεπτά οξειδοαναγωγικά συστήματα προκαλούν μικρότερες και ευρύτερες κορυφές σε σχέση με αυτές, που προβλέπονται για τα αντιστρεπτά συστήματα. Η βολταμμετρία διαφορικού παλμού, πέρα από τις βελτιώσεις σε ευαισθησία και διαχωριστική ικανότητα, μπορεί να δώσει, επίσης, πληροφορίες για τη χημική μορφή με την οποία εμφανίζεται ο αναλύτης, όπως για παράδειγμα, την οξειδωτική του κατάσταση ή το αν είναι συμπλοκοποιημένος^[10].

2.9.2.3 Βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος – *Square Wave Voltammetry (SWV)*

Στην τεχνική της βολταμμετρίας τετραγωνικού κύματος, στο ηλεκτρόδιο εργασίας εφαρμόζονται τετραγωνικοί παλμοί σταθερού πλάτους, οι οποίοι υπερτίθενται σε κλιμακωτά μεταβαλλόμενο δυναμικό (Σχήμα 6Γ). Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές κατά τη διάρκεια του κύκλου του τετραγωνικού παλμού: κατά το τέλος του κανονικού παλμού και κατά το τέλος του αντίστροφου παλμού. Οι αντίστροφοι παλμοί προκαλούν την αντίστροφη δράση του προϊόντος, σε σχέση με αυτή του κανονικού παλμού. Η διαφορά των δύο ρευμάτων παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το κλιμακωτό δυναμικό στο βολταμμογράφημα. Το βολταμμογράφημα, που προκύπτει, δίνει κορυφή, η ένταση του ρεύματος της οποίας, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η ευαισθησία είναι υψηλότερη σε σχέση με εκείνη της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού, στην οποία δε χρησιμοποιείται το αντίστροφο ρεύμα.

Το κύριο πλεονέκτημα της βολταμμετρίας τετραγωνικού κύματος είναι η ταχύτητά της. Η ταχύτητα σάρωσης δίνεται από το γινόμενο της συχνότητας με το ύψος του βήματος της κλιμακωτής μεταβολής του δυναμικού. Συχνότητες ενός έως εκατό κύκλων ανά δευτερόλεπτο επιτρέπουν τη χρήση πολύ γρήγορων ταχυτήτων σάρωσης. Ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται σημαντικά, αφού ολόκληρο το βολταμμογράφημα μπορεί να καταγραφεί μέσα σε λίγα μόνο δευτερόλεπτα, ενώ στη διαφορική παλμική βολταμμετρία χρειάζονται δύο με τρία λεπτά^[10].



Σχήμα 6. Διαγράμματα μεταβολής του δυναμικού σε σχέση με το χρόνο σε: Α) βολταμμετρία κανονικού παλμού, Β) βολταμμετρία διαφορικού παλμού και Γ) βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος^[33].

2.9.3 Αναδιαλυτική βολταμμετρία

Η τεχνική της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας (*stripping voltammetry*) περιλαμβάνει δύο στάδια: το στάδιο της απόθεσης ή προσυγκέντρωσης και το στάδιο της αναδιάλυσης ή βολταμμετρικής σάρωσης. Στο πρώτο στάδιο προσυγκεντρώνεται η προς μελέτη ένωση από το διάλυμα του δείγματος επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με ηλεκτρόλυση ή με προσρόφηση. Στο δεύτερο στάδιο επιτελείται η ηλεκτροχημική μέτρηση της ένωσης, που έχει προσυγκεντρωθεί στο ηλεκτρόδιο εργασίας με την ταυτόχρονη αναδιάλυσή της.

Η τεχνική της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας αναπτύχθηκε λόγω της ανάγκης ηλεκτροχημικού προσδιορισμού ουσιών με περιβαλλοντικό, κλινικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον σε ιχνοποσότητες. Είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για ανίχνευση ιχνών μετάλλων. Η αξιοσημείωτη ευαισθησία της οφείλεται στο συνδυασμό του αποτελεσματικού σταδίου της προσυγκέντρωσης και της χρήσης προηγμένων διαδικασιών μέτρησης. Τα μέταλλα προσυγκεντρώνονται πάνω στο ηλεκτρόδιο και τα όρια ανίχνευσης μειώνονται δύο έως και τρεις τάξεις μεγέθους σε σχέση με τις μετρήσεις χωρίς προσυγκέντρωση. Ανάλογα με τη φύση της προσυγκέντρωσης και

τις τεχνικές της αναδιάλυσης, αναπτύχθηκαν οι ακόλουθοι τύποι αναδιαλυτικής βολταμμετρίας^[31]:

2.9.3.1 Ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία – *Anodic Stripping Voltammetry (ASV)*

Η τεχνική της *ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας* είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική αναδιάλυσης. Σε αυτήν ο αναλύτης προσυγκεντρώνεται με αναγωγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (ηλεκτρόλυση) και στο δεύτερο στάδιο της αναδιάλυσης, το δυναμικό σαρώνεται ανοδικά, δηλαδή προς θετικότερες τιμές και ο αναλύτης αναδιαλύεται με οξείδωση, δηλαδή απομακρύνεται από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επιστρέφει στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Ο συγκεκριμένος τύπος αναδιαλυτικής βολταμμετρίας, εφαρμόζεται συνήθως στην ανάλυση μετάλλων^[31].

2.9.3.2 Καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία – *Cathodic Stripping Voltammetry (CSV)*

Η τεχνική της *καθοδικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας* είναι ακριβώς η κατοπτρική εικόνα της ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας. Ο αναλύτης προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με οξείδωση και ακολουθεί η αναδιάλυσή του με αναγωγή, δηλαδή καθοδική σάρωση του δυναμικού. Ο συγκεκριμένος τύπος αναδιαλυτικής βολταμμετρίας, χρησιμοποιείται για την ανάλυση οργανικών και ανόργανων ενώσεων, οι οποίες είναι ικανές να σχηματίσουν δυσδιάλυτα άλατα με το ηλεκτροδιακό υλικό^[31].

2.9.3.3 Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία – *Adsorptive Stripping Voltammetry (AdSV)*

Η τεχνική της *προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας* αναπτύχθηκε ως αποτέλεσμα της εκμετάλλευσης της αυθόρμητης τάσης των αντιδρώντων να προσροφώνται, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία των βολταμμετρικών προσδιορισμών. Η διαφορά της προσροφητικής βολταμμετρίας από την ανοδική και τη καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία έγκειται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης. Το σύμπλοκο μετάλλου – συμπλεκτικού (ligand) προσυγκεντρώνεται στη διφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου – διαλύματος. Η προσυγκέντρωση βασίζεται στη διφασική συσσώρευση και δεν περιλαμβάνει καμία φαρανταϊκή δράση.

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

Η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας είναι μια διαδικασία αντικατάστασης, κατά την οποία τα μόρια του διαλύτη αντικαθίστανται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από μόρια ή ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες δυνάμεις που οδηγούν σε προσρόφηση, όπως η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος και του φορτισμένου ηλεκτροδίου, οι δυνάμεις διπόλου – πεδίου, η δράση μεταξύ της ηλεκτροδιακής διπλοστιβάδας και των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών αντιδρώντων ουσιών, καθώς και η χημειορόφηση συγκεκριμένων ομάδων στις επιφάνειες μεταλλικών ηλεκτροδίων^[34].

Διακρίνονται, επομένως, δύο κύριοι τύποι προσρόφησης: η *μη ειδική προσρόφηση* και η *ειδική προσρόφηση*. Στη μη ειδική προσρόφηση η κύρια δύναμη που οδηγεί στην προσρόφηση είναι η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος ή του διπόλου και του φορτισμένου ηλεκτροδίου. Στην ειδική προσρόφηση κυριαρχούν οι δυνάμεις van der Waals και οι χημικοί δεσμοί^[11]. Συγκεκριμένα η ειδική προσρόφηση της αναλυόμενης ένωσης, πραγματοποιείται είτε με τη συμπλοκοποίησή της με κάποιο αντιδραστήριο (αντιδραστήριο που συγκρατείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με δυνάμεις van der Waals ή με χημικό δεσμό) είτε με την απευθείας προσρόφηση της ένωσης επάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Συνήθως, τα μεταλλικά ιόντα προσροφώνται με τη βοήθεια τασενεργού αντιδραστηρίου, ενώ οι οργανικές ενώσεις προσροφώνται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας^[31]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα κατιόντα συμπλοκοποιούνται με υδρόφοβα οργανικά συμπλεκτικά αντιδραστήρια που προστίθενται στο διάλυμα, όπως είναι η διμεθυλογλυοξίμη, η 8-υδροξυκινολίνη και η κατεχόλη^[35,36].

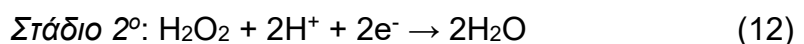
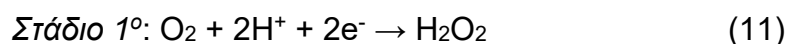
Τα πλεονεκτήματα της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας, που την καθιστούν κατάλληλη μέθοδο για ανάλυση ουσιών σε ιχνοποσότητες, είναι τα κάτωθι:

- ✓ Μεγάλη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης,
- ✓ Πολυστοιχειακή ανάλυση (ταυτόχρονη ανάλυση τεσσάρων έως έξι ουσιών),
- ✓ Φθηνός εξοπλισμός,
- ✓ Ταχύτητα,

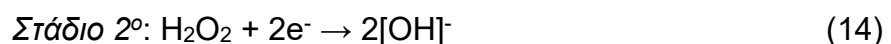
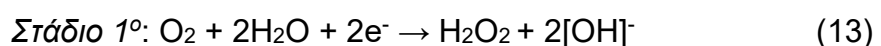
- ✓ Ικανότητα ανάλυσης φυσικοχημικών μορφών ή μορφοειδικός προσδιορισμός στοιχείων (προσδιορισμός της ακριβούς φυσικοχημικής μορφής των χημικών στοιχείων και του βαθμού οξειδωσής τους).

Οι σημαντικότεροι παράγοντες, που επηρεάζουν την αναδιαλυτική βολταμμετρία είναι οι παρακάτω:

- ✓ **Φέρων ηλεκτρολύτης.** Η σύνθεση του *φέρωντος ηλεκτρολύτη* μπορεί να επηρεάσει την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία της μέτρησης. Ο ιδανικός ηλεκτρολύτης πρέπει να δίνει ευδιάκριτες και καλοσχηματισμένες κορυφές για όλες τις ουσίες που αναλύονται, ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα. Συνήθως, η συγκέντρωση του *φέρωντος ηλεκτρολύτη* είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτροενεργών σωματιδίων, ενώ θα πρέπει να μην είναι ηλεκτροχημικά ενεργός στην περιοχή δυναμικού που θα ληφθεί το βολταμμογράφημα και να μην αντιδρά με τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Ως φέρων ηλεκτρολύτης συνήθως επιλέγεται κάποιος ανόργανος ηλεκτρολύτης (άλας, οξύ ή βάση). Όταν ο έλεγχος του pH είναι απαραίτητος για να μην επηρεαστεί η μέτρηση του ρεύματος, άρα και το βολταμμογράφημα, χρησιμοποιούνται ως φέροντες ηλεκτρολύτες ρυθμιστικά διαλύματα^[31].
- ✓ **Οξυγόνο.** Το οξυγόνο της ατμόσφαιρας είναι ικανό να διαλύεται σε υδατικά διαλύματα, σχηματίζοντας συγκεντρώσεις μέχρι και 10^{-3} mol/L σε πίεση και θερμοκρασία δωματίου. Ανάλογα με το pH, το οξυγόνο μπορεί να αναχθεί σε δύο στάδια. Σε όξινο περιβάλλον ανάγεται ως εξής:



Σε βασικό ή ουδέτερο περιβάλλον ανάγεται ως εξής:



Τα στάδια αναγωγής οδηγούν σε αυξημένο βασικό ρεύμα, το οποίο επικαλύπτει τις κορυφές της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας που μας ενδιαφέρουν. Επιπλέον, το οξυγόνο ή το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να οξειδώσει τις υπό ανάλυση ουσίες, ενώ τα ιόντα

υδροξυλίου που σχηματίζονται κατά την αναγωγή του οξυγόνου σε ουδέτερο ή βασικό περιβάλλον μπορούν να αντιδράσουν με το προσδιοριζόμενο συστατικό^[31].

Γι' αυτούς τους λόγους, το οξυγόνο πρέπει να απομακρύνεται από το διάλυμα του δείγματος πριν το στάδιο της απόθεσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνότερα, για την απομάκρυνση του οξυγόνου από ένα διάλυμα, είναι η διοχέτευση μέσα από το διάλυμα ηλεκτρικά ανενεργού αερίου (άζωτο, αργό κ.ά.). Ο απαιτούμενος χρόνος αποξυγόνωσης εξαρτάται από τον όγκο του διαλύματος, το ρυθμό ροής και το μέγεθος των φυσαλίδων που εισέρχονται στο διάλυμα. Ενδεικτικά, για την αποξυγόνωση 50 mL διαλύματος απαιτούνται 5-8 λεπτά. Μετά την αποξυγόνωση ο σωλήνας παροχής αζώτου ή αργού ανυψώνεται πάνω από την επιφάνεια του διαλύματος για να διατηρηθεί ο χώρος αυτός αποξυγονωμένος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης^[28].

- ✓ **Δυναμικό και χρόνος προσυγκέντρωσης.** Το στάδιο της απόθεσης λαμβάνει χώρα με ελεγχόμενο δυναμικό για συγκεκριμένο χρόνο υπό επαναλήψιμες υδροδυναμικές συνθήκες μεταφοράς μάζας στο διάλυμα. Το δυναμικό απόθεσης εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας κατά τη φάση της προσυγκέντρωσης, για να ενισχύσει την απόθεση του συστατικού που προσδιορίζεται, στην επιφάνειά του. Στις περιπτώσεις προσροφητικής απόθεσης ή προσυγκέντρωσης, το κατάλληλο δυναμικό βρίσκεται πειραματικά, ανάλογα με το πότε μεγιστοποιείται η απόθεση. Με κατάλληλη επιλογή του δυναμικού απόθεσης, εκτός από την ευαισθησία, είναι δυνατό να βελτιωθεί και η εκλεκτικότητα στη μέτρηση. Ο χρόνος προσυγκέντρωσης πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά. Δεδομένου ότι το ποσοστό του προσδιοριζόμενου συστατικού που προσυγκεντρώνεται είναι ανάλογο του χρόνου προσυγκέντρωσης, η ένταση του ρεύματος της κορυφής συνδέεται γραμμικά με το χρόνο προσυγκέντρωσης. Σε πολλές περιπτώσεις, μεγάλοι χρόνοι απόθεσης μπορεί να προκαλέσουν παρεμποδίσεις λόγω κορεσμού της επιφάνειας του ηλεκτροδίου^[31,28].
- ✓ **Μεταφορά μάζας.** Το στάδιο της προσυγκέντρωσης στην αναδιαλυτική βολταμετρία συνοδεύεται από μηχανική μεταφορά του προσδιοριζόμενου συστατικού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η μηχανική μεταφορά επιτυγχάνεται είτε με ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα ή με περιστροφή του

ίδιου του ηλεκτροδίου με τη βοήθεια κινητήρα είτε ακόμη, με τη ροή του διαλύματος σε συστήματα μέτρησης υπό ροή. Η ολική ευαισθησία και η ακρίβεια εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την επίδραση των συνθηκών που καθορίζουν την ποσότητα της ουσίας που θα αποτεθεί. Συνθήκες έντονης μηχανικής μεταφοράς μάζας αυξάνουν την ποσότητα της ουσίας που αποτίθεται και βελτιώνουν την ευαισθησία^[31].

- ✓ **Φάση εξισορρόπησης.** Το στάδιο αυτό διαρκεί λίγα μόνο δευτερόλεπτα σε στατικό διάλυμα και μεσολαβεί μεταξύ του σταδίου προσυγκέντρωσης και της σάρωσης του δυναμικού. Στο διάστημα αυτό επιτυγχάνεται ομοιόμορφη κατανομή του συστατικού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και ηρεμία του διαλύματος, ώστε να αποφευχθεί ο θόρυβος κατά τη σάρωση του δυναμικού ^[31].

2.10 Οργανολογία

Στις ηλεκτροχημικές αναλυτικές τεχνικές υπάρχουν τουλάχιστον δύο ηλεκτρόδια και ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα, τα οποία τοποθετούνται σε μια ηλεκτροχημική κυψελίδα. Το ένα ηλεκτρόδιο αποκρίνεται στον αναλύτη και αποκαλείται **ηλεκτρόδιο εργασίας** (*working electrode*). Το δεύτερο ηλεκτρόδιο έχει σταθερό δυναμικό, ανεξάρτητα από τις ιδιότητες του διαλύματος και ονομάζεται **ηλεκτρόδιο αναφοράς** (*reference electrode*). Ως προς το δυναμικό αυτού του ηλεκτροδίου μετριέται το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας. Χρησιμοποιείται συχνά και ένα τρίτο ηλεκτρόδιο, που ονομάζεται **βοηθητικό ηλεκτρόδιο** (*counter electrode*), το οποίο εξασφαλίζει τη ροή του ρεύματος μεταξύ αυτού του ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου εργασίας. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ένας σωλήνας παροχής ηλεκτρικά ανενεργού αερίου (όπως αργού ή αζώτου) για την απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου από το διάλυμα, το οποίο είναι ηλεκτροενεργό. Η οργανολογία των ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών, εκτός της κυψελίδας, των ηλεκτροδίων και του ηλεκτρολύτη, περιλαμβάνει έναν *ποτενσιοστάτη* για την παροχή του δυναμικού και έναν *ηλεκτρονικό υπολογιστή* με το κατάλληλο λογισμικό για την καταγραφή των αποτελεσμάτων^[10,11] (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Τυπικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελούμενο από μία ηλεκτροχημική κυψελίδα, που περιέχει το ηλεκτρολυτικό διάλυμα, στο οποίο εμβαπτίζονται τα τρία ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια αυτά συνδέονται με έναν ποτενσιοστάτη, ο οποίος με τη σειρά του είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή^[37].

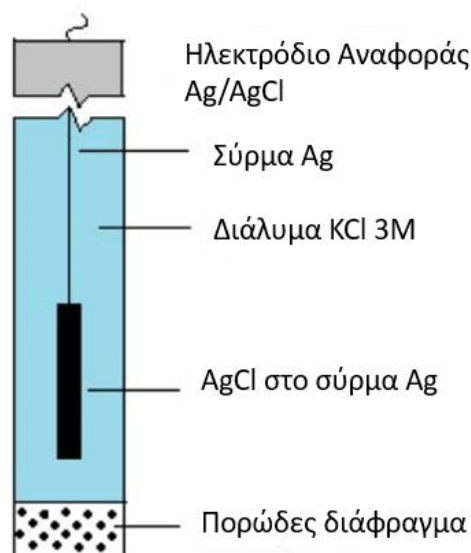
2.10.1 Ηλεκτρόδιο εργασίας

Το ηλεκτρόδιο εργασίας (WE) αντιπροσωπεύει το σημαντικότερο στοιχείο μιας ηλεκτροχημικής κυψελίδας. Στη διεπιφάνεια μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του διαλύματος συμβαίνει η μεταφορά ηλεκτρονίων. Για την επιλογή του υλικού για το ηλεκτρόδιο εργασίας πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετοί σημαντικοί παράγοντες. Αρχικά, το υλικό θα πρέπει να παρουσιάζει *ευνοϊκή οξειδοαναγωγική συμπεριφορά* ως προς την αναλυτέα ουσία, και το *παράθυρο δυναμικού* όπου δρα το ηλεκτρόδιο σε συγκεκριμένο φέροντα ηλεκτρολύτη να είναι όσο το δυνατόν ευρύτερο, ώστε να επιτρέπεται ικανοποιητικός ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός της αναλυτέας ουσίας. Πρόσθετα χαρακτηριστικά αποτελούν το χαμηλό κόστος του υλικού, η ικανότητα επεξεργασίας του και διαμόρφωσής του σε κατάλληλες γεωμετρίες, η ευκολία ανανέωσης της επιφάνειας μετά από μια μέτρηση, και η μη τοξικότητα του^[38]. Τα συνηθέστερα υλικά που χρησιμοποιούνται για τα ηλεκτρόδια εργασίας, περιγράφονται εκτενέστερα στο 3^ο κεφάλαιο.

2.10.2 Ηλεκτρόδιο αναφοράς

Το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode, RE) είναι ένα ημιστοιχείο, που το δυναμικό του είναι σταθερό και επαναλήψιμο και ανεξάρτητο από τη σύσταση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος^[24]. Ακόμη, το ηλεκτρόδιο αναφοράς θα πρέπει να διαθέτει μικρό θερμικό συντελεστή δυναμικού, δηλαδή το δυναμικό του να παραμένει αμετάβλητο, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία των διαλυμάτων εργασίας. Τέλος, είναι απαραίτητο η κατασκευή του να είναι εύκολη από υλικά χαμηλού κόστους, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αναπαραγωγιμότητα του δυναμικού του^[28].

Διεθνώς αποδεκτό ηλεκτρόδιο πρώτου είδους που χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο αναφοράς, είναι το *πρότυπο ηλεκτρόδιο υδρογόνου*^[39]. Όμως, η δυσκολία παρασκευής του, το καθιστούν δύσχρηστο και πολύ σπάνια χρησιμοποιείται^[12]. Για αυτό, χρησιμοποιούνται το *κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος* (*saturated calomel electrode, SCE*), που κατασκευάζεται εύκολα και παρουσιάζει σταθερότητα του δυναμικού, και το *ηλεκτρόδιο αναφοράς του αργύρου – χλωριούχου αργύρου* (*silver - silver chloride electrode*), που αποτελείται από ένα σύρμα αργύρου, ηλεκτρολυτικά επικαλυμμένο με χλωριούχο άργυρο, το οποίο βρίσκεται βυθισμένο σε κορεσμένο διάλυμα KCl^[26] (Σχήμα 8).



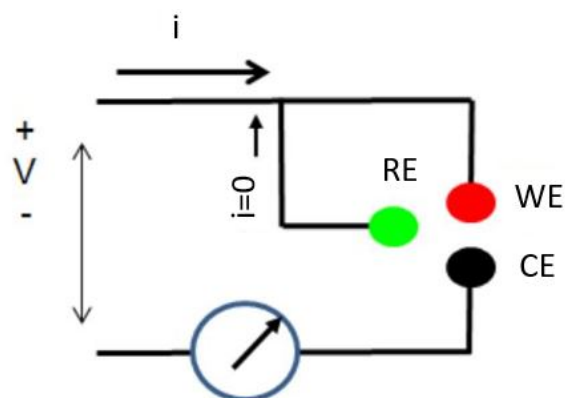
Σχήμα 8. Ηλεκτρόδιο αναφοράς $Ag/AgCl$, KCl (s)^[40].

2.10.3 Βοηθητικό ηλεκτρόδιο

Στην περίπτωση χρήσης τριών ηλεκτροδίων, εκτός από τα ηλεκτρόδια εργασίας και αναφοράς, εισάγεται και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο, που συνήθως είναι κάποιο αδρανές μέταλλο, όπως ο λευκόχρυσος^[39].

2.10.4 Ποτενσιοστάτης

Ο ποτενσιοστάτης είναι ειδικό όργανο που από τη μία πλευρά μετρά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς (RE) και του ηλεκτροδίου εργασίας (WE), ενώ από την άλλη αποκαθιστά διαρκώς κάθε απόκλιση (μεταβολή) του δυναμικού μέσω της εφαρμογής ενός αντισταθμιστικού δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του βοηθητικού ηλεκτροδίου (CE)^[26,41] (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Διάταξη ποτενσιοστάτη με τρία ηλεκτρόδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Η λέξη *sensor* (αισθητήρας), προέρχεται από τη λατινική λέξη *sentire*, που σημαίνει *αισθάνομαι*. Ένας **αισθητήρας** αποτελεί μία διάταξη, που αποκρίνεται σε μία φυσική ή χημική διέγερση, όπως η *θερμότητα*, το *φως*, ο *ήχος*, η *πίεση*, ο *μαγνητισμός*, ή μία *συγκεκριμένη κίνηση*, και μεταδίδει το αποτέλεσμα, που προκύπτει, με μία μορφή ώσης. Ο αισθητήρας συνεπώς, μπορεί να αναγνωρίσει ένα εσωτερικό σήμα (ή ενέργεια) και να το μετατρέψει σε κατάλληλο εξωτερικό σήμα (ή μια άλλη μορφή ενέργειας).

Οι Clark και Lyons το 1962, ήταν οι πρώτοι που εισήγαγαν την έννοια των *βιοαισθητήρων*. Ειδικότερα, αναφέρθηκαν σε ένα «*ενζυμικό ηλεκτροδίο*», το οποίο αποτελείται από ένα *ακίνητοποιημένο ένζυμο (οξειδάση της γλυκόζης)* στην επιφάνεια ενός *ηλεκτροδίου*. Από τότε, οι βιοαισθητήρες έχουν εξελιχθεί σημαντικά χάρη στην πρόοδο που έχει γίνει στις τεχνολογίες ανίχνευσης και μετασχηματισμού σήματος και κατασκευής ηλεκτροδίων.

Η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, κατά κύριο λόγο, υπαγορεύτηκε από τις ανάγκες της *ιατρικής διάγνωσης* και την *ταχεία ανάλυση* των κλινικών δειγμάτων στο *σημείο φροντίδας του ασθενούς (point-of-care – POC)*. Οι βιοαισθητήρες, ωστόσο, μπορούν να αξιοποιηθούν με επιτυχία και σε άλλους τομείς, όπως η *κτηνιατρική*, ο *έλεγχος των τροφίμων* και η *προστασία του περιβάλλοντος*. Επιπλέον, σήμερα υπάρχει αυξημένη ανάγκη για περισσότερο *εύχρηστες, γρήγορες* και σχετικά *οικονομικές διατάξεις*, που διευκολύνουν την ανάλυση δειγμάτων *στο πεδίο (on-site)*, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του αριθμού δειγμάτων που αποστέλλονται για περαιτέρω ανάλυση στο εργαστήριο^[42].

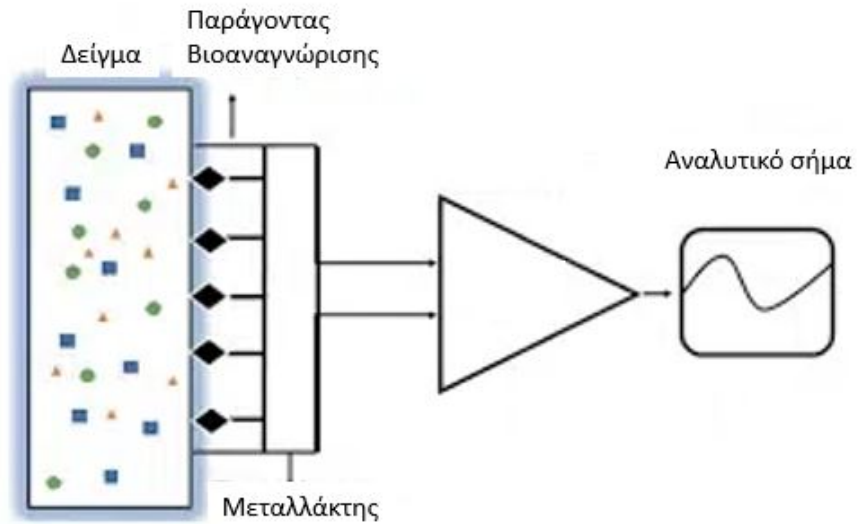
3.2 Βιοαισθητήρες

3.2.1 Ορισμός

Βιοαισθητήρας (*biosensor*) είναι μια διάταξη που χρησιμοποιεί *εκλεκτικές χημικές αντιδράσεις* που βασίζονται στην χρήση *ενζύμων, αντισωμάτων, ιστών ή κυττάρων* για να ανιχνεύσουν *χημικές ουσίες*, συνήθως μέσω *ηλεκτρικών, θερμικών ή οπτικών διεργασιών* (IUPAC, 1992). Επίσης, ως βιοαισθητήρας ορίζεται μια διάταξη που είναι ικανή να παρέχει *εκλεκτικές ποιοτικές ή ημι-ποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες* χρησιμοποιώντας ένα *βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης* (IUPAC, 2001). Στους βιοαισθητήρες ως στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης (*βιοστοιχείο*) χρησιμοποιείται ένα *ένζυμο (ενζυμικοί βιοαισθητήρες)* ή βιολογικοί υποδοχείς όπως *αντισώματα, κύτταρα, ιστοί (βιοαισθητήρες συγγένειας)*. Το βιοστοιχείο των περισσότερων βιοαισθητήρων είναι ακινητοποιημένο πάνω σε μεμβράνη ή μέσα σε γέλη έτσι, ώστε το βιοστοιχείο να παραμένει σε στενή επαφή με το μεταλλάκτη. Το παραγόμενο αναλυτικό σήμα είναι αποτέλεσμα *βιοαναγνώρισης*, δηλαδή εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιολογικού παράγοντα *ανίχνευσης (παράγοντας βιοαναγνώρισης)*, που είναι ενσωματωμένος ή συναρμολογημένος σε έναν *φυσικοχημικό μεταλλάκτη*, με την προσδιοριζόμενη ουσία (Σχήμα 10)^[43].

Συνεπώς, η λειτουργία ενός βιοαισθητήρα περιλαμβάνει δύο στάδια:

- ✓ Την αλληλεπίδραση της, προς *ανίχνευση* ή προς *ποσοτικό προσδιορισμό*, ουσίας, με τον παράγοντα βιοαναγνώρισης. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή μίας ή περισσότερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων (π.χ. pH, μεταφορά ηλεκτρονίων ή θερμότητας, απορροφητικότητα ή φθορισμός, κλπ.) στο σύστημα, και
- ✓ Τη μετατροπή των φυσικοχημικών μεταβολών σε αναλυτικό σήμα με τη βοήθεια του μεταλλάκτη^[44-46].

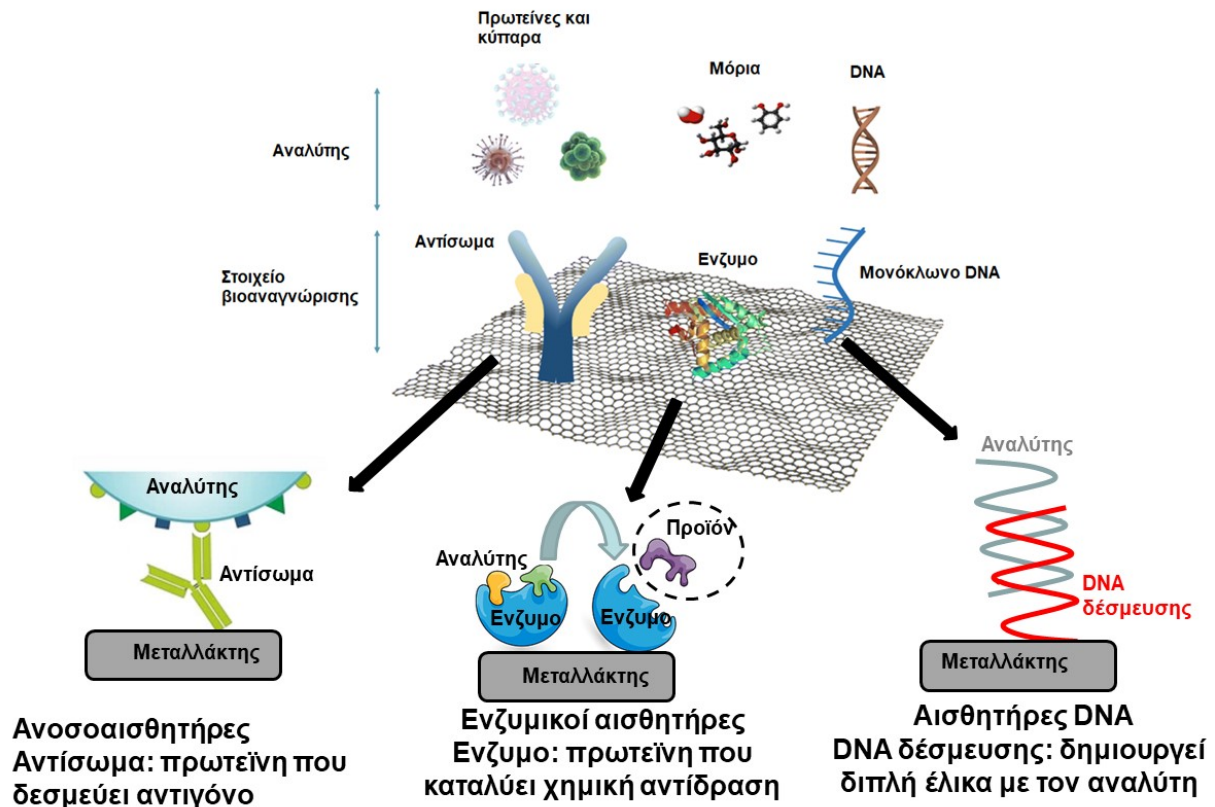


Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα^[47].

3.2.2 Ταξινόμηση

Βάσει του είδους του παράγοντα βιοαναγνώρισης, οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται σε:

- ✓ Βιοαισθητήρες ενζύμων,
- ✓ Ανοσοχημικούς βιοαισθητήρες η ανοσοαισθητήρες,
- ✓ Βιοαισθητήρες DNA (κυττάρων, ιστών ή μικροοργανισμών) (Σχήμα 11)
[43].



Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων τύπων βιοαισθητήρων.

Οι **βιοαισθητήρες ενζύμων**, στους οποίους ειδικεύεται η παρούσα διατριβή, φέρουν, ως παράγοντα βιοαναγνώρισης, ένα *ένζυμο* ακινητοποιημένο σε κάποιο φορέα *ακινητοποίησης*. Κύριο πλεονέκτημα αυτών των βιοαισθητήρων, αποτελεί η *μεγάλη εκλεκτικότητα* ή *εξειδίκευση* που επιτυγχάνεται, καθώς και ο *μικρός χρόνος απόκρισης*. Μειονέκτημα αποτελεί το *κόστος* ορισμένων από αυτά τα ένζυμα, καθώς και η *σχετική αστάθειά* τους^[43].

Τέλος, οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται ακόμη ανάλογα με το **μεταλλάκτη σήματος**. Οι φυσικοχημικές μεταβολές, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην διάρκεια αλληλεπίδρασης μεταξύ του παράγοντα βιοαναγνώρισης του βιοαισθητήρα και του αναλύτη, πρέπει να μετατραπούν σε σήμα, το οποίο στη συνέχεια θα υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να ληφθεί η αναλυτική πληροφορία. Η επιλογή του μεταλλάκτη εξαρτάται από το αποτέλεσμα της βιοαναγνώρισης και το είδος των αλλαγών που επιφέρει στο σύστημα. Στη διάρκεια της αντίδρασης, είναι δυνατόν, να μεταβάλλονται ταυτόχρονα διαφορετικές παράμετροι, παρέχοντας κατά συνέπεια τη δυνατότητα επιλογής/χρήσης διαφόρων μεταλλακτών σήματος^[48]. Οι συνηθέστεροι βιοαισθητήρες ανάλογα με το μεταλλάκτη είναι οι εξής:

- ✓ Ηλεκτροχημικοί,
- ✓ Ακουστικοί ή πιεζοηλεκτρικοί,
- ✓ Αγωγιμομετρικοί θερμικοί ή θερμοδομετρικοί, και
- ✓ Οπτικοί^[44-46].

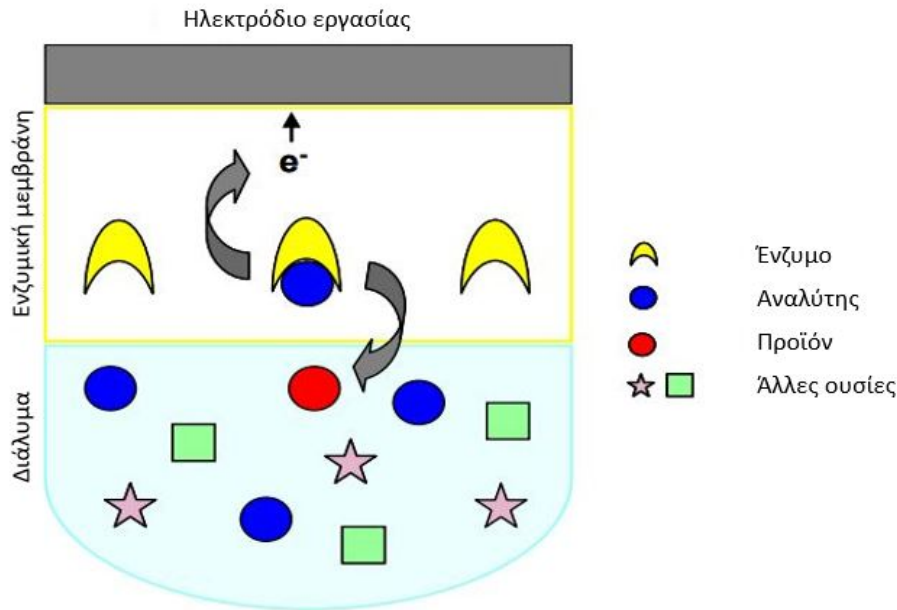
3.3 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες συνδυάζουν την *ευαισθησία* των μεθόδων *ηλεκτροανάλυσης* με την *έμφυτη βιοεκλεκτικότητα* του *βιολογικού συστατικού*. Ορισμένες συσκευές ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων έχουν φτάσει σε εμπορικό στάδιο και χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση, σε *κλινικές, περιβαλλοντικές, βιομηχανικές και αγροτικές εφαρμογές*^[49]. Ένα από τα βασικά αντικείμενα μελέτης της παρούσας διατριβής αποτελούν οι *αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες* και συνεπώς, η θεωρία που διέπει τη λειτουργία τους εξετάζεται εκτενέστερα στην επόμενη παράγραφο.

3.3.1 Αμπερομετρικοί ενζυμικοί βιοαισθητήρες

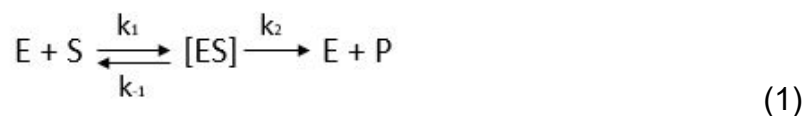
Οι **αμπερομετρικοί ενζυμικοί βιοαισθητήρες** βασίζονται στην ανίχνευση με αμπερομετρία των ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών, που παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διαδικασία της βιοαναγνώρισης του αναλύτη από το ένζυμο. Στο Σχήμα 12 φαίνεται η αρχή λειτουργίας ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα. Τα αντιδρώντα, ένα εκ των οποίων, είναι συνήθως η προς ανάλυση ουσία (αναλύτης) διαχέονται προς το υπόστρωμα ενζύμου, όπου καταλύεται η μετατροπή τους σε προϊόντα από τα ακινητοποιημένα ένζυμα. Η επίτευξη της μέτρησης απαιτεί ένα τουλάχιστον από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα να είναι ηλεκτροχημικά ενεργό. Από την οξειδωση ή την αναγωγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου προκύπτει το μετρούμενο σήμα (ένταση ρεύματος). Αν η ηλεκτροενεργός ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης, τότε κατά την προσθήκη του δείγματος καταγράφεται αύξηση στο ρεύμα ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Όπως παρατηρούμε στο Σχήμα 12, η ενζυμική αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μια μεμβράνη που εκτείνεται σε μια στενή περιοχή στη διεπιφάνεια με τον κύριο όγκο του διαλύματος. Τα μόρια του αναλύτη φτάνουν στην επιφάνεια της ενζυμικής μεμβράνης μέσω διάχυσης και

ανάμιξης και στη συνέχεια, διαχέονται στο εσωτερικό της ενζυμικής μεμβράνης, οπότε και λαμβάνει χώρα η αντίδραση^[50].



Σχήμα 12. Αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα.

Η κινητική της ενζυμικής αντίδρασης, ακολουθεί κατά κανόνα το μοντέλο *Michaelis-Menten*, το οποίο περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση. Το ένζυμο E αντιδρά με το υπόστρωμα S , προς σχηματισμό του συμπλόκου ES . Αυτό στη συνέχεια, είτε διασπάζεται προς E και S , είτε οδηγείται προς σχηματισμό του προϊόντος P .



Η σταθερά *Michaelis* ορίζεται ως εξής:

$$K_M = [k_2 + k_{-1}]/k_1 \quad (2)$$

Η μέγιστη ταχύτητα κατάλυσης (V_{max}) επιτυγχάνεται όταν τα ενεργά κέντρα του ενζύμου έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα. Τότε, η ταχύτητα κατάλυσης δίνεται από τη σχέση:

$$V = V_{max} \cdot C/[C + K_M] \quad (3)$$

Η ακινητοποίηση των ενζύμων στους βιοαισθητήρες επιφέρει αλλαγές στην καταλυτική τους δράση με άμεση επίδραση και στην τιμή της K_M . Για το λόγο αυτό, στα ηλεκτρόδια χρησιμοποιείται η φαινομενική K_M (K_M^{app}).

Η ταχύτητα κατάλυσης είναι ανάλογη του ρεύματος που καταγράφεται όποτε ισχύει τελικά η σχέση:

$$i = i_{max} \cdot C / [C + K_M^{app}] \quad (4)$$

όπου i_{max} είναι το μέγιστο ρεύμα. Από τη σχέση αυτή είναι προφανές ότι η τιμή της K_M^{app} καθορίζει το γραμμικό εύρος της απόκρισης του αισθητήρα. Για συγκεντρώσεις υποστρώματος $[C] \ll K_M^{app}$, η παραπάνω σχέση απλοποιείται ως εξής:

$$i = i_{max} \cdot C / K_M^{app} \quad (5)$$

Άρα για τις συγκεντρώσεις αυτές, η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι γραμμική και ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα^[51].

3.3.2 Κατασκευή ενζυμικών βιοαισθητήρων

Τα ένζυμα είναι ευαίσθητα στις *υψηλές θερμοκρασίες*, σε *ισχυρά όξινο ή αλκαλικό pH*, στη *μηχανική καταπόνηση*, στην *επίδραση μικροβίων*, καθώς και στους *οργανικούς διαλύτες*. Τα μειονεκτήματα αυτά μπορούν να περιοριστούν σημαντικά με την ακινητοποίηση των ενζύμων σε κάποιον κατάλληλο φορέα^[52]. Η συγκράτηση του ενζύμου πάνω στο ηλεκτρόδιο συχνά επιτυγχάνεται με μεμβράνες περατές από τον αναλύτη. Η μέθοδος ακινητοποίησης θα πρέπει να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή *ενεργότητα ενζύμου*, τη *δυνατότητα πρόσβασης του αναλύτη στα ενεργά κέντρα* καθώς και την *ταχεία μεταφορά μάζας υποστρωμάτων-προϊόντων* προς και διαμέσου του *στρώματος ακινητοποίησης*^[53]. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων, όπως^[42]:

{1} **Προσρόφηση**: Στη συγκεκριμένη τεχνική, το ένζυμο ακινητοποιείται συνήθως απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Υλικά από *άνθρακα* χρησιμοποιούνται συνήθως. Η προσρόφηση γίνεται συνήθως φυσικά (*φυσιορρόφηση*) μέσω ασθενών δυνάμεων, όπως *Van der Waals δεσμών*. Το μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η ασθενής δέσμευση, ενώ παράλληλα το ένζυμο είναι εκτεθειμένο σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας ή ιονικής ισχύος.

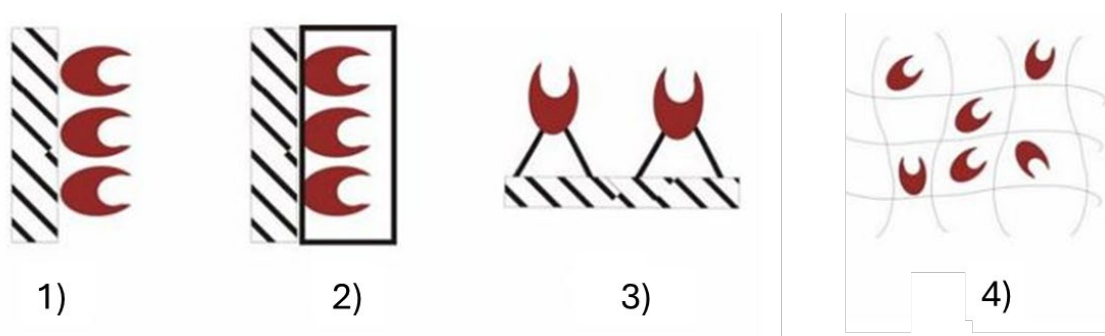
{2} **Παγίδευση**: Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το ένζυμο τοποθετείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και παγιδεύεται εκεί με τη βοήθεια μιας *πολυμερικής μεμβράνης* (όπως *οξική κυτταρίνη*, *κολλαγόνο*, *Nafion*) διαπερατής στον αναλύτη. Η μέθοδος έχει

το πλεονέκτημα του περιορισμού της επιμόλυνσης των ενζύμων από τα άλλα συστατικά του δείγματος.

{3} **Ομοιοπολική δέσμευση:** Σε αυτή τη μέθοδο, τα ένζυμα προσδένονται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με *ομοιοπολικούς δεσμούς*, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των δραστικών ομάδων της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και των δραστικών ομάδων των ενζύμων.

{4} **Εγκλωβισμός:** Κατά τη διαδικασία αυτή, τα ένζυμα αναμιγνύονται με *διαλύματα μονομερών*, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται υπό κατάλληλες συνθήκες και εγκλωβίζουν το ένζυμο. Οι *πολυμερικές μεμβράνες*, που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν το *πολυακρυλονιτρίλιο*, την *πολυβινυλική αλκοόλη*, αλλά και *πηκτές (sol-gel)*. Μέσα στο πολυμερές είναι δυνατό να εγκλωβιστούν και άλλα συστατικά που βελτιώνουν την απόδοση και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα, όπως *διαμεσολαβητές, σταθεροποιητές του ενζύμου* κλπ.

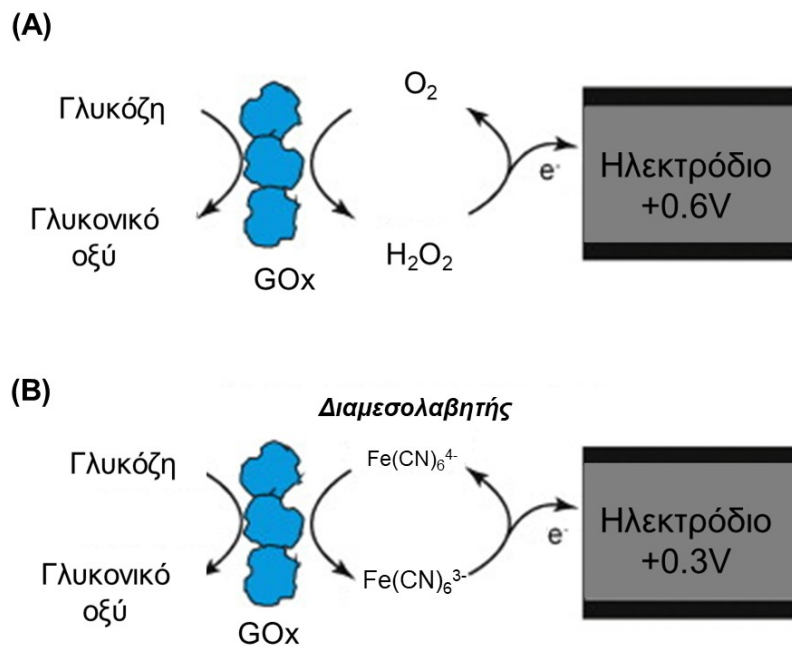
Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων ακινητοποίησης ενζύμων παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 13. Μέθοδοι ακινητοποίησης των ενζύμων στους βιοαισθητήρες: 1) Προσρόφηση, 2) Παγίδευση, 3) Ομοιοπολική δέσμευση, 4) Εγκλωβισμός^[42].

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμικών αμπερομετρικών βιοαισθητήρων εξαρτώνται από την αντίδραση μεταφοράς των ηλεκτρονίων από την ενζυμική αντίδραση στο ηλεκτρόδιο^[54]. Σε πολλές περιπτώσεις, η διαδρομή των ηλεκτρονίων από το ένζυμο στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα είναι αρκετά μεγάλη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πολύ μικρή πιθανότητα ανταλλαγής φορτίου μεταξύ του ενζύμου και του ηλεκτροδίου. Έτσι, η μεταφορά ηλεκτρονίων γίνεται μέσω κάποιων διαμεσολαβητών (mediators) που διευκολύνουν τη μεταφορά φορτίου. Υπάρχουν οι ακόλουθοι τρεις τύποι ή γενιές αμπερομετρικών βιοαισθητήρων:

- **Βιοαισθητήρες 1^{ης} γενιάς** ή **Βιοαισθητήρες χωρίς διαμεσολαβητή** (Σχήμα 14^A): Η συγκεκριμένη ομάδα βασίζεται στη μέτρηση της συγκέντρωσης των αντιδρώντων (π.χ. οξυγόνο) ή των προϊόντων (π.χ. υπεροξειδίου του υδρογόνου) της ενζυμικής αντίδρασης. Ένζυμα, όπως οι διάφορες οξειδάσες κατά τη διάρκεια της βιοκαταλυτικής αντίδρασης καταναλώνουν οξυγόνο και παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οπότε η αμπερομετρική μέτρηση μπορεί να στηριχθεί είτε στην κατανάλωση του οξυγόνου είτε στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, με εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού.
- **Βιοαισθητήρες 2^{ης} γενιάς** ή **Βιοαισθητήρες με διαμεσολαβητή** (Σχήμα 14^B): Ο 2^{ος} τύπος αμπερομετρικών βιοαισθητήρων χρησιμοποιεί εναλλακτικά οξειδωτικά μέσα – διαμεσολαβητές – ως μεταφορείς ηλεκτρονίων, όπως το $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Ο διαμεσολαβητής μεταφέρει ηλεκτρόνια ανάμεσα στο ένζυμο και στο ηλεκτρόδιο. Οι διαμεσολαβητές δύναται να προστεθούν στο μετρούμενο διάλυμα, είτε να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Όταν χρησιμοποιούνται διαμεσολαβητές εφαρμόζονται χαμηλότερα δυναμικά εξαλείφοντας έτσι σημαντικό μέρος παρεμποδιστών, που οξειδώνονται σε θετικότερα δυναμικά.



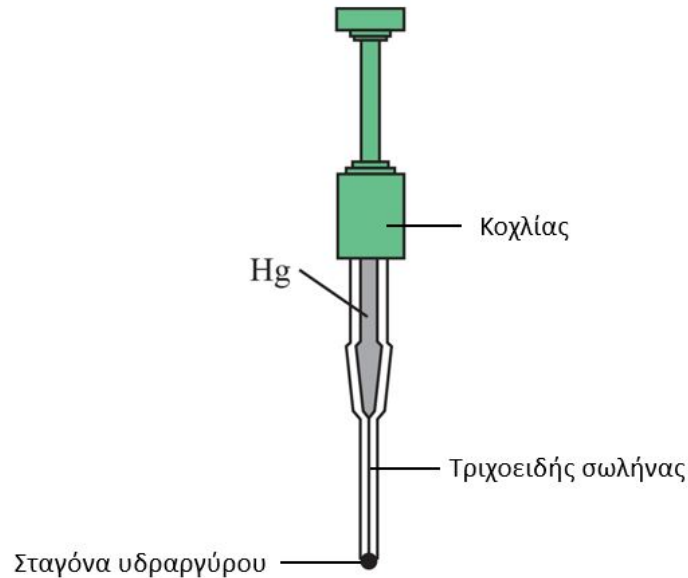
Σχήμα 14. Ενζυμικοί αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες γλυκόζης A) πρώτης, B) δεύτερης γενιάς.

- ο **Βιοαισθητήρες 3^{ης} γενιάς** ή **Βιοαισθητήρες άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων**: Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες 3^{ου} τύπου βασίζονται στην άμεση μεταφορά των ηλεκτρονίων μεταξύ του ενζύμου και της επιφάνειας ανίχνευσης, ξεπερνώντας έτσι την αναγκαιότητα ύπαρξης τόσο διαμεσολαβητή όσο και του O₂. Η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων συμβάλλει στην ανίχνευση του αναλύτη σε δυναμικό λίγο θετικότερο από το δυναμικό οξειδωσης του ενζύμου (π.χ. για το ένζυμο, οξειδάση της γλυκόζης, GOx: ~ -0,50 V ως προς Ag/AgCl).

Το ηλεκτρόδιο εργασίας αποτελεί ζωτικής σημασίας τμήμα του βιοαισθητήρα. Τα συνηθέστερα υλικά που χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρόδια εργασίας είναι ο λευκόχρυσος (πλατίνα), ο χρυσός, ο άνθρακας και ο υδράργυρος.

Τα ηλεκτρόδια μετάλλων χαρακτηρίζονται από εξαιρετικές ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες. Ένα από τα πλεονεκτήματά τους είναι η υψηλή τους αγωγιμότητα που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χαμηλών ρευμάτων υποβάθρου (χωρητικών). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα ηλεκτρόδια μετάλλων εμφανίζουν καταλυτικές ιδιότητες. Άλλο ένα πλεονέκτημα των ηλεκτροδίων αυτών αποτελεί η ευκολία καθαρισμού τους που μπορεί να γίνει είτε ηλεκτροχημικά είτε μηχανικά. Όμως, τα στερεά ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων (Au, Pt) δεν είναι τόσο χημικώς αδρανή όσο αυτά του άνθρακα και απορροφούν υδρογόνο στην επιφάνειά τους. Επίσης, οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις με στερεά ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων υποφέρουν από περιπλοκές που προκαλούνται από το σχηματισμό οξειδωμένων υμενίων. Τα ηλεκτρόδια αυτά εξαιτίας του χαμηλού καθοδικού υπερδυναμικού, του υψηλότερου θορύβου κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και της χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας μεταξύ των κορυφών, δεν μπόρεσαν να θεωρηθούν αντάξια με αυτά του υδραργύρου.

Ο υδράργυρος είναι ιστορικά ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό ηλεκτροδίων, κυρίως με τη μορφή *κρεμαστής σταγόνας (dropping mercury electrode, DME)*, που σχηματίζεται στο τέλος ενός γυάλινου τριχοειδούς σωλήνα, μέσω του οποίου επιτρέπεται η ροή του υγρού μετάλλου^[38]. Με κατάλληλη διάταξη ενός μικρομετρικού κοχλία, βυθίζεται στον υδράργυρο ένα χαλύβδινο έμβολο μικρής διαμέτρου και προκαλεί την έξοδο ίσων όγκων υδραργύρου με τη μορφή σταγόνας διαμέτρου 1 – 1,5 mm. Η σταγόνα του υδραργύρου παραμένει κρεμασμένη στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα, λόγω δυνάμεων συνάφειας με την υπόλοιπη μάζα του υδραργύρου (Σχήμα 15).



Σχήμα 15. Ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου^[55].

Ο Hg εμφανίζει εξαιρετικές ηλεκτροχημικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον για την κατασκευή ηλεκτροδίων. Πιο συγκεκριμένα ο Hg:

- Σχηματίζει αμαγάλματα με αρκετά βαρέα μέταλλα που παρουσιάζουν μεγάλο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον. Ο σχηματισμός αμαγάλματος καθιστά περισσότερο αντιστρεπτή την οξειδοαναγωγική συμπεριφορά των μετάλλων και οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία.
- Προσροφά έντονα οργανικές ενώσεις, γεγονός που διευκολύνει τη χρήση του σε προσροφητική προσυγκέντρωση.
- Παρουσιάζει μεγάλο καθοδικό υπερδυναμικό υδρογόνου και συνεπώς επιτρέπει μια ευρεία περιοχή λειτουργίας σε καθοδικά δυναμικά.
- Είναι διαθέσιμος με μεγάλη καθαρότητα.

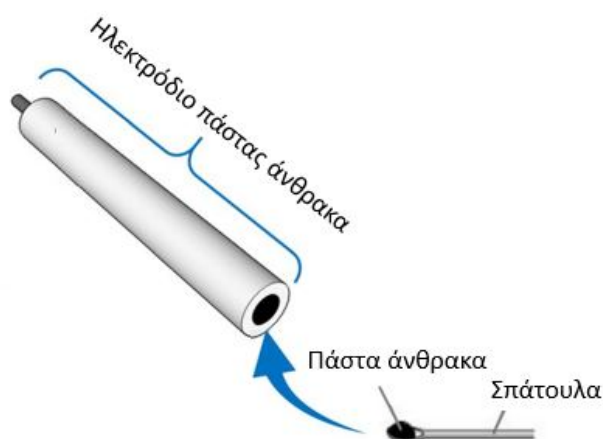
Βασικό μειονέκτημα του υδραργύρου αποτελεί η τοξικότητά του^[30].

Ο άνθρακας αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή υλικά στην κατασκευή αισθητήρων για πολλούς λόγους. Ο άνθρακας έχει σχετικά μεγάλο εύρος δυναμικού (ιδιαίτερα προς τη θετική κατεύθυνση), είναι χημικά αδρανής, ηλεκτροχημικά ανενεργός, σχετικά φθηνός, ευρέως διαθέσιμος, εύκολα κατεργάσιμος, διατίθεται σε ποικιλία μορφών και έχει χαμηλά ρεύματα υποβάθρου. Οι τύποι άνθρακα που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροχημεία γενικά διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες: α) πυρολυτικός γραφίτης, β) πολυκρυσταλλικός γραφίτης, γ) υαλώδης άνθρακας και

δ) *ίνες άνθρακα*. Οι συνηθέστερες και εφαρμοζόμενες μορφές ηλεκτροδίου άνθρακα είναι τα *ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (carbon paste electrodes, CPE)* και τα *ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα (glassy carbon, GC)*.

Τα ηλεκτρόδια *πάστας άνθρακα* (Σχήμα 16) παρασκευάζονται με ανάμιξη σκόνης γραφίτη με έναν χαμηλής πτητικότητας οργανικό διαλύτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι *ηλεκτρικά ανενεργοί, χημικά αδρανείς και υδρόφοβοι*, ώστε να μην αναμιγνύονται με το διάλυμα του αναλύτη. Ο συνηθέστερος διαλύτης είναι το *Νιζολ*, αλλά υπάρχουν και άλλοι, όπως το *εξάνιο*, το *δεκάνιο* και *έλαια σιλικόνης*. Σημαντικά πλεονεκτήματα των ηλεκτροδίων πάστας γραφίτη είναι το ιδιαίτερα *χαμηλό ρεύμα υποβάθρου*, η *επαναληψιμότητα κατασκευής*, η *εύκολη ανανέωση της επιφάνειάς τους* και η *επιδεκτικότητά τους στη χημική μορφοποίηση*.

Τα ηλεκτρόδια *υαλώδους άνθρακα* χρησιμοποιούνται πολύ συχνά σε χημικούς αισθητήρες. Ο υαλώδης άνθρακας παρασκευάζεται κατά τη θέρμανση *πολυακρυλονιτριλίου* ή *πολυμερών φαινόλης/φορμαλδεΰδης* στους 1000 – 3000 °C υπό πίεση και είναι υλικό που δεν γραφίτοποιείται ούτε στους 3000°C. Λόγω της θερμικής κατεργασίας κατά την παρασκευή του γίνεται εξαιρετικά *πορώδες*. Ο υαλώδης άνθρακας έχει πολύ καλές *μηχανικές ιδιότητες* και σε αντίθεση με το γραφίτη, είναι *σκληρός και μη διαπερατός* από το νερό ή τους οργανικούς διαλύτες. Το ρεύμα υποβάθρου, η περιοχή πόλωσης και η κινητική των ηλεκτροδιακών αντιδράσεων ποικίλλουν ανάλογα με τον καθαρισμό και την προκατεργασία του. Το ρεύμα υποβάθρου είναι γενικά λίγο μεγαλύτερο από αυτό του πολυκρυσταλλικού γραφίτη. Ο καθαρισμός της επιφάνειας των ηλεκτροδίων υαλώδους άνθρακα γίνεται εύκολα με λείανση σε ειδικά υφάσματα εμποτισμένα με αιώρημα αλουμίνιας, βύθιση σε λουτρό υπερήχων και πλύσιμο με νερό^[56].



Σχήμα 16. Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα^[57].

Τα κλασικά ηλεκτρόδια άνθρακα έχουν περιορισμένα σχήματα, συνήθως κυλινδρικό ή σχήμα δίσκου. Τα τελευταία χρόνια, με τη χρήση της *τρισδιάστατης (3D) εκτύπωσης* κατασκευάζονται ηλεκτρόδια άνθρακα με διάφορες γεωμετρίες, ενώ μπορούν να ενσωματωθούν και σε 3D εκτυπωμένες κυψελίδες^[58,59]. Η τρισδιάστατη εκτύπωση περιγράφεται εκτενέστερα στο 4^ο κεφάλαιο.

Επίσης πρόσφατα, τα *νανοϋλικά άνθρακα (Carbon Nanomaterials – CNMs)* έχουν αρχίσει και εφαρμόζονται στην κατασκευή ηλεκτροδίων προσδίδοντας ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στα ηλεκτρόδια. Τα ανθρακικά νανοϋλικά παρέχουν τη δυνατότητα μορφοποίησης των επιφανειών των ηλεκτροδίων, ενισχύοντας, την απόδοση των ηλεκτροχημικών αισθητήρων^[60-66]. Διάφοροι τύποι CNMs έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι:

- Νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon Nanotubes – CNTs),
- Γραφένιο (Graphene – GR),
- Αιθάλη (Carbon Black – CB),
- Οξειδίο γραφενίου (Graphene Oxide – GO),
- Φουλερένια (Fullerenes – C₆₀),
- Κβαντικές Κουκκίδες άνθρακα (Carbon Dots – CDs), και
- Νανοϊνες άνθρακα (Carbon Nanofibers – CNFs).

3.3.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά

✓ Καμπύλη βαθμονόμησης

Προκειμένου να χαρακτηριστεί η αναλυτική συμπεριφορά των βιοαισθητήρων, αρχικά γίνεται *βαθμονόμηση του αισθητήρα*. Η *βαθμονόμηση του αισθητήρα* μπορεί να γίνει είτε με προσθήκη γνωστής ποσότητας του αναλύτη ή με χρήση διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων. Η καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει από το μετρούμενο σήμα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Ως μετρούμενο σήμα θεωρείται η τιμή του ρεύματος μετά την απαραίτητη διόρθωση για το σήμα υποστρώματος.

✓ Γραμμικό εύρος – Ευαισθησία – Όρια ανίχνευσης

Το εύρος των συγκεντρώσεων, στο οποίο η μεταβολή της μετρούμενης παραμέτρου του αισθητήρα είναι γραμμική ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη, ορίζεται ως *γραμμικό εύρος απόκρισης*.

Η κλίση της ευθείας αυτής δίνει την ευαισθησία του αισθητήρα, η οποία ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης παραμέτρου προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης. Συχνά, για να διευκολύνεται η σύγκριση μεταξύ αισθητήρων με διαφορετική γεωμετρία, η ευαισθησία εκφράζεται ανά μονάδα επιφάνειας.

Το κατώτατο όριο ανίχνευσης (*limit of detection – LOD*) καθορίζεται απ' τη μικρότερη δυνατή ποσότητα αναλύτη που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί από τον αισθητήρα με αξιοπιστία. Συνήθως, υπολογίζεται ως η συγκέντρωση, που δίνει σήμα τριπλάσιο του θορύβου ($S/N = 3$), μπορεί όμως να υπολογιστεί και γραφικά από το σημείο τομής του γραμμικού και του μη γραμμικού τμήματος της καμπύλης βαθμονόμησης.

✓ *Εκλεκτικότητα*

Η *εκλεκτικότητα* ή *επιλεκτικότητα* αποτελεί ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων και ορίζεται ως η ικανότητα του αισθητήρα να διακρίνει μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων. Εξαρτάται κυρίως από το βιολογικό μόριο, ωστόσο πολλές φορές και η κατάλληλη επιλογή και η λειτουργία του μεταλλάκτη μπορεί να μεταβάλλουν την εκλεκτικότητα του συστήματος. Η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) έχει προτείνει δύο μεθόδους για τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας των βιοαισθητήρων: Σύμφωνα με την 1^η μέθοδο, γίνεται καμπύλη αναφοράς του βιοαισθητήρα σε κάθε παρεμποδίζουσα ουσία, και έπειτα συγκρίνεται με την καμπύλη αναφοράς του βιοαισθητήρα στον αναλύτη, υπό τις ίδιες συνθήκες. Η εκλεκτικότητα εκφράζεται ως ο λόγος του σήματος σε μια συγκέντρωση αναλύτη δια του σήματος στην ίδια συγκέντρωση παρεμποδίζουσας ουσίας. Η 2^η μέθοδος βασίζεται στην προσθήκη της παρεμποδίζουσας ουσίας στο διάλυμα του αναλύτη, σε συγκεντρώσεις που αναμένονται στα πραγματικά δείγματα. Η εκλεκτικότητα, σε αυτή την περίπτωση, εκφράζεται ως το ποσοστό διακύμανσης της απόκρισης του βιοαισθητήρα, μετά την προσθήκη της παρεμποδίζουσας ουσίας.

✓ *Επαναληψιμότητα*

Ο όρος *επαναληψιμότητα* χρησιμοποιείται για να εκφράσει την *επαναληψιμότητα μετρήσεων του βιοαισθητήρα*, αλλά και την *επαναληψιμότητα στην κατασκευή του*. Εκφράζεται με την επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ($\%RSD$) μεταξύ μετρήσεων του ίδιου βιοαισθητήρα ή μεταξύ διαφορετικών βιοαισθητήρων, αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό της μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, η

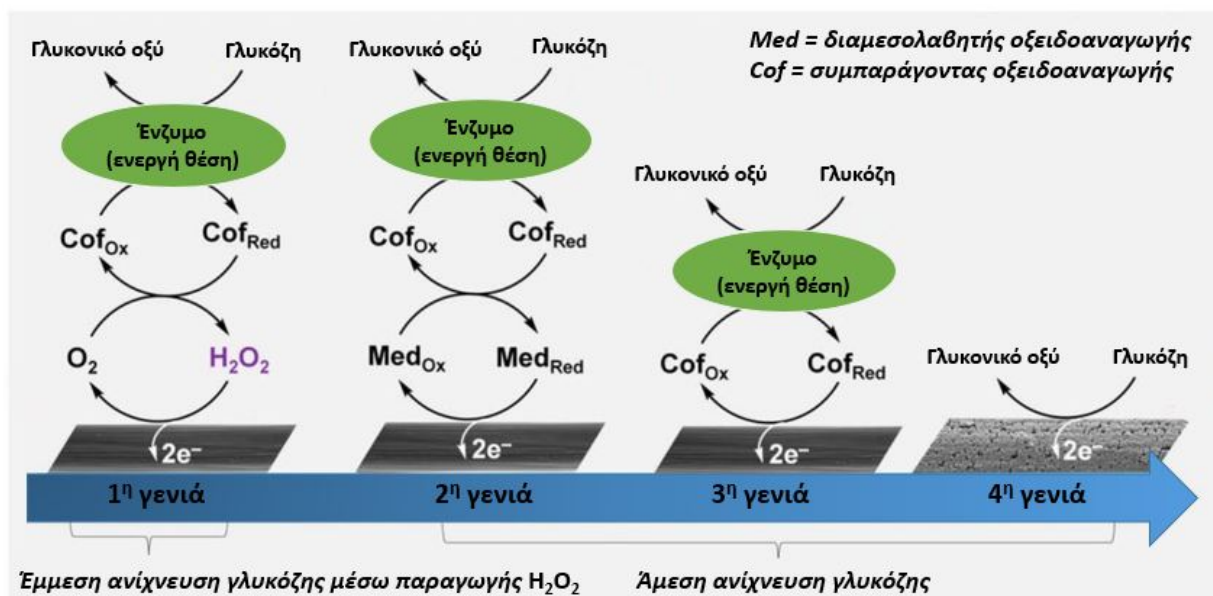
απόκριση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αναλύτη ή σπανιότερα κάποιο άλλο από τα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός βιοαισθητήρα.

✓ Σταθερότητα – Χρόνος ζωής

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα κατά 10%, ή κατά 50% σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας ή σε συνθήκες αποθήκευσης. Εξαρτάται από τη γεωμετρία και τη μέθοδο κατασκευής του βιοαισθητήρα, από το χρησιμοποιούμενο μεταλλάκτη σήματος, αλλά κυρίως από τη σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Τέλος, εξαρτάται και από τις συνθήκες λειτουργίας ενός αισθητήρα, όπως το εφαρμοζόμενο δυναμικό, η θερμοκρασία, το pH κλπ. Για το λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφέρονται σε κάθε περίπτωση οι ακριβείς συνθήκες υπό τις οποίες εξετάστηκε^[51].

3.4 Ηλεκτροχημικοί μη-ενζυμικοί αισθητήρες

Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει ερευνητικά η αντικατάσταση των ενζύμων με νέα υλικά που λειτουργούν ως τεχνητά «βιομιμητικά» ένζυμα (αποκαλούμενα επίσης ως νανοένζυμα) για τον μη-ενζυματικό προσδιορισμό βιοδεικτών. Οι αισθητήρες που βασίζονται στα συγκεκριμένα υλικά κατατάσσονται ως η **4^η γενιά αισθητήρων**. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται οι αρχές λειτουργίας για τις τέσσερις διαφορετικές γενιές των ηλεκτροχημικών αισθητήρων γλυκόζης:



Σχήμα 17. Σχηματική αναπαράσταση των αρχών λειτουργίας για τις διαφορετικές γενιές των ηλεκτροχημικών αισθητήρων γλυκόζης.

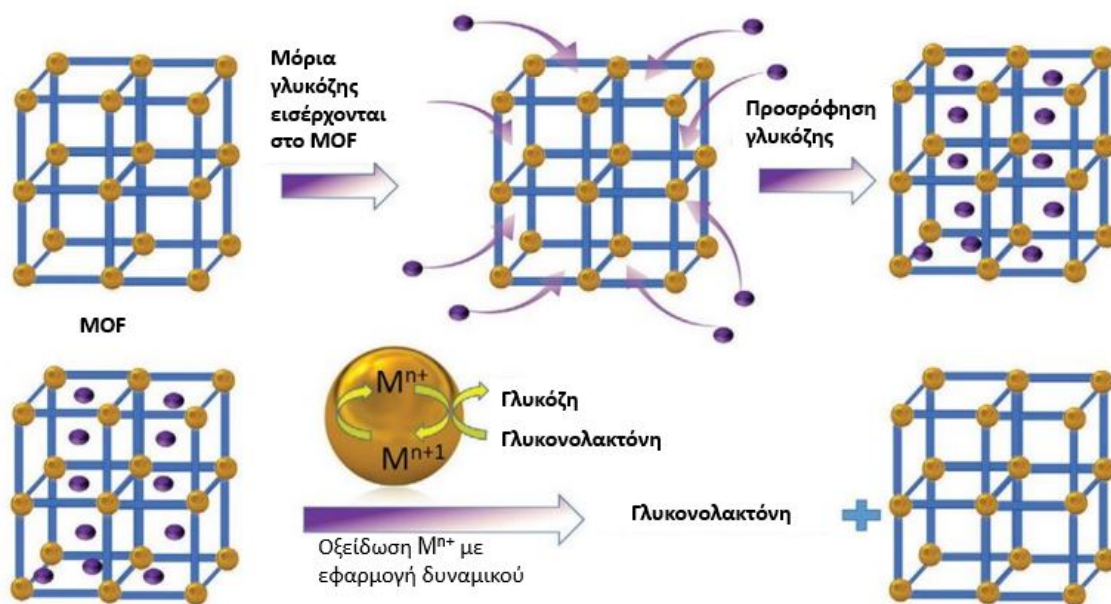
Με τη χρήση αυτών των υλικών επιχειρείται να ξεπεραστούν τα σημαντικότερα μειονεκτήματα των ενζυμικών βιοαισθητήρων που αφορούν στο κόστος και στη σταθερότητα του ενζύμου σε διαφορετικές συνθήκες μέτρησης (pH, θερμοκρασία, ιονική ισχύ). Για παράδειγμα νανοσωματίδια διαφόρων μετάλλων όπως Ni, Co, Cu, Au και οξειδία μετάλλων (όπως NiO, Co₃O₄, CuO, Cu₂O, ZnO, MnO₂, Mn₃O₄, WO₃, TiO₂, CdO, Fe₂O₃, Fe₃O₄) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον μη-ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης με βολταμμετρία και αμπερομετρία. Τα σωματίδια αυτά λειτουργούν ως *καταλύτες* στην οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ, και παρουσιάζουν *μεγάλη σταθερότητα* και *χαμηλό κόστος*^[59,67]. Έναν άλλον τύπο βιομιμητικών νανοενζυμών, αποτελούν οι *μεταλλο-οργανικές κατασκευές (metal-organic frameworks – MOFs)*.

Τα MOFs είναι κρυσταλλικά πολυμερή που περιέχουν *iónτα μετάλλων* και *οργανικά μόρια*. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για δομές που δημιουργούνται από τον *ομοιοπολικό δεσμό* μεταξύ μετάλλων και μίας οργανικής ένωσης (linker) και σχηματίζουν *μονοδιάστατα, δισδιάστατα ή τρισδιάστατα συμπλέγματα* (Σχήμα 18). Είναι ιδιαίτερα πορώδη υλικά με μεγάλη ειδική επιφάνεια, που ορίζεται ως η επιφάνεια των τοιχωμάτων των πόρων ανά μονάδα μάζας ή συνολικού όγκου του μέσου, κάτι που διευκολύνει τις διεργασίες, όπου υφίσταται αλληλεπίδραση του πορώδους υλικού με το ρευστό που το περιβάλλει. Τα MOFs συνδυάζουν χαρακτηριστικά τόσο από οργανικά, όσο και από ανόργανα πορώδη υλικά. Η δομή του μορίου αλλά και ιδιότητες όπως το μέγεθος των πόρων μπορούν να ρυθμιστούν στο επιθυμητό, σχεδόν κατά βούληση, δίνοντας αμέτρητες δυνατότητες για σύνθεση νέων MOFs που θα έχουν κάθε φορά τη λειτουργικότητα που ενδιαφέρει. Χάρη στην *αγωγιμότητα*, την *καθορισμένη δομή* και την *ευελιξία* που παρουσιάζουν, θεωρούνται ιδανικά για την μορφοποίηση ηλεκτροδίων για τον προσδιορισμό μετάλλων και οργανικών ενώσεων. Η συνηθέστερη διαδικασία μορφοποίησης των ηλεκτροδίων με MOFs, βασίζεται στην εναπόθεση του MOF πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα MOFs έχουν αξιοποιηθεί ως καταλύτες στον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό γλυκόζης και άλλων βιοδεικτών^[68].



Σχήμα 18. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των MOFs^[68].

Για παράδειγμα, ο μηχανισμός ενός μη-ενζυμικού ηλεκτροχημικού MOF-αισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης, μπορεί να αποτυπωθεί στο Σχήμα 19. Αρχικά, μόρια γλυκόζης (μέγεθος 1 nm) εισέρχονται στους πόρους του MOF (μέγεθος πόρων περίπου 10 nm) και προσροφώνται. Στη συνέχεια, το μεταλλικό ιόν M^{n+} οξειδώνεται με εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού, ηλεκτροκαταλύοντας την οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονολακτόνη.

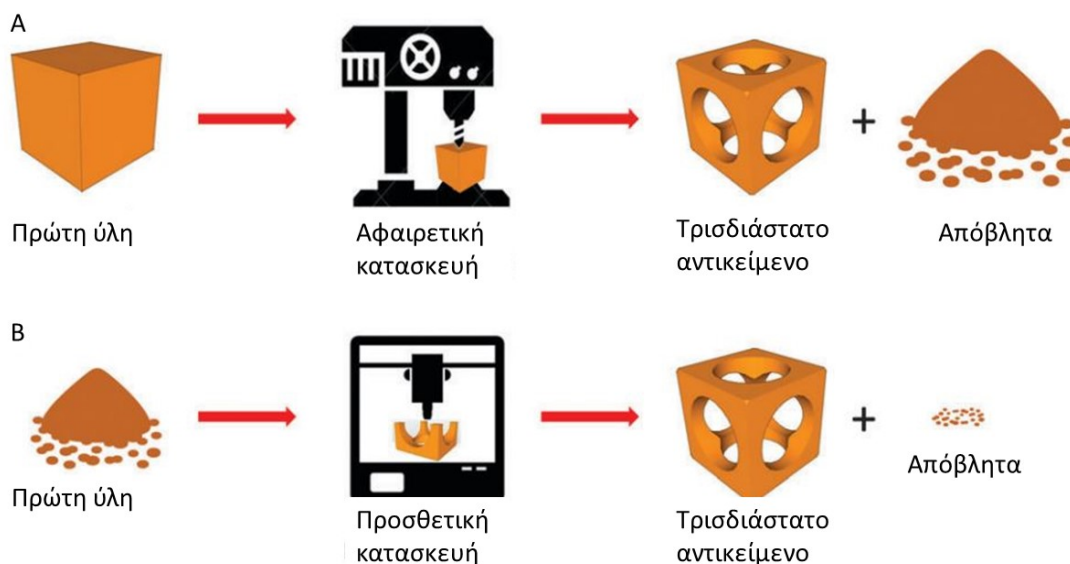


Σχήμα 19. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης ενός μη-ενζυμικού αισθητήρα γλυκόζης μέσω μεταλλο-οργανικών κατασκευών^[68].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ

Από την αρχική ιδέα, τη δεκαετία του 1980, η **τρισδιάστατη εκτύπωση** έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τόσο από τη *βιομηχανία* όσο και από τα *ερευνητικά εργαστήρια*. Οι τρισδιάστατοι εκτυπωτές είναι μικρού μεγέθους, σχετικά φθηνοί, και επιτρέπουν τη γρήγορη αντιγραφή μιας τρισδιάστατης δομής. Η τεχνολογία της τρισδιάστατης εκτύπωσης έχει εφαρμοστεί σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως είναι η *αεροδιαστημική*, η *μηχανολογία*, η *ηλεκτρολογία*, η *ιατρική*, η *επιστήμη των υλικών* ενώ πρόσφατα εφαρμόστηκε στην *αναλυτική χημεία* και την *ηλεκτροχημεία*. Η ελευθερία στο σχεδιασμό επιτρέπει τη δημιουργία *πρωτότυπων υλικών* και *ηλεκτροχημικών αισθητήρων* που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και σε επιθυμητό σχήμα.

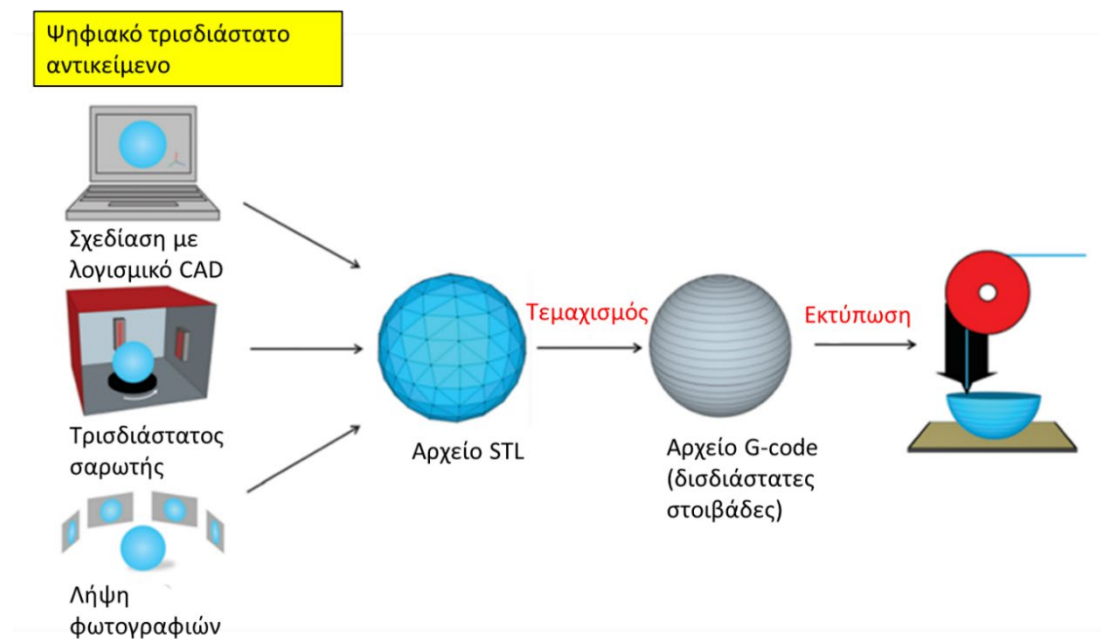


Σχήμα 20: Διαφορές προσθετικής και αφαιρετικής κατασκευής: A) Αφαιρετική κατασκευή, και B) Προσθετική κατασκευή^[69].

Η τρισδιάστατη εκτύπωση είναι γνωστή και ως *προσθετική κατασκευή (additive manufacturing)*, οπότε θα μπορούσαμε να πούμε ότι ακολουθεί την αντίθετη αρχή από τις παραδοσιακές τεχνικές, στις οποίες τα τρισδιάστατα αντικείμενα κατασκευάζονται με διαδικασίες αφαίρεσης υλικού (π.χ. *τρύπημα*, *πριόνισμα*, *άλεσμα*). Η τεχνολογία της προσθετικής κατασκευής, βασίζεται στην προσθήκη *στιβάδας προς στιβάδα* του επιθυμητού υλικού, μέσω μίας ψηφιακά ελεγχόμενης διαδικασίας ενός βήματος (Σχήμα 20). Για αυτόν ακριβώς το λόγο παράγει λιγότερα απόβλητα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές κατασκευής^[69].

4.1 Διαδικασία τρισδιάστατης εκτύπωσης

Η διαδικασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης περιλαμβάνει την κατασκευή τρισδιάστατων αντικειμένων εναποθέτοντας στιβάδες υλικού. Το πρώτο στάδιο είναι η σχεδίαση του αντικειμένου η οποία, πραγματοποιείται με ειδικό λογισμικό σχεδίασης (*computer-aided design, CAD*). Άλλοι τρόποι δημιουργίας του σχεδίου του αντικειμένου είναι με τη χρήση τρισδιάστατου scanner ή με τη λήψη πολλών φωτογραφιών. Κατά το δεύτερο στάδιο, το αρχείο μετατρέπεται σε μορφή *STL* (*Standard Triangle Language*) για να είναι συμβατό με το λογισμικό του 3D εκτυπωτή και η τρισδιάστατη εικόνα μετατρέπεται σε συνεχόμενες δισδιάστατες στιβάδες του αρχικού αντικειμένου, δίνοντας ένα αρχείο *G-code*. Στο σημείο αυτό, ο τρισδιάστατος εκτυπωτής μπορεί να δημιουργήσει το αντικείμενο, εναποθέτοντας τη μία στιβάδα πάνω από την άλλη^[69] (Σχήμα 21).



Σχήμα 21. Η διαδικασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης: δημιουργείται ένα ψηφιακό μοντέλο της κατασκευής του αντικειμένου, χρησιμοποιώντας λογισμικό CAD ή τρισδιάστατο σαρωτή (3D scanner) ή με τη λήψη πολλών φωτογραφιών. Το τρισδιάστατο μοντέλο μετατρέπεται σε αρχείο STL και η τρισδιάστατη εικόνα μετατρέπεται σε συνεχόμενες δισδιάστατες στιβάδες δίνοντας ένα αρχείο G-code. Τέλος, τυπώνεται το τρισδιάστατο αντικείμενο σε διαδοχικές δισδιάστατες στιβάδες^[69].

Διαδικασία 3D	Τεχνική	Πρώτη ύλη	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Φωτοπολυμερισμός	Στερεολιθογραφία (SLA)	Φωτοπολυμερή	Απλό	Ένα υλικό
	Ψεκασμός υλικού - (Material jetting)	Φωτοπολυμερή	Χρήση πολλαπλών υλικών Απλό	Υψηλό κόστος
Συντηγμένη εναπόθεση	Μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης (FDM)	Θερμοπλαστικά (ABS, PLA, PC, PA), γυαλί, μέταλλα	Χρήση πολλαπλών υλικών, χαμηλό κόστος (για τα θερμοπλαστικά)	Υψηλό κόστος (για γυαλί και μέταλλα)
	Άμεση γραφή με μελάνι (Robocasting – DIW)	Πλαστικά, κεραμικά, τρόφιμα, ζωντανά κύτταρα, συνδυασμός μετάλλων	Πολλαπλών χρήσεων	Απαιτείται προκατεργασία Ετερογενής εκτύπωση
	Επιλεκτική συσσωμάτωση με λέιζερ - selective laser sintering, SLS	Θερμοπλαστικά, μέταλλα	Δεν απαιτείται υλικό στήριξης	Περιορισμένες μηχανικές ιδιότητες του αντικειμένου Υψηλό κόστος
Χρήση υλικών σε κόκκους	Επιλεκτική σύντηξη λέιζερ, selective laser melting, SLM	Μέταλλα	Δεν απαιτείται υλικό στήριξης	Υψηλό κόστος
	Τήξη με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων (electron beam melting, EBM)	Μέταλλα	Δεν απαιτείται υλικό στήριξης	Υψηλό κόστος
	Ψεκασμός συγκολλητικής ουσίας (binder jetting)	Ρινίσματα μετάλλων	Δεν απαιτείται υλικό στήριξης Πολλαπλών χρήσεων Χαμηλό κόστος συγκριτικά με τις τεχνικές σύνδεσης λέιζερ	Ετερογενής εκτύπωση Περιορισμένες μηχανικές ιδιότητες του αντικειμένου
Πρώτη ύλη σε φύλλα	Συγκόλληση επάλληλων φύλλων (laminated object manufacturing, LOM)	Χαρτί, μέταλλα, πλαστικά (που είναι διαθέσιμα σε φύλλα)	Πολλαπλών χρήσεων	Περιορισμένες μηχανικές ιδιότητες του αντικειμένου Περιορισμός στη σχεδίαση

Πίνακας 2. Περίληψη τεχνικών τρισδιάστατης εκτύπωσης^[69,70].

4.2 Τεχνικές τρισδιάστατης εκτύπωσης

Αρκετές διαφορετικές μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί για την εναπόθεση των στιβάδων και μπορούν να καταταχθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες (Πίνακας 2):

- ✓ Φωτοπολυμερισμός.
- ✓ Συντηγμένη εναπόθεση.
- ✓ Κονιοποιημένη πρώτη ύλη (powder).
- ✓ Πρώτη ύλη σε φύλλα (sheet).

4.2.1 Φωτοπολυμερισμός

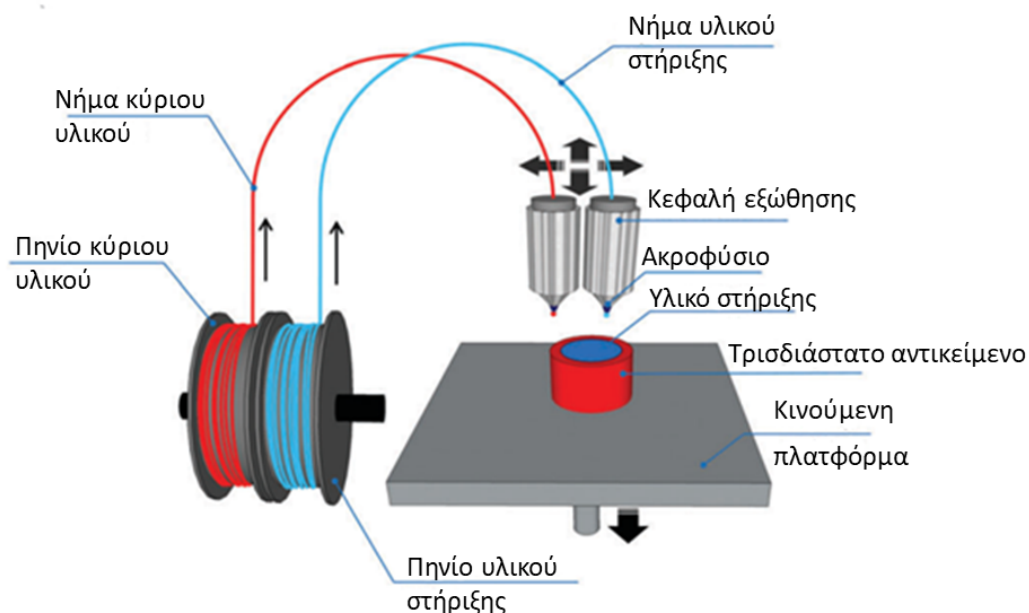
Ο **φωτοπολυμερισμός** είναι από τις πρώτες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην τρισδιάστατη εκτύπωση και δημιουργήθηκε τη δεκαετία του 1980. Αρχικά, ο Hideo Kodama ανέπτυξε μέθοδο για την κατασκευή τρισδιάστατων αντικειμένων, η οποία βασίζεται στην εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) σε φωτοσκληρυνόμενο πολυμερές. Εφαρμόζοντας, λοιπόν, UV ακτινοβολία η επιφάνεια του ρευστού πολυμερούς στερεοποιείται. Στη συνέχεια, βυθίζοντας την στερεοποιημένη επιφάνεια με ελεγχόμενο τρόπο δημιουργούνται διαδοχικά στιβάδες μέχρι την τελική κατασκευή του τρισδιάστατου αντικειμένου. Το 1984 ο Charles Hull ανέπτυξε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα που εφαρμόζει αυτή την τεχνική, η οποία είναι γνωστή ως στερεολιθογραφία (Stereolithography-SLA). Στον ίδιο οφείλεται η εφεύρεση των STL αρχείων που επιτρέπουν τη διασύνδεση μεταξύ της ψηφιακής σχεδίασης και των τρισδιάστατων συστημάτων εκτύπωσης. Τα συγκεκριμένα αρχεία χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα^[69].

Η εναπόθεση των φωτοσκληρυνόμενων στιβάδων μπορεί να γίνει και δια ψεκασμού, μετά τον οποίο εφαρμόζεται UV ακτινοβολία ώστε να γίνει σκλήρυνση της επιφάνειας. Για την κατασκευή περίπλοκων σχεδίων, τα οποία απαιτούν μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιείται συχνά ένα υποστηρικτικό υλικό. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τη δημιουργία αντικειμένων που αποτελούνται από πολλά διαφορετικά υλικά, αλλά το μειονέκτημά της είναι το υψηλό κόστος. Η τεχνική αυτή προς το παρόν δεν εφαρμόζεται στην κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων, επειδή δεν είναι αγωγίμα τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα φωτοπολυμερή^[69,70].

4.2.2 Συντηγμένη εναπόθεση

Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής είναι η εναπόθεση του κύριου υλικού (*model material*) ή και του υποστηρικτικού υλικού (*support material*) από την κεφαλή ενός ακροφυσίου. Το υλικό αυτό προηγουμένως έχει υποστεί θερμική επεξεργασία (π.χ. ρευστοποίηση).

Η πιο συνηθισμένη τεχνική τρισδιάστατης εκτύπωσης που βασίζεται σε αυτή τη μέθοδο είναι η **μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης** (*Fused Deposition Modeling, FDM*). Με τη μέθοδο αυτή, δημιουργούνται τρισδιάστατα αντικείμενα χρησιμοποιώντας θερμοπλαστικά. Η συγκεκριμένη τεχνική επινοήθηκε από τον Scott Crump το 1989^[71]. Όπως και οι υπόλοιπες, η μέθοδος FDM λειτουργεί σύμφωνα με την αρχή της κατασκευής με διαδοχική προσθήκη στιβάδας προς στιβάδα. Κάθε στρώση παράγεται μέσω της εξώθησης θερμοπλαστικού σε ρευστή κατάσταση. Το υλικό τροφοδοτείται σε μορφή νήματος (*filament*) σε θερμαινόμενη κεφαλή όπου ρευστοποιείται και εξωθείται πάνω σε πλατφόρμα που έχει θερμοκρασία ελαφρά χαμηλότερη από τη θερμοκρασία ρευστοποίησής του, οπότε στερεοποιείται στο προγραμματισμένο σχήμα^[72] (Σχήμα 22).



Σχήμα 22. Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής FDM: η κεφαλή πληρωμένη με το θερμοσκληρυνόμενο πολυμερές μετακινείται σε τρεις διαστάσεις και εναποθέτει στιβάδα προς στιβάδα στην πλατφόρμα κατασκευής, το ρευστό πολυμερές^[69].

Μέσω της συγκεκριμένης τεχνολογίας μπορούν να παραχθούν αντικείμενα που έχουν ως πρώτη ύλη θερμοπλαστικά πολυμερή. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το **πολυ(γαλακτικό) οξύ** (*Polylactic Acid, PLA*) και το **συμπολυμερές ακρυλονιτριλίου βουταδιενίου στυρενίου** (*Acrylonitrile Butadiene Styrene, ABS*), αλλά μπορούν να αξιοποιηθούν και τα **πολυκαρβονικά υλικά** (*Polycarbonates, PC*), τα **πολυαμίδια** (*Polyamide, PA*), η **πολυβινυλική αλκοόλη** (*Polyvinyl Alcohol, PVA*), το **Nylon^R**, το **συμπολυμερές της γλυκόλης τereφθαλικού πολυαιθυλενίου** (*Polyethylene Terephthalate Glycol, PETG*), το **θερμοπλαστικό ελαστομερές** (*Thermoplastic Elastomer, TPE*), τα **θερμοπλαστικά συμπολυμερή πολυεστέρα** (*Thermoplastic polyester elastomers, TPEE*) και η **θερμοπλαστική πολυουρεθάνη** (*thermoplastic polyurethane, TPU*). Τα υλικά καθώς και οι μέθοδοι σύνθεσης των αγώγιμων πολυμερικών νημάτων για την τρισδιάστατη εκτύπωση ηλεκτροχημικών αισθητήρων, αναλύονται εκτενέστερα στο 5^ο κεφάλαιο.

Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα διαφορετικές κεφαλές κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης, δημιουργώντας αντικείμενα που αποτελούνται από διαφορετικά υλικά.

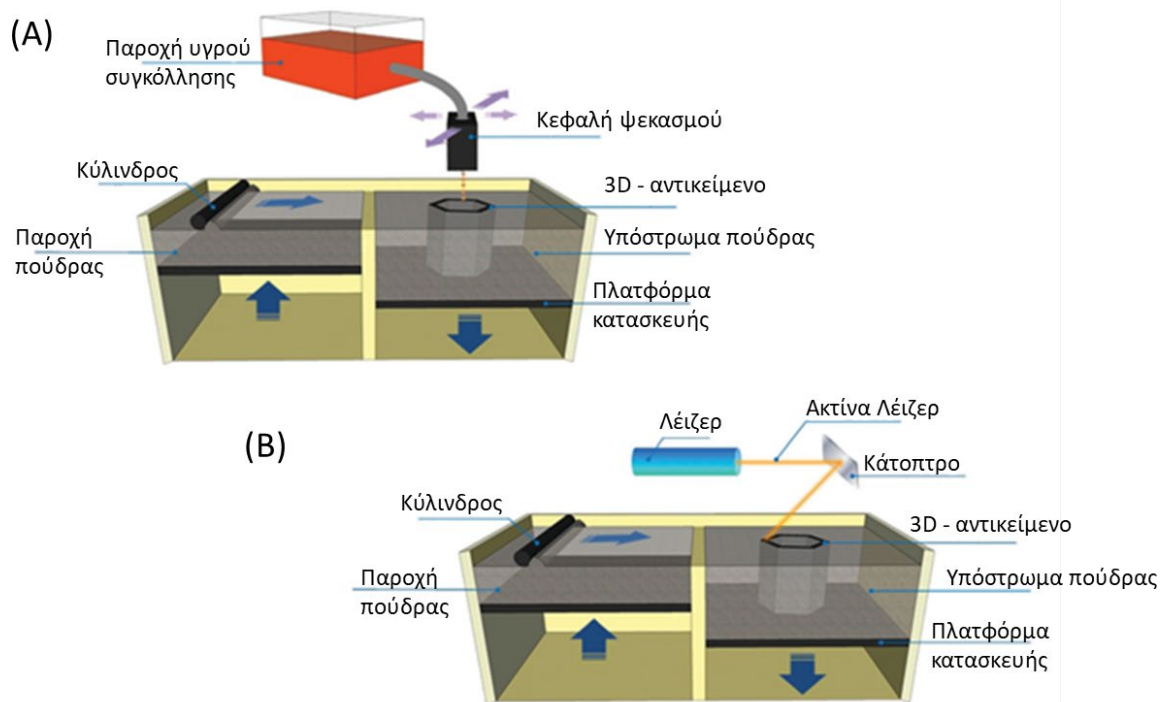
4.2.3 Κονιοποιημένη πρώτη ύλη

Η συγκεκριμένη μέθοδος τρισδιάστατης εκτύπωσης χρησιμοποιεί σωματίδια σε μορφή πούδρας ως δομικό υλικό, με μέγεθος 50 – 100 μm. Η διαδικασία της εκτύπωσης είναι παρόμοια με τη στερεολιθογραφία (SLA) με μόνη διαφορά ότι το ρευστό πολυμερές έχει αντικατασταθεί από πούδρα σωματιδίων και η εναπόθεση των στιβάδων γίνεται με τη βοήθεια κυλίνδρου όπως φαίνεται στο Σχήμα 23. Αφού έχει γίνει η εναπόθεση της πρώτης στιβάδας, εφαρμόζεται μια διαδικασία συγκόλλησης των υλικών είτε με τη χρήση υγρής κόλλας είτε με την εφαρμογή laser. Με την ίδια διαδικασία γίνεται και η εναπόθεση των υπόλοιπων στιβάδων, προκειμένου να δημιουργηθεί το τρισδιάστατο αντικείμενο που έχει σχεδιαστεί. Το μεγαλύτερο ίσως πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλης ποικιλίας υλικών, το οποίο επιτρέπει την κατασκευή *κεραμικών, γύψινων, ακρυλικών, ξύλινων, μαρμάρινων και μεταλλικών* αντικειμένων.

Ο ευκολότερος τρόπος συγκόλλησης των σωματιδίων είναι η προσθήκη υλικού συγκόλλησης (π.χ. κόλλας) στη στιβάδα που έχει δημιουργηθεί. Η τεχνική αυτή ονομάζεται **ψεκασμός συνδετικού υλικού** (*binder jetting*). Εναλλακτικά, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ακτίνες λέιζερ ώστε το υλικό να αποκτήσει θερμοκρασία λίγο πιο χαμηλή από το σημείο τήξης και να γίνει πυροσυσσωμάτωση του υλικού (**επιλεκτική συσσωμάτωση λέιζερ – Selective Laser Sintering, SLS**) ή να φτάσει το σημείο τήξης ώστε να γίνει σύντηξη (**επιλεκτική σύντηξη λέιζερ – Selective Laser Melting, SLM**). Οι συγκεκριμένες μέθοδοι με τη χρήση ακτινών λέιζερ, εφαρμόζονται κυρίως σε μέταλλα και κράματα μετάλλων όπως *ασάλι, τιτάνιο, αλουμίνιο, νικέλιο, μπρούντζος* ή *κράματα πολυτίμων μετάλλων*^[69].

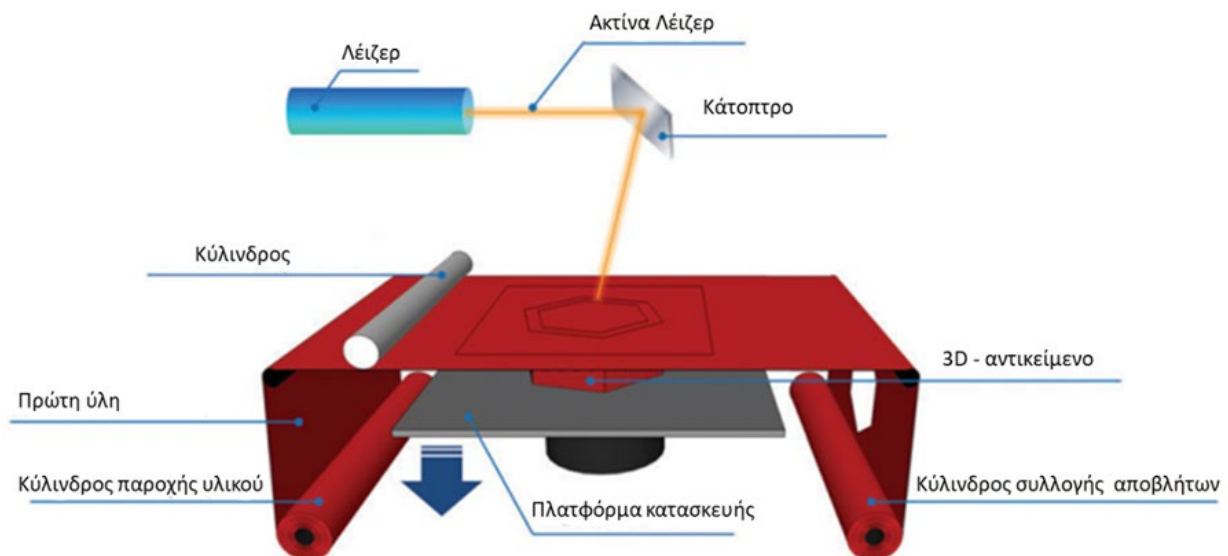
Πρόσφατα, προτάθηκε μέθοδος με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνονται μεγαλύτερες θερμοκρασίες και το μεταλλικό αντικείμενο που δημιουργείται αποκτά βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται **τήξη με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων (Electron Beam Melting, EBM)**^[73,74].



Σχήμα 23. (A) Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής του ψεκασμού συνδετικού υλικού (*binder jetting*). (B) Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής της επιλεκτικής συσσωμάτωσης λέιζερ – SLS ή επιλεκτικής σύντηξης λέιζερ – SLM^[69].

4.2.4 Πρώτη ύλη σε φύλλα

Η τεχνολογία αυτή είναι γνωστή ως **συγκόλληση επάλληλων φύλλων** (*Laminated Object Manufacturing, LOM*) και εφευρέθηκε από τον Helisys τη δεκαετία του 1980^[75]. Αφού γίνει η εναπόθεση του πρώτου «φύλλου» στην πλατφόρμα, υποβάλλεται σε διαδικασία κοπής με λέιζερ (ή άλλου κοπτικού εργαλείου). Ο σχεδιασμός της μεθόδου κοπής γίνεται με πρόγραμμα CAD, όπως και στις άλλες τεχνικές. Μόλις αφαιρεθεί το περιττό υλικό, η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα «φύλλα». Ανάλογα με την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται, επιλέγεται και η κατάλληλη τεχνική συγκόλλησης. Ως πρώτη ύλη μπορεί να χρησιμοποιηθούν *μέταλλο, χαρτί, πλαστικό* κ.α. Η διαδικασία που ακολουθείται φαίνεται στο Σχήμα 24^[69,72].



Σχήμα 24: Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής κατασκευής αντικειμένων με ελασμάτωση^[69].

4.3 Η τρισδιάστατη εκτύπωση στην ηλεκτροχημεία

Η ηλεκτροχημεία επωφελείται από τη χρήση της τεχνολογίας της τρισδιάστατης εκτύπωσης καθώς παρέχεται η δυνατότητα κατασκευής πολύπλοκων συστημάτων σε πολύ χαμηλό κόστος. Συγκεκριμένα, με τη χρήση τρισδιάστατου εκτυπωτή μπορούν να παραχθούν αγωγιμα ηλεκτρόδια σε ποικιλία σχημάτων και σύστασης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για οξειδοαναγωγικές και καταλυτικές διαδικασίες.

Επιπλέον, μπορούν να δημιουργηθούν και βολταμμετρικές κυψελίδες, οι οποίες συνδυάζονται με τα ηλεκτρόδια και μας παρέχουν ολοκληρωμένες μικρο-διατάξεις σε διάφορα σχήματα και μεγέθη. Αρκετές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για την κατασκευή ηλεκτροδίων, όπως είναι ο *ψεκασμός συνδεδειμένου υλικού (binder jetting)*, η *στερεολιθογραφία (SLA)* και το *robocasting*, η τεχνική που χρησιμοποιείται συχνότερα όμως, είναι η *μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης (FDM)*^[69-71,76,77].

4.4 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες κατασκευασμένοι μέσω FDM

Η μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης χρησιμοποιείται για ηλεκτροχημικές και ηλεκτροαναλυτικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, έχει εφαρμοστεί για την κατασκευή *ηλεκτροδίων, ηλεκτροχημικών κυψελίδων, συστημάτων μικρορευστονικής (microfluidic systems), ηλεκτροχημικών μικροσκοπίων, φασματοηλεκτροχημικών κυψελίδων (spectrochemical cells)* κ.α.

Το σχήμα και τα δομικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροχημικών διατάξεων ή των αισθητήρων διαμορφώνονται σύμφωνα με τις παραμέτρους εκτύπωσης. Κατά την κατασκευή του ηλεκτροδίου λαμβάνεται υπόψιν το υλικό και η σύσταση του νήματος (filament). Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως, η FDM βασίζεται στην τήξη του νήματος και στη συνέχεια, στη διαδοχική εναπόθεση των στιβάδων του υλικού με κίνηση των κεφαλών εξώθησης ή και της πλατφόρμας, επιτρέποντας τη δημιουργία των τρισδιάστατων αντικειμένων^[78-80].

Η τεχνική της μοντελοποίησης συντηγμένης εναπόθεσης (FDM) λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της (*χαμηλό κόστος, ταχύτητα, ευκολία κατασκευής*) χρησιμοποιείται ευρέως στη δημιουργία *ηλεκτροχημικών αισθητήρων*, οι οποίοι εφαρμόζονται στην *ανάλυση τροφίμων, καυσίμων, ύδατος, φαρμακευτικών σκευασμάτων, βιολογικών δειγμάτων* και στην *εγκληματολογική ανάλυση*^[81-84].

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των αισθητήρων που κατασκευάζονται μέσω FDM είναι :

- Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την κατασκευή τους είναι μικρός σε μέγεθος και απλός στη χρήση του.
- Μπορούν να σχεδιαστούν και να κατασκευαστούν αισθητήρες σε διάφορα μεγέθη και σχήματα, χωρίς τη χρήση υποστρώματος.

- Η κατασκευή των αισθητήρων βασίζεται σε ανοιχτού κώδικα λογισμικό και δεν είναι χρονοβόρα.
- Η δημιουργία πολλών ομοιόμορφων αντιγράφων αισθητήρων γίνεται με μεγάλη ακρίβεια.
- Το λειτουργικό κόστος, καθώς και το κόστος των υλικών είναι πολύ χαμηλό.
- Μπορούν να κατασκευαστούν αισθητήρες χρησιμοποιώντας μεγάλη ποικιλία αγώγιμων νημάτων.
- Παρέχεται η δυνατότητα κατασκευής, σε ένα στάδιο, ηλεκτροχημικών διατάξεων κατασκευασμένων από διαφορετικά υλικά, με τη χρήση τρισδιάστατου εκτυπωτή με πολλαπλές κεφαλές.
- Τόσο η ευκολία χειρισμού από μη εκπαιδευμένους χρήστες όσο και η δυνατότητα αποστολής/μεταφοράς μέσω email, επιτρέπουν την κατ' απαίτηση παραγωγή αισθητήρων ακόμη και στο χώρο του σπιτιού.
- Τέλος, χάρη στην τεχνολογία της προσθετικής κατασκευής και την απουσία χρήσης χημικών, παράγεται μια αμελητέα ποσότητα αποβλήτων, καθιστώντας την φιλική προς το περιβάλλον.

4.5 Προεπεξεργασία της επιφάνειας των τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροδίων

Τα ηλεκτρόδια που κατασκευάζονται από θερμοπλαστικά νημάτια χρειάζονται συχνά επεξεργασία της επιφάνειας τους, επειδή το αγώγιμο υλικό (τύπος άνθρακα) καλύπτεται από το θερμοπλαστικό υλικό (PLA, ABS). Για το σκοπό αυτό πολλές στρατηγικές έχουν εφαρμοστεί, όπως *χημικές* και *ηλεκτροχημικές*, για να επιτευχθεί η μερική απομάκρυνση του μη αγώγιμου πολυμερούς που υπάρχει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επιπλέον, έχουν προταθεί και εναλλακτικές τεχνικές που δεν χρησιμοποιούν αντιδραστήρια και είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον, όπως η *μηχανική στίλβωση*, η *θερμική επεξεργασία* και η *ενεργοποίηση με λέιζερ και CO₂*. Με τους τρόπους αυτούς βελτιώνεται η ηλεκτροχημική απόκριση των τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροδίων, όμως υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα, όπως ότι οι συγκεκριμένες διαδικασίες είναι *χρονοβόρες* ή χρησιμοποιούν *υψηλού κόστους εξοπλισμό* ή *τοξικούς οργανικούς διαλύτες*^[85-88].

Η **ηλεκτροχημική προεπεξεργασία** ή **ενεργοποίηση** των 3D εκτυπωμένων ηλεκτροδίων περιλαμβάνει την εφαρμογή υψηλού ανοδικού δυναμικού (π.χ. +1,8 V για 200 s), ακολουθούμενο από την εφαρμογή υψηλού καθοδικού δυναμικού (π.χ. -

1,8 V για 200 s). Έχει αποδειχθεί ότι κατά την ανοδική πόλωση ηλεκτροδίων τύπου άνθρακα, το οξείδιο του γραφενίου και άλλες λειτουργικές ομάδες σχηματίζονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ενώ κατά την καθοδική πόλωση του, το ηλεκτροχημικά παραγόμενο οξείδιο του γραφενίου μετατρέπεται σε ηλεκτροενεργά ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου βελτιώνοντας περαιτέρω τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του ηλεκτροδίου. Τέλος, η ηλεκτροχημική ενεργοποίηση των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων απομακρύνει μέρος του πολυμερικού υλικού (πχ. PLA) από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αναδεικνύοντας στην επιφάνεια, τις ενεργές μορφές άνθρακα.

Η **χημική προεπεξεργασία** ή **μορφοποίηση** περιλαμβάνει τη χρήση διαλυτών όπως το *διμεθυλοφορμαμίδιο* (DMF), το *υδροξείδιο του νατρίου* (NaOH), ή η *ακετόνη*, που κατά κύριο λόγο καταστρέφουν το πολυμερικό υλικό. Επιπλέον, έχει εφαρμοστεί συνδυασμός χημικής μορφοποίησης και ηλεκτροχημικής ενεργοποίησης. Για παράδειγμα, γίνεται χρήση αλκαλικού ηλεκτρολύτη (π.χ. NaOH) και η εφαρμογή δυναμικού +1,4 V για 200 s, ακολουθούμενη από εφαρμογή καθοδικού δυναμικού -1,0 V για 200 s.

Η χημική μορφοποίηση απομακρύνει μερικώς το PLA, ενώ η ηλεκτροχημική ενεργοποίηση προκαλεί αλλαγές στη δραστική επιφάνεια του ηλεκτροδίου, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται τόσο η μεταφορά ηλεκτρονίων όσο και η αλληλεπίδραση του ηλεκτροδίου με τον αναλύτη^[89].

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται μερικοί ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες, οι οποίοι έχουν κατασκευαστεί μέσω της τεχνικής τρισδιάστατης εκτύπωσης, FDM:

Νημάτιο ¹	Μορφοποίηση ²	Επεξεργασία	Αναλύτης	Δείγμα	Τεχνική ³	LOD	Αναφορά
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση	Ντοπαμίνη Κατεχόλη	-	BIA-AMP SWV	0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$	85
C/ABS	-	-	Παρακεταμόλη Καφεΐνη	Φαρμακευτικά σκευάσματα & Ούρα	DPV	0,43 mg L^{-1} 0,39 mg L^{-1}	84
CNT/PLA CNT/PLA/Cu CNT/PLA/ZnO	-	-	H ₂ O ₂ K ₄ Fe(CN) ₆ NADH	-	CV	5,30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 1,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 2,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$	90
CB/PLA	Υμένιο Χρυσού	-	Hg ²⁺	Εμφιαλωμένο νερό και Έλαιο ψαριού	DPASV	0,52 $\mu\text{g L}^{-1}$	91
G/PLA	- Βισμούθιο	-	Cd ²⁺ Pb ²⁺ Hg ²⁺	-	SWASV	2,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ 4,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1,20 $\mu\text{g L}^{-1}$	92
CB/PLA	Υμένιο Χρυσού	-	Γλυκόζη	Ιδρώτας	CA	1,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	93
CB/PLA	-	-	Hg ²⁺ Καφεΐνη	-	SWASV DPV	1,90 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1,80 g L^{-1}	94
CNF/Graphite/PS	-	Μηχανική στίλβωση	Pb ²⁺	-	DPASV	-	95
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση	TNT	Επιφάνειες που περιέχουν TNT	SWV	0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	96
G/PLA	-	Θερμική	Πικρικό οξύ	-	CV	0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	86
CB/PLA	-	Εφαρμογή λέιζερ	Καφεΐνη	-	CV & DPV	0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	97
G/PLA	Χαλκός & Νικέλιο	Χημική	Γλυκόζη Σακχαρόζη Σεροτονίνη	- - Συνθετικά ούρα	CV & CA -/- DPV	- - 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$	98
G/PLA	-	Χημική	Πικρικό οξύ Ασκορβικό οξύ	-	CV	-	99
G/PLA	Πρωσσικό Μπλε	Ηλεκτροχημική	H ₂ O ₂	Στοματικό διάλυμα και Γάλα	BIA-AMP	0,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100
G/PLA	-	Ηλεκτροχημική	Ντοπαμίνη	-	DPV	0,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$	101
°CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Cd ²⁺ & Pb ²⁺ Παρακεταμόλη Ασκορβικό οξύ	-	SWASV BIA-AMP SWV	0,10 & 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$	102

ΚΟΥΚΟΥΒΙΤΗ ΕΛΕΝΗ

°CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Pb ²⁺ & Cu ²⁺	Αιθανόλη και Νερό βρύσης	SWASV	EtOH: 1,0 & 2,0 μg L ⁻¹ Νερό: 0,8 & 2,0 μg L ⁻¹	103
°CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	TNT	-	SWV	1,50 μmol L ⁻¹	104
CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Cu ²⁺	Βιοαιθανόλη	SWASV	0,10 μg L ⁻¹	105
Ni-G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Γλυκόζη	-	BIA-AMP	2,40 μmol L ⁻¹	106
CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Ντοπαμίνη Cd ²⁺ & Pb ²⁺	- Νερό βρύσης	SWV SWASV	0,10 μmol L ⁻¹ -	107
CB/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Cd ²⁺ Pb ²⁺	Ούρα και σάλιο	SWASV	2,90 μg L ⁻¹ 2,60 μg L ⁻¹	108
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Κοκαΐνη	-	SWV	6,00 μmol L ⁻¹	109
G/PLA	Πρωσσικό Μπλε	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	H ₂ O ₂	Γάλα	BIA-AMP	0,56 μmol L ⁻¹	110
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Χημική	Pb ²⁺ Sb ³⁺	Χέρια & Ρούχα ατόμων που έχουν χρησιμοποιήσει όπλο	SWASV	0,50 μg L ⁻¹ 1,80 μg L ⁻¹	111
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Χημική	Νιτρώδη Ιόντα Ουρικό οξύ	Ούρα και σάλιο	BIA-MPA	0,03 μmol L ⁻¹ 0,02 μmol L ⁻¹	112
G/PLA	-	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	L-μεθειονίνη	Ορός αίματος	SWV	1,39 μmol L ⁻¹	113
G/PLA	-	Χημική & Ηλεκτροχημική	Μυκοτοξίνη Ζεαραλενόνη	-	CV	0,34 μmol L ⁻¹	114
nG/PLA	-	Μηχανική στίλβωση	Μαγγάνιο	Εμφιαλωμένο νερό & Νερό βρύσης	DPCSV	0,0016 μmol L ⁻¹	115
G/PLA	-	Χημική & Ηλεκτροχημική	Ατροπίνη	Ποτά	SWV	1 μmol L ⁻¹	116
CB/PLA	[Fe ₃ O(PhCO ₂) ₆ (H ₂ O) ₃]-PhCO ₂	-	Γλυκόζη	Συνθετικός ιδρώτας	DPV	4,3 μmol L ⁻¹	59
CB/PLA	Fe(II)-MOF	-	Γλυκόζη	Συνθετικός ιδρώτας	DPV	17,6 μmol L ⁻¹	117

Πίνακας 3. Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι αισθητήρες μέσω της τεχνικής FDM. Όπου: «-»: δεν έχει υποστεί επεξεργασία ή εφαρμοστεί σε δείγμα.

Νημάτιο ¹	Μορφοποίηση ²	Επεξεργασία	Αναλύτης	Δείγμα	Τεχνική ³	LOD	Αναφορά
G/PLA	Οξειδάση L- αμινοξέος	-	Εναντιομερή αμινοξέων	-	EIS	10 μmol L ⁻¹	118
CB/PLA	Οξειδάση γλυκόζης	-	Γλυκόζη	-	CA	-	94
PLA	PEDOT/EtOH PEDOT/Aq	- Χημική	Ντοπαμίνη	-	CV, DPV & CA	198 μmol L ⁻¹ 129 μmol L ⁻¹	119
G/PLA	Αλκαλική φωσφατάση & Τυροσινάση	Χημική	Κατεχόλη	Νερό	SWV	0,26 μmol L ⁻¹	100
G/PLA	Υπεροξειδάση χρένου & Au-NPs	Χημική & Ηλεκτροχημική	H ₂ O ₂	Ανθρώπινος ορός	CA	9,1 μmol L ⁻¹	120
G/PLA	Οξειδάση γλυκόζης	Μηχανική στίλβωση & Χημική	Γλυκόζη	Πλάσμα αίματος	CA	15 μmol L ⁻¹	113
CB/PLA	EDC & NHS	Μηχανική στίλβωση & Ηλεκτροχημική	Χανταϊός	Ανθρώπινος ορός	CV & EIS	22 μg mL ⁻¹	121
G/PLA	Au-NPs/ Κυστεαμίνη/ Γλουταραλδεϋδη/ Κορονοϊός/πρωτεΐνη-ακίδα/ RBD	Χημική & Ηλεκτροχημική	Αντισώματα SARS-CoV-2	Ανθρώπινος ορός	CV & EIS	0,5 μg mL ⁻¹	122
CB/PLA	Οξειδάση χολίνης Οξειδάση χοληστερόλης	-	Χολίνη Χοληστερόλη	Συνθετικό αίμα	CA	0,08 mmol L ⁻¹ 3,36 mmol L ⁻¹	61
CB/PLA	Οξειδιο γραφενίου	Ηλεκτροχημική	Πρωτεΐνη N Πρωτεΐνη S _{RBD} anti-S _{RBD}	Σάλιο & Ανθρώπινος ορός	CV	5 pg mL ⁻¹ 1 pg mL ⁻¹ 0,1 pg mL ⁻¹	123
G/PLA	Οξειδάση γλυκόζης	Χημική & Ηλεκτροχημική	Γλυκόζη	Μηλίτης	CA	158 μmol L ⁻¹	124
G/PLA	Au-NPs	Χημική	cDNA του SARS-CoV-2	Συνθετικό σάλιο & Ανθρώπινος ορός	CV & SWV	0,3 μmol L ⁻¹	125
CB/PLA	STV-Cd/Se ZnS QDs	Χημική	<i>Salmonella typhimurium</i>	Έκπλυμα & ζωμός κότας	SWASV	β ₅ cfu mL ⁻¹	126
G/PLA	STV-Αλκαλική φωσφατάση	Χημική	Φωσφορικό ανιόν α- ναφθενικού οξέος	-	LSV	0,95 μg mL ⁻¹	127
G/PLA	Au-NPs	Χημική & Ηλεκτροχημική	Φιμπρονεκτίνη	Καρκινικά κύτταρα μαστού	EIS	-	128
G/PLA	EDC & NHS	Χημική & Ηλεκτροχημική	PARK7/DJ-1 πρωτεΐνη	Ανθρώπινος ορός & Συνθετικό εγκεφαλονωπιαίο υγρό	CV & EIS	1,01 μg L ⁻¹	129
CB/PLA	MWCNTs-Οξειδάση γλυκόζης	Χημική	Γλυκόζη	Ηπατοκύτταρα (HepG2) σε 3D υδρογέλες	CA	-	130

Πίνακας 4. Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι βιοαισθητήρες μέσω της τεχνικής FDM. Όπου: «-»: δεν έχει υποστεί επεξεργασία ή εφαρμοστεί σε δείγμα.

^αΤρισδιάστατα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο κατασκευασμένο με στυλό τρισδιάστατης εκτύπωσης.

^βCFU: Μονάδα σχηματισμού αποικίας.

¹**Νήμα:** CNF/Graphite/PS: ανθρακονήματα (carbon nanofibers)/γραφίτης/πολυστυρένιο, G/PLA: γραφένιο/πολυ(γαλακτικό οξύ), CB/PLA: αιθάλη(carbon black)/πολυ(γαλακτικό οξύ), C/ABS: Άνθρακας/συμπολυμερές ακρυλονιτριλίου βουταδιενίου στυρενίου, CNT/PLA: νανοσωλήνας άνθρακα (carbon nanotube)/πολυ(γαλακτικό οξύ), Ni-G/PLA: Ni(OH)₂ μικροσωματίδια ενσωματωμένα στο γραφένιο/πολυ(γαλακτικό οξύ), nG/PLA: νανογραφίτης/πολυ(γαλακτικό οξύ).

²**Μορφοποίηση:** Fe(II)-MOF: μεταλλο-οργανική κατασκευή σιδήρου (II), EDC: Υδροχλωρικό N-(3-Διμεθυλαμινοπροπυλ)-N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο, NHS: N-υδροξυηλεκτριμίδιο – άλας νατρίου, PEDOT/EtOH: πολυ(3,4-αιθυλενοδιοξυθειοφαίνιο) που λαμβάνεται με πολυμερισμό σε αιθανόλη, PEDOT/EtOH: πολυ(3,4-αιθυλενοδιοξυθειοφαίνιο) που λαμβάνεται με πολυμερισμό σε υδατικό διάλυμα, Au-NPs: νανοσωματίδια χρυσού, RBD (receptor binding domain): περιοχή δέσμευσης υποδοχέα, STV-Cd/Se ZnS QDs: στρεπταβιδίνη συζευγμένη με κβαντικές κουκίδες σεληνίου/καδμίου με σουλφίδιο του ψευδαργύρου, MWCNTs: νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος.

³**Τεχνική:** DPASV: διαφορική παλμική ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία, BIA-AMP: Ανάλυση συνεχούς προσθήκης (batch injection) με αμπερομετρική ανίχνευση, SWV: βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού, CV: κυκλική βολταμμετρία, SWASV: ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού, DPV: διαφορική παλμική βολταμμετρία, BIA-MPA: Ανάλυση συνεχούς προσθήκης (batch injection) με αμπερομετρική ανίχνευση πολλαπλού παλμού, DPCSV: διαφορική παλμική καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία, CA: χρονοαμπερομετρία, EIS: Ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης, LSV: βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΓΩΓΙΜΩΝ ΘΕΡΜΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ

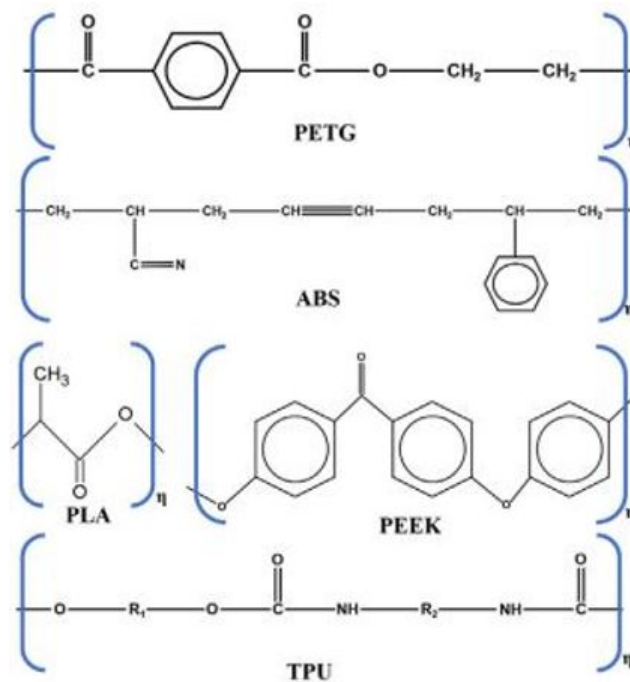
Το πιο διαδεδομένο εμπορικό αγώγιμο θερμοπλαστικό νημάτιο που εφαρμόζεται στην 3D εκτύπωση ηλεκτροχημικών αισθητήρων, είναι αυτό της εταιρίας Protopasta. Το νήμα αυτό αποτελείται από το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA > 65 % κ.β.), που λειτουργεί ως βάση, έναν πλαστικοποιητή (< 12,7 % κ.β.), και αιθάλη (CB < 21,43 % κ.β.), που λειτουργεί ως το αγώγιμο πληρωτικό υλικό^[131-133]. Η επόμενη γενιά των FDM 3D εκτυπωμένων αισθητήρων θα μπορούσε να βασιστεί σε αγώγιμα νημάτια κατασκευασμένα εντός του εργαστηρίου, διαθέτοντας προηγμένα λειτουργικά χαρακτηριστικά. Οι ιδιότητες αυτές θα μπορούν να είναι η *βιοαποικοδομησιμότητα*, η *ικανοποιητική αγώγιμη συμπεριφορά* ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλή απόδοση, η *απουσία απαίτησης μετεκτυπωτικής επεξεργασίας* ή/και *μορφοποίησης*, επιτρέποντας την κατασκευή αισθητήρων έτοιμων προς χρήση.

5.1 Θερμοπλαστικό

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, το PLA αποτελεί το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο **θερμοπλαστικό** για την FDM εκτύπωση, κυρίως λόγω της *χαμηλής θερμοκρασίας εκτύπωσης*, καθώς και λόγω της *βιοαποικοδομησιμότητάς* του, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι άλλων πολυμερών για την προσθετική κατασκευή^[131]. Το ABS είναι ένα ακόμη ευρέως χρησιμοποιούμενο θερμοπλαστικό. Έχει ευρεία εφαρμογή, όπως *αμαξώματα αυτοκινήτων* και *οικιακές συσκευές*, λόγω της *υψηλής αντοχής* του σε *κρούση*, της *δυσκαμψίας*, της *εξαιρετικής ποιότητας επιφάνειας*, της *σταθερότητας σε υψηλές θερμοκρασίες*, της *χημικής αντίστασης*, της *ικανοποιητικής ρηγμάτωσης υπό πίεση*^[134].

Η *γλυκόλη τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου* (PETG) είναι μια *γλυκοζυλιωμένη μορφή* τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου και χρησιμοποιείται συνήθως σε *συσκευασίες τροφίμων*. Έχει λάβει ευρεία χρήση στην FDM λόγω της *ευκολίας εκτύπωσης* αλλά και της *υψηλής χημικής και θερμικής αντίστασης* και *αντοχής*, που είναι συγκρίσιμες με αυτές του PLA^[135]. Άλλα θερμοπλαστικά είναι το *πολυπροπυλένιο* (PP), η *θερμοπλαστική πολουρεθάνη* (TPU), οι *πολυαρυλαιθερκετόνες* (PAEK) και τα *πολυαιθεριμίδια*, που είναι πλέον διαθέσιμα στο εμπόριο ως νήματα. Το Σχήμα 25

απεικονίζει τα μονομερή τμήματα των μορίων, για ορισμένα από τα θερμοπλαστικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή νήματος κατάλληλου για FDM εκτύπωση^[131].



Σχήμα 25. Χημική δομή ορισμένων κοινών θερμοπλαστικών που χρησιμοποιούνται στην προσθετική κατασκευή, όπου **PETG**: γλυκόλη τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου, **ABS**: ακρυλονιτρίλιο βουταδιένιο στυρένιο, **PLA**: πολυ(γαλακτικό οξύ), **PEEK**: κετόνη πολυ(αιθέρα-αιθέρα) και **TPU**: θερμοπλαστική πολυουρεθάνη^[131].

5.2 Πλαστικοποιητής

Η Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) έχει υιοθετήσει τον ακόλουθο ορισμό: «**Πλαστικοποιητής** είναι μια ουσία ή ένα υλικό που ενσωματώνεται σε ένα άλλο υλικό (συνήθως πλαστικό ή ελαστομερές) για να αυξήσει την *ευκαμψία*, τη *λειτουργικότητα*, ή την *ελαστικότητά* του»^[136].

Οι πλαστικοποιητές είναι μη πτητικά υγρά ή, σε σπάνιες περιπτώσεις, στερεά, που πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

- Να έχουν μοριακό βάρος άνω των 300 g mol⁻¹,
- Να έχουν παρόμοια παράμετρο διαλυτότητας με το πολυμερές,
- Να είναι ικανά για ειδικές αλληλεπιδράσεις με το πολυμερές, εάν αυτό τείνει να κρυσταλλώνει, και

- ο Να μην είναι κρυσταλλικό στερεό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εκτός εάν είναι ικανό για ειδική αλληλεπίδραση με το πολυμερές^[137].

Η *ευκαμπτότητα* είναι ζωτικής σημασίας ιδιότητα του θερμοπλαστικού νήματος για την FDM τεχνική, ειδικά στην περίπτωση των αγώγιμων νημάτων, όπου η παρουσία του αγώγιμου υλικού προκαλεί στο νήμα σημαντική σκλήρυνση και το νήμα γίνεται *εύθραυστο*. Η *ευθραυστότητα* του νήματος μπορεί να οδηγήσει σε *θραύση* σε πολλά σημεία κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης και να καταστρέψει το τελικό προϊόν. Για να βελτιωθεί η εκτυπωτική ικανότητα του νήματος, όταν ενσωματώνονται αγώγιμα πληρωτικά υλικά, γίνεται προσθήκη πλαστικοποιητών^[131]. Τον πιο εφαρμοσμένο πλαστικοποιητή για PLA αποτελεί η *πολυαιθυλενογλυκόλη* (PEG). Για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί PEG σε ποσοστό 16,6 – 21 % κ.β. για την παραγωγή νημάτων με βάση το PLA, τα οποία ενσωματώνουν υψηλή ποσότητα *γραφήτη* (> 35 % κ.β.) ως αγώγιμο πληρωτικό υλικό. Στο νήμα αυτό προστέθηκε και *σουλφίδιο του μολυβδαινίου* (MoS₂) ως λειτουργικό υλικό και χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτρολυτική παραγωγή υδρογόνου. Επίσης, 10 % κ.β. PEG έχει εφαρμοστεί ως πλαστικοποιητής σε νήμα PLA (67,5 % κ.β.) που περιείχε 26 % κ.β. *αιθάλη*^[138]. Άλλοι πλαστικοποιητές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή αγώγιμων PLA νημάτων είναι το *καστορέλαιο*, ο *διμεθυλαιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης* (PEG/DME) κ.α.^[139].

5.3 Αγώγιμο υλικό πλήρωσης

Η παραγωγή αγώγιμων νημάτων πραγματοποιείται συνήθως με ανάμιξη *πολυμερούς* με **ηλεκτρικά αγώγιμα σωματίδια**, όπως υλικά με βάση τον *άνθρακα*, *μέταλλα* ή *αγώγιμα πολυμερή*, σχηματίζοντας έτσι ένα αγώγιμο σύνθετο υλικό. Εκτός από την *ηλεκτρική αγωγιμότητα*, οι εγγενείς ιδιότητες των συστατικών επηρεάζουν άμεσα τις άλλες ιδιότητες του νήματος, συμπεριλαμβανομένων των *μηχανικών* και *θερμικών ιδιοτήτων*, καθώς και των *φυσικών ιδιοτήτων*^[140,141].

Οι μηχανικές ιδιότητες ενός νήματος (δηλαδή η *αντοχή*, ο *συντελεστής Γιανγκ* και η *σκληρότητα*) εξαρτώνται από τις μηχανικές ιδιότητες του βασικού πολυμερούς και του πληρωτικού υλικού, καθώς και από την αναλογία του καθενός στο νήμα^[142]. Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης είναι πιο ανθεκτικά από μηχανική άποψη από την πολυμερική μήτρα και ως εκ τούτου μπορούν να ενισχύσουν μηχανικά το τελικό αγώγιμο θερμοπλαστικό. Ωστόσο, αυξάνεται σημαντικά η *ευθραυστότητα* του υλικού,

οπότε πρέπει να ληφθεί ιδιαίτερη μέριμνα στο ποσοστό του αγώγιμου υλικού μέσα στο πολυμερές και στη χρήση πλαστικοποιητή, ώστε τα παραγόμενα νήματα να είναι αρκετά εύκαμπτα και να μπορούν να τυλίγονται και να τροφοδοτούνται στο ακροφύσιο του εκτυπωτή, χωρίς να σπάνε^[143]. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί υλικά με βάση τον άνθρακα, όπως γραφίτης, αιθάλη, γραφένιο, νανοσωλήνες και νανοϊνες άνθρακα^[144-146]. Η προσθήκη ποσοτήτων πληρωτικού υλικού τύπου άνθρακα σε PLA μέχρι 30 % κ.β. παρουσία 10-15% κ.β. πλαστικοποιητή οδηγεί σε νήματα με καλή εκτυπωτική ικανότητα.

5.4 Σύνθεση νήματος

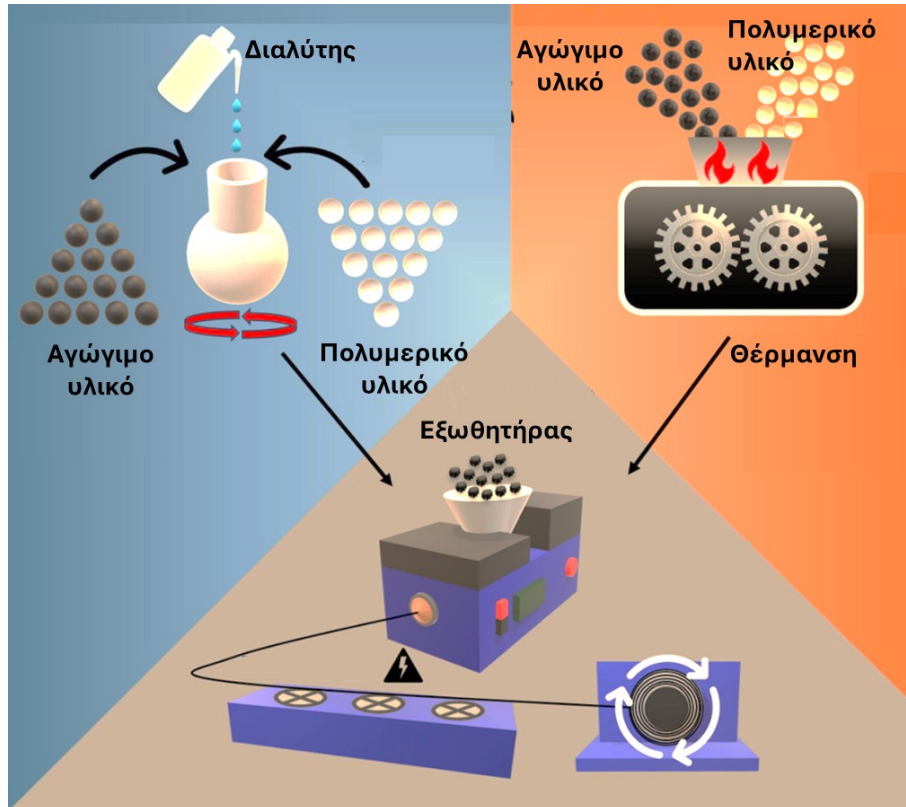
Για τη σύνθεση αγώγιμων νημάτων υπάρχουν δύο τεχνικές: η μία βασίζεται στη διαλυτοποίηση του θερμοπλαστικού (π.χ. PLA) σε διαλύτες και την ανάμιξή του με το αγώγιμο πληρωτικό υλικό, ενώ η δεύτερη στηρίζεται στη θερμική τήξη του πολυμερικού υλικού και την προσθήκη του αγώγιμου πληρωτικού υλικού (Σχήμα 26).

Ως διαλύτες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν η ακετόνη, το ξυλόλιο, η Ν-μεθυλοπυρρολιδόνη, το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο κ.ά. Στη μέθοδο αυτή, το πολυμερές διαλύεται για να δημιουργηθεί ένα σχετικά αραιό διάλυμα, όπου μπορεί εύκολα να κατανεμηθεί το αγώγιμο πληρωτικό υλικό. Κατά την απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση και ξήρανση, σχηματίζεται το αγώγιμο θερμοπλαστικό φιλμ. Γενικά, η διάλυση του πολυμερούς είναι αργή, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θέρμανση για την επιτάχυνση της διαδικασίας. Η ανάδευση των διαλυμάτων είναι απαραίτητη για την επιτυχή διάλυση του πολυμερούς, την παροχή ομοιογενούς μίγματος και τη μείωση της συσσωμάτωσης των σωματιδίων.

Από την άλλη πλευρά, η θερμική μέθοδος στηρίζεται στη θέρμανση και τήξη του πολυμερούς, ενώ ταυτόχρονα ενσωματώνεται το αγώγιμο πληρωτικό υλικό. Η θερμική μέθοδος δεν απαιτεί τη χρήση επικίνδυνων διαλυτών, καθιστώντας την πιο φιλική προς το περιβάλλον, ωστόσο, απαιτεί εξελεγμένο και δαπανηρό εξοπλισμό και κατανάλωση ενέργειας. Η μέθοδος με βάση τους διαλύτες παραμένει μία από τις πιο ρεαλιστικές και πρακτικές επιλογές που μπορούν να αξιοποιηθούν από τα εργαστήρια.

Για την παραγωγή ομοιόμορφων νημάτων με συγκεκριμένη διάμετρο συνήθως 1,75 mm, τα φιλμ του αγώγιμου πολυμερικού υλικού τοποθετούνται σε εξωθητήρα. Στο στάδιο της εξώθησης, η διαδικασία αρχίζει με την εισαγωγή στον εξωθητήρα, του σύνθετου αγώγιμου πολυμερούς, που πρώτα έχει κοπεί σε μικρά κομμάτια. Στον

εξωθητήρα αναπτύσσεται θερμοκρασία ημιρρευστοποίησης του αγώγιμου πολυμερούς που με τη βοήθεια ελικοειδή κοχλία, το υλικό εξωθείται από μεταλλική κεφαλή συγκεκριμένης διαμέτρου ως καρούλι. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται διάφορα αγώγιμα νήματα που έχουν συντεθεί για 3D εκτύπωση ηλεκτροδίων με FDM.



Σχήμα 26. Διαδικασία σύνθεσης αγώγιμων πολυμερικών νημάτων με χρήση διαλύτη και με χρήση θέρμανσης^[131].

Πολυμερές ¹	Υλικό πλήρωσης ²	Πρόσθετο ³	Μέθοδος ⁴	Χρόνος κατασκευής	Αναλύτης	Αναφορά
PLA	NG (25 % κ.β.)	-	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – ξυλόλιο	6 ώρες & ξήρανση	Pb ²⁺ , Cd ²⁺	147
PLA	Γραφένιο & Ni(OH) ₂ (10 % κ.β.)	-	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – ACN & CHL	-	Γλυκόζη	148
PLA	Γραφίτης (40 % κ.β.)	-	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – ACN & CHL	3,5 ώρες & 12 ώρες ξήρανση	SARS-CoV-2 S1 πρωτεΐνη-ακίδα	149
PLA	CB (28,5 % κ.β.)	-	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – ACN & CHL	3,2 ώρες & 12 ώρες ξήρανση	H ₂ O ₂	131
PI-PLA	CB (29,6 % κ.β.)	PES	Τήξη μίγματος	0,17 ώρες & ψύξη	Καφεΐνη	146
rPLA	CB (25 % κ.β.)	-	Τήξη μίγματος	-	Παρακεταμόλη	150
rPLA	CB (15 % κ.β.) & CNTs (10 % κ.β.)	PES	Τήξη μίγματος	-	cDNA ιού του κίτρινου πυρετού	151
rPLA	CB (25 % κ.β.)	Καστορέλαιο	Τήξη μίγματος	-	Δισφαινόλη Α	139
PLA	CB (28,5 % κ.β.)	-	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – ACN & CHL	3 ώρες & 12 ώρες ξήρανση	SARS-CoV-2 S1 πρωτεΐνη-ακίδα	152
rPLA	CB (15 % κ.β.) & NG (10 % κ.β.)	-	Τήξη μίγματος	-	Οξαλικό ανιόν	153
PLA	CB (27,5 % κ.β.), Bi (7,5% κ.β.), Cu (2,5% κ.β.)	PEG	Διαλυτοποίηση σε διαλύτη – DCM	3 ώρες & 12 ώρες ξήρανση	Cd ²⁺ Pb ²⁺ Ουρικό οξύ Γλυκόζη	154

Πίνακας 5. Νήματα ιδιοκατασκευής για 3D εκτύπωση ηλεκτροχημικών αισθητήρων με FDM.

¹**Πολυμερές:** PLA: πολυ(γαλακτικό οξύ), PI-PLA: μεταβιομηχανικό απόβλητο πολυ(γαλακτικού οξέος) από μηχανή καφέ, rPLA: ανακυκλωμένο πολυ(γαλακτικό οξύ).

²**Υλικό πλήρωσης:** NG: νανογραφίτης, Ni(OH)₂: οξειδίο του νικελίου, CB: αιθάλη, CNTs: νανοσωλήνες άνθρακα, Bi: Bi₂O₃ μικροσωματίδια ενσωματωμένα στην αιθάλη/πολυ(γαλακτικό οξύ), Cu: CuO μικροσωματίδια ενσωματωμένα στην αιθάλη/πολυ(γαλακτικό οξύ).

³**Πρόσθετο:** PES: πολυ(ηλεκτρικό αιθυλένιο), PEG: πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη).

⁴**Μέθοδος:** ACN: ακετόνη, CHL: χλωροφόρμιο, DCM: διχλωρομεθάνιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

6.1 Γλυκόζη

Η **γλυκόζη** είναι το πιο απλό είδος υδατάνθρακα, ή αλλιώς ένας μονοσακχαρίτης, που βρίσκεται κατά κύριο λόγο στα φρούτα, στο μέλι και τη ζάχαρη αλλά και σε αμυλούχα τρόφιμα (ψωμί, ρύζι, πατάτα και ζυμαρικά). Στα τρόφιμα αυτά υπάρχει είτε άμεσα ως μόριο γλυκόζης είτε έμμεσα ως προϊόν καταβολισμού, κατά τη διαδικασία πέψης των δισακχαριτών και πολυσακχαριτών, που περιέχονται στα αμυλούχα τρόφιμα.

Εφόσον εισέλθει η γλυκόζη στον οργανισμό μέσω της τροφής, απορροφάται από το λεπτό έντερο και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στον εγκέφαλο και στα υπόλοιπα όργανα. Έπειτα, είτε χρησιμοποιείται άμεσα από τα κύτταρα είτε αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου στο ήπαρ και στους μύες.

Η γλυκόζη αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας του ανθρώπινου οργανισμού. Μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης αρχικά, και άλλων βιοχημικών αντιδράσεων στη συνέχεια, η γλυκόζη οξειδώνεται και σχηματίζει διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ παράγεται ταυτόχρονα ενέργεια για τον οργανισμό. Επιπλέον, η γλυκόζη είναι η αποκλειστική πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο. Αυτό σημαίνει ότι ο εγκέφαλος δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει άλλες πηγές ενέργειας (π.χ. λίπος, πρωτεΐνες), όπως το υπόλοιπο σώμα και εξαρτάται κατά αποκλειστικότητα από τη γλυκόζη^[155].

Σε υγιή άτομα, μέσω ενός αξιοσημείωτου δικτύου ανάμεσα στο πάγκρεας, το ήπαρ, τους μύς και τον εγκέφαλο, το σώμα διατηρεί τα απαραίτητα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η διατήρηση της *ευγλυκαιμίας* (φυσιολογικό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα) είναι σπουδαία για την ακεραιότητα των πρωτεϊνών σε όλο το σώμα. Η *υπογλυκαιμία* μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιωμένες καταστάσεις συνείδησης, σύγχυση, τρέμουλο και άλλες νευρολογικές διαταραχές και να επιφέρει το θάνατο, ενώ η παρατεταμένη *υπεργλυκαιμία*, μπορεί να δημιουργήσει στο άτομο αίσθημα κόπωσης, θολή όραση, πονοκέφαλο και έντονη δίψα. Η χρόνια υπεργλυκαιμία ή αλλιώς *διαβήτης* οδηγεί σε υπερβολική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, αλλάζοντας τη δομή και λειτουργία τους, το οποίο τελικά επηρεάζει κάθε σύστημα οργάνων στο σώμα^[155-158].

Η επιτακτική ανάγκη για μια ταχεία, αξιόπιστη παρακολούθηση της *γλυκόζης* έχει γίνει μια εξελισσόμενη υπόθεση τα τελευταία χρόνια στις *βιομηχανίες τροφίμων*, τη *βιοϊατρική* και την *κλινική διάγνωση*. Η ύψιστη αναγκαιότητα φυσικά, προκύπτει από

το σακχαρώδη διαβήτη. Ο διαβήτης είναι μία χρόνια ασθένεια, που σκοτώνει έναν κολοσσιαίο αριθμό ανθρώπων κάθε χρόνο ενώ παράλληλα οδηγεί και σε διάφορες άλλες παθήσεις, όπως νεφρική ανεπάρκεια, εγκεφαλικά, τύφλωση.

Η πρωταρχική αιτία πρόκλησης του διαβήτη, μπορεί να είναι είτε επειδή η παραγωγή της ινσουλίνης στο πάγκρεας είναι ανεπαρκής (*διαβήτης τύπου I*), είτε μη αποτελεσματική (*διαβήτης τύπου II*). Άλλοι παράγοντες όπως η *κληρονομικότητα*, ο *τρόπος ζωής*, η *διατροφή* και *ιογενείς αιτίες*, μπορεί επίσης να γίνουν υπεύθυνοι για το διαβήτη. Η *ινσουλίνη* καταρχήν, είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της *γλυκόζης* (ή του σακχάρου στο αίμα), σε *γλυκογόνο*. Αν η ινσουλίνη δεν μπορεί να λειτουργήσει κατάλληλα, προκαλείται συσσώρευση γλυκόζης στο αίμα. Η διατήρηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικό εύρος συγκεντρώσεων (δηλαδή $< 100 \text{ mg dL}^{-1}$ σε νηστικό άτομο), είναι η στρατηγική «κλειδί» προκειμένου να σωθούν ζωές και να αποφευχθούν οι συσχετιζόμενες ασθένειες, που προκαλεί ο διαβήτης.

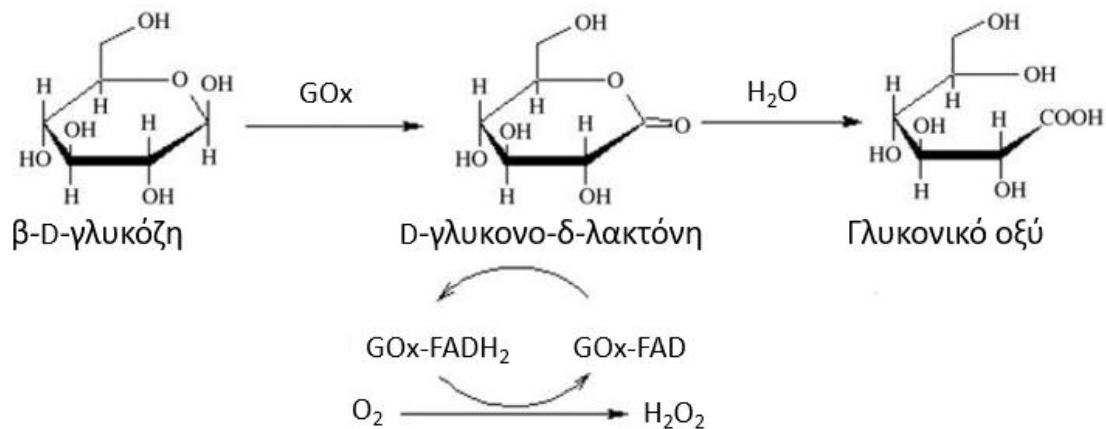
Συνεπώς, είναι εξαιρετικά ουσιώδες να αναπτυχθούν σαφείς και ακριβείς μετρήσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης στα εκκρίματα του ανθρώπινου σώματος, χρησιμοποιώντας *χαμηλού κόστους*, *απλές* και *φορητές συσκευές*. Η πρόκληση αυτή έχει οδηγήσει σε πολυάριθμες έρευνες και καινοτομίες, που παρέχουν ποικίλες μεθόδους για τον προσδιορισμό της γλυκόζης: μέθοδοι *φθορισμού*, *χρωματομετρίας*, *χρωματογραφίας*, *οπτικές*, *ακουστικές* και *ηλεκτροχημικές*.

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι αν και η πλειονότητα των εμπορικά διαθέσιμων ηλεκτροχημικών αισθητήρων γλυκόζης, απαιτούν μια μικρή ποσότητα αίματος (1μL) για τις μετρήσεις, το δείγμα τυπικά λαμβάνεται από το σώμα είτε με τσίμπημα του δακτύλου, είτε με ένα λεπτό έλασμα εμφυτευμένο υποδόρια. Και οι δυο περιπτώσεις είναι επεμβατικές, προκαλούν ενόχληση και πόνο ύστερα από επαναλαμβανόμενη χρήση, και μπορούν να θέσουν τον ασθενή σε κινδύνους πιθανής λοίμωξης ή να προκαλέσουν ιστική βλάβη. Για το σκοπό αυτό, υπάρχει μια συνεχής προσπάθεια για την ανάπτυξη *μη-επεμβατικών* ή ελάχιστα επεμβατικών αισθητήρων γλυκόζης είτε τροποποιώντας την υπάρχουσα τεχνολογία και τις συσκευές, είτε χρησιμοποιώντας δείγματα διαφορετικά από το αίμα (π.χ. σωματικά υγρά, όπως *ιδρώτας*, *δάκρυα*, *σάλιο*, *ούρα*)^[67,68].

Η πλειονότητα των βιοαισθητήρων γλυκόζης βασίζεται στην **οξειδάση της γλυκόζης** (*Glucose Oxidase – GOx*). Η GOx έχει απομονωθεί από ένα εύρος διαφόρων πηγών μυκήτων, κυρίως από τα γένη *Aspergillus Niger* και *Penicillium*, από τα οποία το *A. Niger* είναι το συνηθέστερο για την παραγωγή GOx, όμως η GOx που

προέρχεται από το είδος *Penicillium*, έχει δείξει περισσότερο επωφελή κινητική για την οξειδωση της γλυκόζης.

Η GOx είναι μία *φλαβοπρωτεΐνη*, η οποία καταλύει την οξειδωση της β -D-γλυκόζης σε D-γλυκονο- δ -λακτόνη και H_2O_2 , χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η αντίδραση μπορεί να διαιρεθεί σε ένα αναγωγικό και ένα οξειδωτικό στάδιο (Σχήμα 27). Στο αναγωγικό στάδιο, η GOx καταλύει την οξειδωση της β -D-γλυκόζης σε D-γλυκονο- δ -λακτόνη, η οποία υδρολύεται μη-ενζυματικά σε γλυκονικό οξύ. Ακολούθως, το «δαχτυλίδι» φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (*Flavine Adenine Dinucleotide – FAD*) του GOx, ανάγεται στην ανηγμένη του μορφή: $FADH_2$. Στο οξειδωτικό στάδιο, το ανηγμένο ένζυμο GOx επαναοξειδώνεται από το O_2 για να παραχθεί H_2O_2 ^[159].



Σχήμα 27. Αναπαράσταση της αντίδρασης του ενζύμου GOx^[159].

6.2 Χολίνη

Η **χολίνη**, γνωστή επίσης ως **βιταμίνη B₄** (τριμεθυλ- β -υδροξυαιθυλο-αμμώνιο), συντίθεται από τον οργανισμό μας και με βάση το Ινστιτούτο της Ιατρικής το 1998, θεωρείται επισήμως ως ζωτικής σημασίας θρεπτικό συστατικό, το οποίο λαμβάνεται από την καθημερινή μας διατροφή για την διατήρηση των σωματικών λειτουργιών. Στη διατροφή μας μπορεί να βρίσκεται ως *ελεύθερη χολίνη*, *σφιγγομυελίνη*, *φωσφατιδυλοχολίνη*, *φωσφοχολίνη* ή *γλυκερο-φωσφοχολίνη*. Η χολίνη και τα παράγωγά της παίζουν σπουδαίο ρόλο σε διάφορες λειτουργίες: π.χ. *κυτταρο-μεμβρανική σηματοδότηση*, *μεταφορά λιπιδίων*, *ηπατική και μυϊκή λειτουργία* και ως *πρόδρομο μόριο* για την *ακετυλοχολίνη*, που είναι ένας νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό

νευρικό σύστημα και συμμετέχει στη μεταφορά του σήματος μεταξύ νεύρων, μυών και οργάνων^[160].

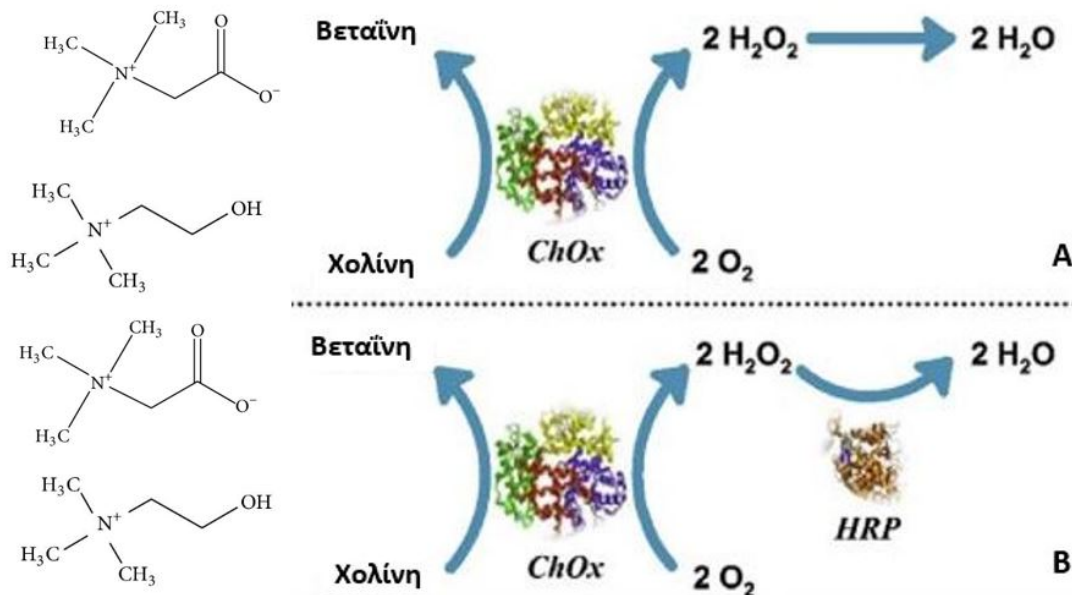
Με βάση τις εκτιμώμενες ημερήσιες προσλήψεις και μελέτες, η κατάλληλη πρόσληψη για τη χολίνη, έχει τεθεί σε εύρη από 125mg/ημέρα σε βρέφη έως 425mg/ημέρα για γυναίκες ηλικίας 19 ετών και άνω, και 550mg/ημέρα για άντρες ηλικίας 19 ετών και άνω^[161]. Η έλλειψη χολίνης μπορεί να αλλοιώσει το προφίλ μεθυλίωσης του DNA. Αυτή η μεταβολή μπορεί να επηρεάσει μία άλλη σημαντική διαδικασία, όπου οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τα γονίδια, που σχετίζονται με τη μάθηση και την πορεία της μνήμης^[162]. Συνεπώς, η ανεπάρκεια στη χολίνη μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο πρόκλησης νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως οι νόσοι *Alzheimer* και *Parkinson*^[163]. Αλλαγές στο επίπεδο της χολίνης και ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός της, μπορούν επίσης να ληφθούν ως ένας πρώιμος δείκτης *οξείας στεφανιαίας νόσου* και διαφόρων ειδών *καρκίνου*^[164-166]. Επομένως, η χολίνη έχει καθιερωθεί ως ένας νέος μεταβολικός βιοδείκτης για τον πρόωρο εντοπισμό ασθενειών^[167].

Ως εκ τούτου, είναι πλέον αναγκαίο να αναπτυχθούν αξιόπιστες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση της χολίνης τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στις κλινικές και βιολογικές αναλύσεις. Πολυάριθμα είδη μεθόδων έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της χολίνης: *υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC)*, *υγρή χρωματογραφία/φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – LC/MS)*, *ιοντική χρωματογραφία, έμμεση ανίχνευση υπεριώδους απορρόφησης, αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC)* και *τριχοειδής ηλεκτροφόρηση*^[168-172]. Ωστόσο, η πλειονότητα των παραπάνω μεθόδων απαιτούν *εντατικό εργαστήριο*, είναι *ακριβές* και *χρονοβόρες*^[160].

Ως η πιο υποσχόμενη μέθοδος για την παρακολούθηση της χολίνης, έχει αναδειχθεί ο βιοαισθητήρας που βασίζεται στην **οξειδάση της χολίνης (Choline oxidase – ChOx)** χάρη σε ποικίλα πλεονεκτήματα, όπως *ευκολία*, *υψηλή ευαισθησία*, *ταχεία απόκριση* και *χαμηλό κόστος*^[173]. Η ChOx καταλύει σε δύο στάδια, την 4-ηλεκτρονίων οξειδωση της χολίνης μέσω FAD, σε *βεταΐνη της γλυκίνης*. Το ένζυμο απομονώθηκε αρχικά το 1948, από το ήπαρ ποντικίου για να μελετηθεί η επίδραση, που έχουν οι υπερίτες του αζώτου στα ένζυμα και στον ιστικό μεταβολισμό. Ο πρώτος *in vitro* χαρακτηρισμός καθαρής οξειδάσης της χολίνης από *Arthrobacter globiformis*, πραγματοποιήθηκε από τον Ikuta και συναδέλφους, το 1977^[174].

Η πλειονότητα των βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό χολίνης, βασίζονται σε *μονο-ενζυμικά* συστήματα^[175,176]. Ένας άλλος τύπος βιοαισθητήρα χολίνης

βασίζεται στην συν-ακινητοποίηση οξειδάσης της χολίνης και υπεροξειδάσης [π.χ. υπεροξειδάση του χρένου – (*horseradish peroxidase* – *HRP*)] στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για να κατασκευαστούν δι-ενζυμικοί βιοαισθητήρες, που είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την ενίσχυση του σήματος και της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα (Σχήμα 28)^[160,177-179].



Σχήμα 28. Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων χολίνης: A) Μονο-ενζυμικό, B) Δι-ενζυμικό σύστημα^[160].

6.3 Χοληστερόλη

Η **χοληστερόλη** είναι μία *στερόλη* που βιοσυντίθεται σε όλα τα ζωικά κύτταρα, καθώς αποτελεί ένα βασικό δομικό συστατικό όλων των κυτταρικών μεμβρανών των ζώων. Πέρα από αυτό, η χοληστερόλη χρησιμεύει ως πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση των *στεροειδών ορμονών*, του *χολικού οξέος* και της *βιταμίνης D*. Η χοληστερόλη μεταφέρεται στο αίμα μέσω μορίων, που καλούνται *λιποπρωτεΐνες*. Η *λιποπρωτεΐνη* είναι ένα σύμπλεγμα, που απαρτίζεται από λιπίδια και πρωτεΐνες, και διακρίνεται σε τρεις τύπους:

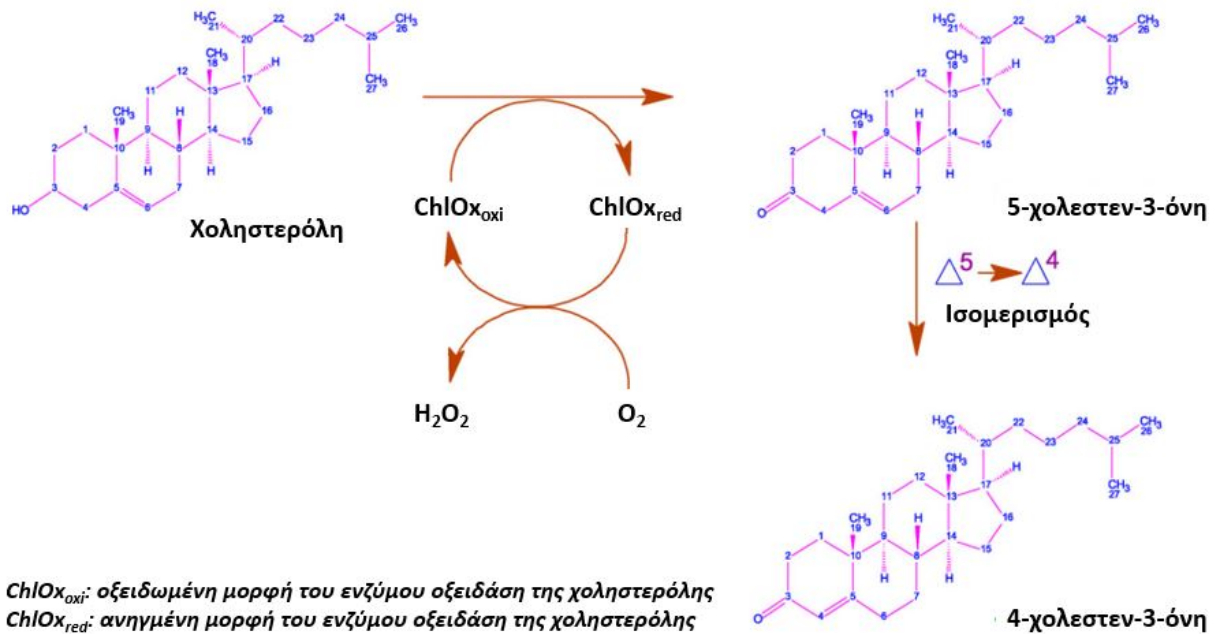
- **Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη** (*Low Density Lipoprotein* – **LDL**). Η LDL είναι γνωστή επίσης ως «κακή» χοληστερόλη. Λειτουργεί ως μεταφορέας της χοληστερόλης από το ήπαρ σε διάφορα κύτταρα του σώματος.
- **Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη** (*High Density Lipoprotein* – **HDL**). Η HDL αναφέρεται και ως «καλή» χοληστερόλη. Μεταφέρει τη χοληστερόλη από

τα κύτταρα πίσω στο ήπαρ. Μέσα στο ήπαρ είτε καταστρέφεται ή αποβάλλεται από το σώμα ως άχρηστη.

- ο **Τριγλυκερίδια** (*Triglycerides – TG*). Η διατροφή, που λαμβάνουμε, εφόσον δεν έχει αφομοιωθεί από το σώμα μας, μετατρέπεται σε TG και αποθηκεύεται στα λιποκύτταρα. Οποτεδήποτε είμαστε νηστικοί, τα TG ελευθερώνονται από τα λιποκύτταρα και χρησιμεύουν ως πηγή ενέργειας^[180-186].

Το επίπεδο της χοληστερόλης στον ορό είναι ύψιστου ενδιαφέροντος, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο για την διάγνωση και θεραπεία *καρδιαγγειακών παθήσεων, υποθηρεοειδισμού, νεφρωσικού συνδρόμου, διαβήτη και ηπατικών ασθενειών*. Η σύνθεσή της στο σώμα ρυθμίζεται άμεσα από τα παρόντα επίπεδα χοληστερόλης. Η υψηλότερη λήψη της οδηγεί σε καθαρή πτώση της ενδογενούς παραγωγής της, ενώ η χαμηλότερη λήψη έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Συνεπώς, διάφορες μέθοδοι είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στον ορό, όπως *χρωματογραφία, χρωματομετρία, ενζυμική χρωματομετρία, φασματοφωτομετρία, μικροφωτομετρία και ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες*^[180,187-197]. Στο Σχήμα 29 απεικονίζεται η πορεία αντίδρασης που λαμβάνει χώρα σε έναν βιοαισθητήρα χοληστερόλης, μέσω του ενζύμου **οξειδάση της χοληστερόλης** (*Cholesterol Oxidase – ChlOx*)^[198].

Η ChlOx είναι ένα μονομερές δι-λειτουργικό ένζυμο που περιέχει FAD (φλαβο-ένζυμο) και ανήκει στις *οξειδοοξειδοκτάσες*, συγκεκριμένα σε εκείνες που δρουν στην CH-OH ομάδα δότη με το οξυγόνο ως αποδέκτη. Η ChlOx καταλύει την οξείδωση της *χοληστερόλης* και τον ισομερισμό του ενδιάμεσου *5-χολεστεν-3-όνη* για να παραχθεί *4-χολεστεν-3-όνη*. Η ChlOx αρχικά, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από το γένος *Rhodococcus Erythropolis*. Αργότερα, βρέθηκε να παράγεται από πολλά βακτήρια, θετικά και αρνητικά κατά Γκραμ, όμως τα *Actinomycetes* υπάγονται στα περισσότερο παραγωγικά για ChlOx-ομάδες^[199].



Σχήμα 29. Πορεία αντίδρασης του ενζύμου οξειδάση της χοληστερόλης.

6.4 Αιθανόλη

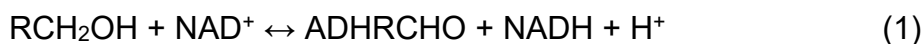
Η ακριβής και ταχεία μέτρηση της **αιθανόλης** είναι πολύ σημαντική στην *κλινική και ιατροδικαστική ανάλυση*, για να αναλυθούν ανθρώπινα βιολογικά δείγματα, όπως *αίμα, ορός, σάλιο, ούρα, αναπνοή και ιδρώτας*, εκτός των άλλων. Τα τρόφιμα, ποτά (*οίνος, μπίρα και οινοπνευματώδη*) και βιομηχανίες χαρτοπολτού απαιτούν εύκολες, γρήγορες και οικονομικές αναλυτικές μεθόδους για να ελέγχονται οι διαδικασίες ζύμωσης και η ποιότητα των επ' αυτών προϊόντων^[200,201].

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί στην διάρκεια των χρόνων για τον προσδιορισμό της αιθανόλης και άλλων αλειφατικών αλκοολών, όπως μεθανόλη. Αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση χημικών μεθόδων όπως: *χρωματομετρικές μέθοδοι, οξειδοαναγωγικές τιτλοδοτήσεις, μετρήσεις ειδικού βάρους και δείκτη διάθλασης, χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι, και ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες*.

Δύο ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον προσδιορισμό αλκοολών: η **οξειδάση της αλκοόλης (Alcohol Oxidase – AOX)** και η **δεϋδρογενάση της αλκοόλης (Alcohol Dehydrogenase – ADH)**.

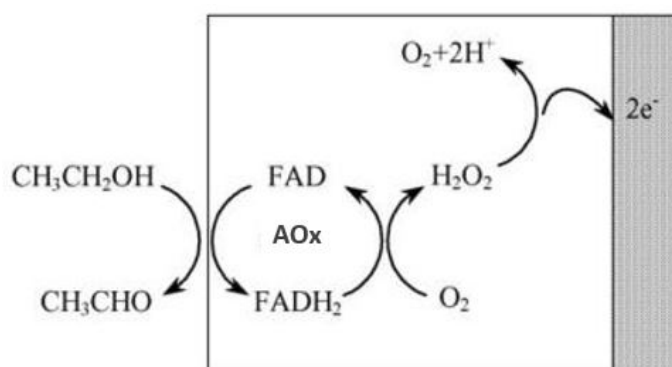
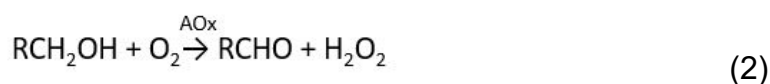
Η ADH καταλύει την *αμφίδρομη ή αντιστρεπτή οξείδωση των πρωτοταγών αλειφατικών κι αρωματικών αλκοολών* εκτός της μεθανόλης, σύμφωνα με την κάτωθι εξίσωση. Οι βιοαισθητήρες αιθανόλης, που βασίζονται στην ADH, έχουν αναφερθεί

ως πιο σταθεροί και ειδικοί προς την αιθανόλη, σε σχέση με εκείνους, που βασίζονται στην ΑΟx. Παρ' όλα αυτά, οι ADH βιοαισθητήρες απαιτούν την εξωτερική προσθήκη ενός συνενζύμου, του κατιόντος νικοτιναμιδίου αδένινο νουκλεοτιδίου (*Nicotinamide Adenine Nucleotide – NAD⁺*). Επιπλέον, ο συμπαραγόμενος πρέπει να είναι δίπλα στο ένζυμο, χωρίς να συνδεθεί ή εγκλωβιστεί αμετάκλητα.



Η ΑΟx αποτελεί ένα ολιγομερές ένζυμο, που περιέχει FAD, και παράγεται από μεθυλοτροφικούς ζυμομύκητες (π.χ. *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*). Η ΑΟx αποτελεί το πρώτο ένζυμο, που εμπλέκεται στην οξείδωση της μεθανόλης των μεθυλοτροφικών ζυμομυκήτων, και αν και ο φυσιολογικός ρόλος της είναι η οξείδωση της μεθανόλης, είναι επίσης ικανή να οξειδώσει άλλες, μικρής ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλες, όπως αιθανόλη, προπανόλη και βουτανόλη.

Η ΑΟx συνεπώς, είναι υπεύθυνη για την οξείδωση χαμηλού μοριακού βάρους αλκοολών προς την αντίστοιχη αλδεΐδη, χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων, σύμφωνα με την επόμενη εξίσωση και το Σχήμα 30. Λόγω του ισχυρού οξειδωτικού χαρακτήρα του O₂, η οξείδωση αλκοολών μέσω ενζύμου ΑΟx, είναι μονόδρομη ή μη αντιστρεπτή^[200]:



Σχήμα 30. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης καταλυτικής οξείδωσης της αιθανόλης από το ΑΟx, με απευθείας ανίχνευση H₂O₂^[200].

6.5 Γαλακτικό οξύ

Το **γαλακτικό οξύ** είναι το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης σε πολλούς οργανισμούς υπό αναερόβιες συνθήκες και θεωρείται ως νεκρό και άχρηστο προϊόν. Το γαλακτικό ανιόν είναι ένας ενεργός μεταβολίτης, που παίζει σπουδαίο ρόλο στην παραγωγή του γλυκογόνου των μυών. Στους ανθρώπους, το γαλακτικό ανιόν υπάρχει ως *αριστερόστροφο ισομερές*. Η παραγωγή γαλακτικού ανιόντος προκύπτει σε όλους τους ιστούς και συγκεκριμένα στο *σκελετικό μυ*, στον *εγκέφαλο*, στα *ερυθρά αιμοσφαίρια*, στα *νεφρά* και στο *δέρμα* υπό αναερόβιες συνθήκες. Σε φυσιολογικά άτομα, το γαλακτικό ανιόν εκκαθαρίζεται πολύ γρήγορα με ρυθμό $320 \text{ mmol L}^{-1}/\text{ώρα}$, κυρίως από τον ηπατικό μεταβολισμό και την μετατροπή του γαλακτικού ανιόντος ξανά, σε πυροσταφυλικό ανιόν. Αυτή η ενέργεια διατηρεί τα «βασικά» επίπεδα του γαλακτικού ανιόντος κάτω από ένα mmol L^{-1} στο αίμα, τόσο στις αρτηρίες όσο και στις φλέβες^[202-207].

Το φυσιολογικό εύρος του γαλακτικού οξέος στο αίμα είναι $4,5 - 19,8 \text{ mg dL}^{-1}$ ($0,5 - 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$)^[208]. Ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος στον ορό του αίματος έχει μεγάλη σημασία για την διαφορική διάγνωση και ιατρική διαχείριση της *υπερλακτιναιμίας*, της *καρδιακής ανακοπής* και *ανάνηψης*, της *σήψης*, της *νεφρικής ανεπάρκειας*, των *χρόνιων ασθενειών*, του *μειωμένου εξωηπατικού μεταβολισμού*, της *εντερικής ισχαιμίας* και της *γαλακτικής οξέωσης*^[209,210].

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος, περιλαμβάνουν την *υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)*, τη *φασματοσκοπία φθορισμού*, τη *χρωματομετρία*, τη *χημειοφωταύγεια*, τη *φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού* και τους *ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες*^[211,212].

Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων γαλακτικού οξέος, χρησιμοποιούνται συνήθως ένα από τα εξής ένζυμα: **οξειδάση του γαλακτικού οξέος (L-Lactate Oxidase – LOx)** και **γαλακτική αφυδρογονάση ή δεϋδρογενάση (L-Lactate Dehydrogenase – LDH)** χάρη στην απλή ενζυμική αντίδραση που λαμβάνει χώρα και τον σχετικά απλό σχεδιασμό στην κατασκευή του αισθητήρα^[211].

Η LOx είναι μία σφαιρική *φλαβοπρωτεΐνη*, η οποία μπορεί να ληφθεί από μία ποικιλία βακτηριακών πηγών, π.χ. *Pediococcus*, *Aerococcus Viridans*, *Mycobacterium smegmatis*. Καταλύει την οξείδωση του *L-γαλακτικού ανιόντος* σε

πυροσταφυλικό ανιόν, με την παρουσία αδιάλυτου O_2 και σχηματίζει H_2O_2 ^[213,214] (Σχήμα 31).

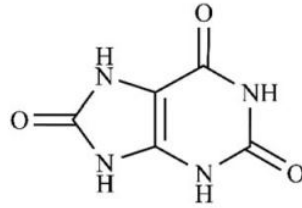


Σχήμα 31. Σχηματική αναπαράσταση της άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων σε έναν LOx βιοαισθητήρα^[215].

Η LDH, μία τεταρτοταγής πρωτεΐνη, βρίσκεται σε ζώα, φυτά και προκαρυώτες. Παρουσιάζει υψηλή καταλυτική δραστηριότητα για την μετατροπή του γαλακτικού ανιόντος σε πυροσταφυλικό και $NADH$. Η LDH ανήκει στις οξειδοοδουκτάσες, που καταλύουν την οξείδωση των α -υδροξυοξέων. Όντας δεϋδρογενάση, μεταφέρει ένα υβρίδιο από το ένα μόριο στο άλλο. Αποτελεί επίσης, έναν σημαντικό υποψήφιο για την κατασκευή βιοαισθητήρων^[216-218].

6.6 Ουρικό οξύ

Το **ουρικό οξύ** (Σχήμα 32), είναι μία λευκή άγευστη κρυσταλλική ουσία, που μετά βίας διαλύεται σε ύδωρ και αιθανόλη, και είναι ελαφρώς αλκαλική, οπότε μπορεί να σχηματίσει άλας με ισχυρό οξύ. Στους οργανισμούς βρίσκεται με τη μορφή ουρικού άλατος με υψηλή διαλυτότητα. Το ουρικό οξύ αποτελεί έναν απορροφητή δραστικών μορφών οξυγόνου και είναι ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό, που συμβάλλει στην διατήρηση της σταθερότητας της πίεσης του αίματος και του οξειδωτικού στρες.



Σχήμα 32. Συντακτικός τύπος ουρικού οξέος^[219].

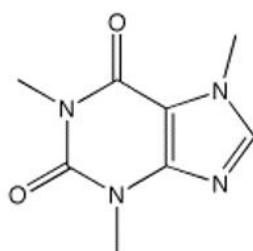
Φυσιολογικά, τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό του αίματος, σε υγιείς ενήλικες κυμαίνονται από 1,5 έως 6,0 mg dL⁻¹ για τις γυναίκες, και 2,5 με 7,0 mg dL⁻¹ για τους άντρες, που είναι κοντά στο υψηλότερο όριο διαλυτοποίησης του ουρικού οξέος στον ορό^[210-221]. Αν η συγκέντρωση του ουρικού οξέος αυξηθεί, το παραπανίσιο ουρικό οξύ μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό *κρυστάλλων ουρικού μονονατρίου* ^[222,223].

Η μη φυσιολογική συγκέντρωση ουρικού οξέος μπορεί να συνδεθεί με πολλές ασθένειες. Ένας ακατάλληλος τρόπος ζωής, όπως η *υπερβολική πρόσληψη πουρινών* και η *υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ*, μπορεί να οδηγήσει σε *υπερουριχαιμία*, *ουρική αρθρίτιδα* και ορισμένες *καρδιαγγειακές ασθένειες*. Έρευνες, επίσης έχουν βρει ότι υψηλά επίπεδα σε ουρικό οξύ, σχετίζονται άμεσα με τη *λιπώδη νόσο του ήπατος*, την *αρτηριακή υπέρταση*, τη *στεφανιαία νόσο*, την *ασθένεια Parkinson*, *αθηροσκλήρωση*, το *μεταβολικό σύνδρομο* και άλλα. Στο μεταξύ, έχει διαπιστωθεί ότι η *υποουριχαιμία* συνδέεται με ορισμένες *γενετικές ασθένειες*, συνεπώς μία χαμηλότερη συγκέντρωση ουρικού οξέος, θα έπρεπε επίσης να είναι ανησυχητική. Επομένως, η ανάπτυξη μίας γρήγορης και ακριβούς ανιχνευτικής μεθόδου για το ουρικό οξύ, είναι επείγουσα και σημαντική.

Πρόσφατα, πολλές μέθοδοι προσδιορισμού έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση του επιπέδου ουρικού οξέος σε *ανθρώπινο ορό* και *δείγμα ούρων*, ακόμη και *σάλιο*, *νύχια* και *δάκρυα*. Ο προσδιορισμός του, περιλαμβάνει τον *φασματικό (φθορισμός, απορρόφηση υπεριώδους)*, τη *χρωματογραφία (υγρή και αέρια)*, τον *ηλεκτροχημικό*, την *τριχοειδή ηλεκτροφόρηση*, την *φασματομετρία μαζών* κ.α.^[219]. Οι περισσότερες από τις παραπάνω μεθόδους περιέχουν τόσο *ενζυμικές* όσο και *μη-ενζυμικές* στρατηγικές.

6.7 Καφεΐνη

Η **καφεΐνη** (3,7-διϋδρο-1,3,7-τριμεθυλπουριν-2,6-διόνη) (Σχήμα 33) είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές, που ανήκει στα Ν-μεθυλ- παράγωγα της ξανθίνης. Λόγω της υψηλής δημοφιλίας του καφέ και άλλων προϊόντων που περιέχουν καφεΐνη (τσάι, κόκα-κόλα, αναψυκτικά, ενεργειακά ποτά, κακάο, σοκολάτα) είναι η συνηθέστερη ψυχοδραστική ουσία στην ανθρώπινη καθημερινότητα. Η καφεΐνη επίσης, ψεκάζεται στα φυτά, όπου χρησιμεύει ως φυσικό εντομοκτόνο, καθώς μπορεί να παραλύσει και να σκοτώσει ορισμένα έντομα, που τρέφονται από το φυτό. Για τους ανθρώπους, η καφεΐνη έχει πολλές σημαντικές φυσιολογικές επιδράσεις, όπως διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος, διούρηση και έκκριση γαστρικού οξέος. Ωστόσο, υψηλές ποσότητες της καφεΐνης μπορούν να προκαλέσουν τρέμουλο, ναυτία, νευρικότητα, επιληπτικές κρίσεις, και ακόμη μεταλλακτικές επιδράσεις, όπως αναστολή του DNA. Θανατηφόρα δόση καφεΐνης έχει εκτιμηθεί να είναι πάνω από $\sim 170 \text{ mg kg}^{-1}$ του ανθρώπινου βάρους. Ακόμη θεωρείται ένας παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακές ασθένειες, νεφρική δυσλειτουργία και μπορεί επιπλέον να προκαλέσει υπερκινητικότητα. Συχνά, η καφεΐνη ορίζεται ως βοηθητικό αναλγητικό σε φαρμακευτικές συνθέσεις για την θεραπεία του πονοκεφάλου και του πόνου μετά από τοκετό, οδοντιατρική επέμβαση, χειρουργείο, και χρησιμοποιείται για την αγωγή της ημικρανίας σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, όπως ασπιρίνη, παρακεταμόλη και ασκορβικό οξύ^[224-230].



Σχήμα 33. Συντακτικός τύπος καφεΐνης.

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της καφεΐνης δεν έχει μόνο σημασία στην χημεία τροφίμων και φαρμακοχημεία, αλλά μπορεί να δώσει ωφέλιμες συμβουλές για την ανθρώπινη υγεία. Έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες με στόχο την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για προσδιορισμό της καφεΐνης σε διάφορα είδη μήτρας (ποτά, τρόφιμα, περιβάλλον, βιολογία).

Σχετικά με τη μέτρηση της καφεΐνης, πολλές σύγχρονες μέθοδοι διαχωρισμού με εξαιρετική *ευαισθησία, εκλεκτικότητα* και *όριο ανίχνευσης* συνήθως *χαμηλότερο από $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$* , κυριαρχούν στα αναλυτικά εργαστήρια, όπως *αέρια χρωματογραφία ή υγρή, συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, ανιχνευτής με συστοιχία διόδων και ηλεκτροχημικές μέθοδοι*^[224].

6.8 Βαρέα μέταλλα

Καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός, συναντάται ολοένα και περισσότερο σε αστικά συγκροτήματα, υπάρχει μία συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για την τροφοδοσία αυτών των πληθυσμιακών κέντρων με ασφαλές πόσιμο νερό. Ωστόσο, η παλαιωμένη/ ανεπαρκής υποδομή ύδρευσης, που υπάρχει στις περισσότερες πόλεις οδηγεί σε σοβαρά προβλήματα, τα οποία προκύπτουν από την είσοδο ρυπαντών (ιδίως βαρέων μετάλλων) στην οικιακή παροχή νερού^[231,232].

Οι ρύποι από τα **βαρέα μέταλλα** δεν οφείλονται μόνο στην εκροή τους από τις υπάρχουσες υποδομές νερού, αλλά είναι επιπλέον αποτέλεσμα *ανθρωπογενών, γεωργικών, εξορυκτικών και βιομηχανικών δραστηριοτήτων*, οι οποίες έχουν αυξήσει δραστικά τα επίπεδα αυτών των μετάλλων στο περιβάλλον^[233,234]. Τα βαρέα μέταλλα, τα οποία εμφανίζονται συνήθως ως μολυσματικοί παράγοντες σε οικιακά αποθέματα νερού, είναι ο *υδράργυρος, ο μόλυβδος, ο χαλκός και το κάδμιο*.

Η τοξικότητα αυτών των βαρέων μετάλλων προκύπτει από την ικανότητά τους να συνδέονται με πρωτεϊνικές θέσεις, εκτοπίζοντας τα αρχικά απαραίτητα μέταλλα, να συσσωρεύονται βιολογικά και τελικά, να γίνονται επιβλαβή^[231]. Σύμφωνα με τις αναφορές της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την ποιότητα του νερού, οι κύριες πηγές παρουσίας βαρέων μετάλλων στο πόσιμο νερό είναι: η *φυσική παρουσία, η ρύπανση, η επεξεργασία λυμάτων και τα συστήματα ύδρευσης νερού*^[235]. Τα βαρέα μέταλλα, που υπάρχουν στο νερό εισέρχονται στους μικρούς οργανισμούς και συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα· στην περίπτωση του ανθρώπου, υπάρχει ακόμη ο κίνδυνος λόγω άμεσης έκθεσης/πρόσληψης βαρέων μετάλλων^[231].

6.8.1 Μόλυβδος

Ο **μόλυβδος** *Pb*, είναι το πιο άφθονο βαρύ μέταλλο στον φλοιό της γης, το οποίο έχει σταθερές χημικές ιδιότητες, εξαιρετική ολκιμότητα και σχηματίζει εύκολα κράματα με άλλα μέταλλα. Μπορεί να απορροφήσει τις ακτίνες X , γ και άλλες ακτίνες, οπότε χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία. Η καθολικότητα της χρήσης του μολύβδου οδηγεί επίσης στην καθολικότητα της ρύπανσης του περιβάλλοντος από μόλυβδο.

Ο μόλυβδος είναι ένα καθαρά *τοξικό, νευροτοξικό, βαρύ* μέταλλο που δεν έχει κανένα μεταβολικό όφελος και απορροφάται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό, ιδίως μέσω της κατάποσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού^[236,237]. Απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό, ή τα ζώα και τα φυτά, με τη μορφή *iónτων μολύβδου* και στη συνέχεια αντιδρά με βιολογικές μακρομοριακές θέσεις συγγένειας στα βιολογικά συστήματα, επηρεάζοντας τα διάφορα όργανα των οργανισμών με οξείες ή χρόνιες τοξικές επιδράσεις. Ο μόλυβδος δεν μπορεί να αποικοδομηθεί από τους οργανισμούς και είναι εξαιρετικά δύσκολο να αποβληθεί, οπότε συσσωρεύεται στους ζωντανούς οργανισμούς. Απορροφάται κυρίως μέσω της *αναπνευστικής οδού, της πεπτικής οδού* και του *δέρματος* και κατανέμεται γρήγορα στα όργανα και τους ιστούς ολόκληρου του σώματος, μετά την είσοδο στο αίμα. Συνεπώς, μπορεί να οδηγήσει σε συστηματικές ασθένειες του ανθρώπινου σώματος, όπως *βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος, δυσλειτουργία των πνευμόνων, αναιμία, καρδιαγγειακή δυσλειτουργία*, και έχει ακόμη και ορισμένη *καρκινογένεση* ^[238,239].

Το μέγιστο επιτρεπόμενο επίπεδο *iónτων Pb(II)* στο πόσιμο νερό είναι *10 $\mu\text{g/L}$* ^[240]. Το διεθνές ανησυχητικό επίπεδο για τη δηλητηρίαση του ανθρώπου από *Pb* είναι *100 $\mu\text{g/L}$ αίματος* ^[236].

6.8.2 Κάδμιο

Ως ένα από τα, επίσης τοξικότερα και κυρίαρχα *iónτα βαρέων μετάλλων*, το **κάδμιο** *Cd (II)*, κατανέμεται ευρέως και σε μεγάλο βαθμό σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα και η έκθεση σε αυτό, ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα, θα οδηγούσε σε σοβαρούς κινδύνους *καρκίνου* και *βλάβες οργάνων* ^[241-244]. Μόλις το *Cd²⁺* εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό, μπορεί να συσσωρευτεί με χρόνο ημιζωής > 10 έτη και να προκαλέσει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία: *καρκίνο, νεφρική δυσλειτουργία*,

υπέρταση, βλάβες στο ανοσοποιητικό/νευρικό σύστημα, σκελετικές αλλοιώσεις, έως και τερατογενετικές επιδράσεις.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το μέγιστο επίπεδο Cd (II) στο πόσιμο νερό, είναι $3 \mu\text{g/L}$ ^[241,245-247].

Συνεπώς, μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και ακριβής ανάλυση των Pb (II) και Cd (II), είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση της πιθανής έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος^[248]. Οι κλασικές αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, τη φασματοσκοπία ατομικού φθορισμού, τη φασματομετρία οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, τις ηλεκτροχημικές μεθόδους κ.ά.^[249-260].

Τα ηλεκτρόδια με υμένιο υδραργύρου χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων, λόγω των εξαιρετικών χαρακτηριστικών που διαθέτουν. Ωστόσο, η τάση προς την πράσινη χημεία (δηλαδή τη μείωση χρήσης και παραγωγής επικίνδυνων ουσιών) οδήγησε στην αντικατάστασή του από πιο φιλικά προς το περιβάλλον μέταλλα, όπως το βισμούθιο ή το αντιμόνιο^[248].

Από την εισαγωγή του βισμούθιου από την ομάδα του Wang, το στοιχείο αυτό έχει ενσωματωθεί στα ηλεκτρόδια σε διάφορες μορφές, όπως τα νανοσωματίδια Bi_2O_3 ή το κίτρινο βισμούθιο.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΥΛΙΚΑ – ΟΡΓΑΝΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 Πρωτόκολλο κατασκευής ηλεκτροχημικού αισθητήρα

7.1.1 Υλικά – Όργανα

- ✓ Μη αγώγιμο νήμα **PLA** διαμέτρου 1,75 mm (*3D Edge*).
- ✓ Αγώγιμο νήμα αιθάλης/PLA (**CB/PLA**) διαμέτρου 1,75 mm (*Proto-Pasta*).
- ✓ Αγώγιμο νήμα αιθάλης /ABS (**CB/ABS**) διαμέτρου 1,75 mm (*3D Edge*).
- ✓ Αγώγιμο νήμα αιθάλης/PLA, μορφοποιημένο με νανοσωματίδια Bi₂O₃ και CuO (**Bi/Cu/CB/PLA**) διαμέτρου 1,75 mm (*Ιδιοκατασκευής*).
- ✓ Τρισδιάστατος εκτυπωτής δύο κεφαλών **Creator Pro** (*Flashforge*).



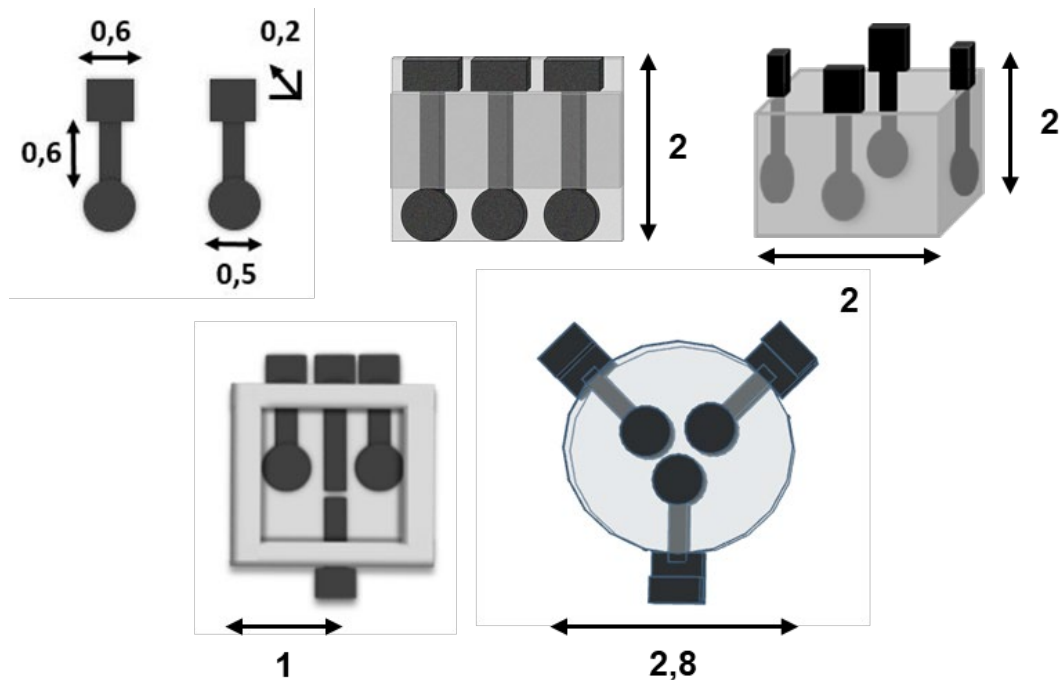
Εικόνα 1. Τρισδιάστατος εκτυπωτής δύο κεφαλών **Creator Pro** (*Flashforge*)^[261].

7.1.2 Σχεδίαση – Κατασκευή

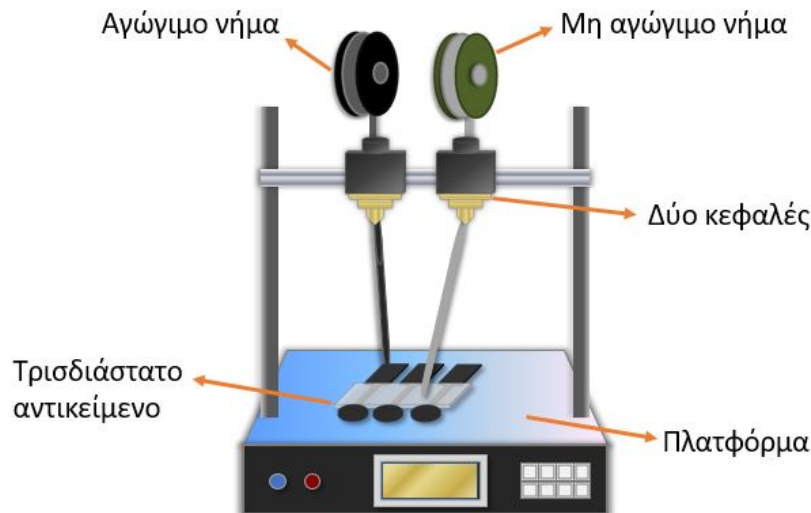
Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής λογισμικά:

- ✓ Λογισμικό 3D σχεδίασης **Tinkercard** (λογισμικό ανοιχτού κώδικα, <https://www.tinkercad.com>).
- ✓ Λογισμικό 3D εκτύπωσης **Flashprint** (λογισμικό ανοιχτού κώδικα, <https://www.flashforge.com/download-center>).

Οι διάταξεις σχεδιάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού σχεδίασης *Tinkercard*. Η διαδικασία του σχεδιασμού είναι απλή και γρήγορη, και δεν απαιτεί επαγγελματική εμπειρία. Στο παρακάτω σχήμα αναπαρίστανται η γεωμετρία καθώς και οι διαστάσεις των αισθητήρων/διατάξεων που κατασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 34. Σχηματική απεικόνιση των τρισδιάστατα εκτυπωμένων ηλεκτροδίων και διατάξεων που κατασκευάστηκαν, και οι διαστάσεις σε εκατοστά.



Σχήμα 35. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας τρισδιάστατης εκτύπωσης με χρήση τρισδιάστατου εκτυπωτή δύο κεφαλών.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του λογισμικού *Flashforge*, πραγματοποιήθηκε η αποκωδικοποίηση του αρχείου *STL* και προσδιορίστηκαν οι συνθήκες εκτύπωσης των αισθητήρων. Το αρχείο που δημιουργείται με τη συγκεκριμένη διαδικασία, είναι σε μορφή *.x3g*, η οποία είναι συμβατή με τον τρισδιάστατο εκτυπωτή. Αποθηκεύεται σε *κάρτα μνήμης SD* και ύστερα μεταφέρεται σε κατάλληλη υποδοχή του εκτυπωτή ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της τρισδιάστατης εκτύπωσης (Σχήμα 35). Τέλος, η διάταξη συνδέεται με *ποτενσιοστάτη* με τη βοήθεια συνδέσμων (*crocodile clips*), προκειμένου να γίνουν οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις.

Ο κάθε αισθητήρας αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια (*ηλεκτρόδιο εργασίας – WE*, *ηλεκτρόδιο αναφοράς – RE*, *βοηθητικό ηλεκτρόδιο – CE*), κατασκευασμένα από αγώγιμο νήμα CB/PLA ή CB/ABS κι από ένα *στήριγμα* (ή *κυψελίδα*), κατασκευασμένο από μη αγώγιμο νήμα PLA.

Η τελική γεωμετρία της κάθε διάταξης/αισθητήρα σχεδιάστηκε ώστε να είναι απλή, προκειμένου να διευκολυνθεί τόσο η σχεδίαση όσο και η εκτύπωσή της. Ο συνήθης χρόνος κατασκευής διαρκεί μερικά λεπτά (ανάλογα το μέγεθος της διάταξης), ενώ το τελικό κόστος των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή κάθε αισθητήρα δεν ξεπερνάει τα 0,2 ευρώ.

Οι συνθήκες της εκτύπωσης (ταχύτητα εκτύπωσης, θερμοκρασία κεφαλών) εξαρτώνται από τη γεωμετρία του αισθητήρα και τα νήματα που χρησιμοποιήθηκαν. Οι συνθήκες αυτές ήταν:

- ✓ Θερμοκρασία πλατφόρμας: 50 – 60 °C.
- ✓ Θερμοκρασία κεφαλής για την εκτύπωση νήματος PLA: 200 °C.
- ✓ Θερμοκρασία κεφαλής για την εκτύπωση νήματος ABS: 220 °C.
- ✓ Θερμοκρασία κεφαλής για την εκτύπωση νήματος ιδιοκατασκευής: 220 °C.
- ✓ Ταχύτητα εκτύπωσης: 50 mm s⁻¹.

7.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροχημικών μετρήσεων

7.2.1 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

- ✓ Όξινο φωσφορικό δινάτριο **Na₂HPO₄·2H₂O**, Mr = 177,99 (*Chem–Lab*).
- ✓ Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο **NaH₂PO₄·2H₂O**, Mr = 156,01 (*Chem–Lab*).
- ✓ Οξικό οξύ **CH₃COOH** 100%, Mr = 60,05, d = 1,052 kg L⁻¹, c ≅ 17,5 mol L⁻¹ (*Merck*).
- ✓ Ένυδρο οξικό νάτριο **CH₃COONa·3H₂O**, Mr = 136,09 (*Chem–Lab*).
- ✓ Υδροξείδιο του νατρίου **NaOH**, Mr = 40,00 (*Panreac*).
- ✓ Υδροξείδιο του καλίου **KOH** 85%, Mr = 56,11 (*Panreac*).
- ✓ Χλωριούχο κάλιο **KCl**, Mr = 74,55 (*Merck*).
- ✓ Χλωριούχο νάτριο **NaCl**, Mr = 58,44 (*Merck*).
- ✓ Χλωριούχο ασβέστιο **CaCl₂**, Mr = 110,98 (*Merck*).
- ✓ Χλωριούχο μαγνήσιο **MgCl₂**, Mr = 95,21 (*Merck*).
- ✓ Χλωριούχο αμμώνιο **NH₄Cl**, Mr = 53,49 (*Merck*).
- ✓ Υδρογονανθρακικό νάτριο **NaHCO₃**, Mr = 84,01 (*Chem–Lab*).
- ✓ Σιδηροκυανιούχο κάλιο **K₄[Fe(CN)₆]**, Mr = 329,26 (*Merck*).
- ✓ Σιδηρικούανιούχο κάλιο **K₃[Fe(CN)₆]**, Mr = 329,24 (*Merck*).
- ✓ Χλωριούχος σίδηρος (III) **FeCl₃·6H₂O**, Mr = 270,32 (*Merck*).
- ✓ Υδροχλωρικό οξύ **HCl** 37%, Mr = 36,5, d = 0,91 kg L⁻¹, C ≅ 12 mol L⁻¹ (*Merck*).
- ✓ **Ισοπροπυλική αλκοόλη** Mr = 60,10 (*Panreac*).
- ✓ **Triton™ X-100** εξαιρετικής καθαρότητας (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Οξειδάση γλυκόζης **GOx** από *Aspergillus niger*, 50 kU mg⁻¹ (*MP Biomedicals*).
- ✓ Οξειδάση χολίνης **ChOx** από *Alcaligenes sp.*, ≥10 U mg⁻¹ (*Merck*).
- ✓ Οξειδάση χοληστερόλης **ChIOx** από *Streptomyces sp.*, ≥20 U mg⁻¹ (*Merck*).

- ✓ Οξειδάση αιθανόλης **AOx** από *Pichia Pastoris*, 10 – 40 U mg⁻¹ (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Οξειδάση γαλακτικού ανιόντος **LOx** από *Aerococcus Viridans*, 41 U mg⁻¹ (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Σύμπλοκο σιδήρου (III) **[Fe₃O(PhCO₂)₆(H₂O)₃]·PhCO₂**.
- ✓ Οξειδίο σιδήρου (III) **Fe₂O₃**, Mr = 159,69 (*Merck*).
- ✓ Μεταλλο-οργανικές κατασκευές σιδήρου (II) **Fe²⁺ – MOFs**.
- ✓ **D(+)-γλυκόζη** ≥99.0% (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ **Χλωρίδιο χολίνης** ≥98.0% (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ **Χοληστερόλη** ≥99.0% (*Merck*).
- ✓ **Αιθανόλη** ≥99.9% (*Supelco*).
- ✓ **Γαλακτικό οξύ** 90.0% (*Chemco*).
- ✓ **Ουρικό οξύ** Mr = 168,12 (*Merck*).
- ✓ **Καφεΐνη** (*Merck*).
- ✓ Υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων **Cd(II)**, **Pb(II)**, που παρασκευάστηκαν από πρότυπα διαλύματα ατομικής απορρόφησης 1000 mg L⁻¹ (*Merck*).
- ✓ **Nafion** 5% κ.β. σε αλκοόλη (*Merck*).
- ✓ **Ακεταμινοφαΐνη** ή **Παρακεταμόλη** (*Merck*).
- ✓ **Ουρία** (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ **L(+)-Ασκορβικό οξύ** (*Ferak*).
- ✓ **Κιτρικό οξύ** (*Chem–Lab*).
- ✓ **D(-)-Φρουκτόζη** (*Merck*).
- ✓ **Σακχαρόζη** (*Merck*).
- ✓ Πολυ(βινυλο-αλκοόλη) **PVA** Mr = 89,000 – 98,000, ≥99.0% (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Ζάχαρη λευκή κρυσταλλική.
- ✓ Ανθρώπινος ορός από πλάσμα αίματος ομάδας AB (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Λευκός ξηρός οίνος, *Ροδίτης* Alc. 13% Vol.
- ✓ Ερυθρός ξηρός οίνος, *Syrah – Αγιωργίτικο* Alc. 12% Vol.
- ✓ Ροζέ βιολογικός ξηρός οίνος *Τυρνάβου* Alc. 11% Vol.
- ✓ Δισαπεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Εμφιαλωμένο νερό.

7.2.2 Διαλύματα εργασίας

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα **φωσφορικών $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$** 0,1 mol L⁻¹:

Για την παρασκευή 1000 mL του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος:

- Ζύγιση 7,12 g **$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** και 9,4 g **$\text{Na}_2\text{HPO}_4$** και διάλυση σε 1000 mL δισαππεσταγμένου ύδατος.
- Ρύθμιση της τιμής pH του τελικού διαλύματος με διάλυμα 0,1 mol L⁻¹ **HCl** ή **NaOH**.
- Αποθήκευση στους 4 °C.

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα **οξικών $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$** 1 mol L⁻¹:

Για την παρασκευή 1000 mL του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος:

- Ζύγιση 136 g **$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$** και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- Προσθήκη στο παραπάνω διάλυμα 58 mL **CH_3COOH** 99,7%.
- Αραίωση του διαλύματος που προκύπτει με δισαππεσταγμένο ύδωρ μέχρις τελικού όγκου 1000 mL.
- Ρύθμιση της τιμής pH του τελικού διαλύματος, εφόσον απαιτείται, με διάλυμα 0,1 mol L⁻¹ **NaOH**, ώστε να προκύψει pH = 4,8.
- Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- ✓ Υδατικό διάλυμα **NaOH** 5 mol L⁻¹:

- Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.

- ✓ Υδατικό διάλυμα **KCl** 0,1 mol L⁻¹:

- Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.

- ✓ Υδατικό διάλυμα **$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$** 0,1 mol L⁻¹:

- Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.

- ✓ Υδατικό διάλυμα **$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$** 25 mmol L⁻¹ σε **KCl** 0,1 mol L⁻¹:

- Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας των αντιδραστηρίων και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **KCl** 0,1 mol L⁻¹.

- ✓ Υδατικό διάλυμα **πρωσσικού μπλε** ($\text{FeCl}_3/ \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 25 mmol L⁻¹) σε **KCl** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας των αντιδραστηρίων και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **KCl** 0,1 mol L⁻¹.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **GOx** 750 kU mL⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ενζύμου και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **ChOx** 250 U mL⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ενζύμου και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **ChIOx** 500 U mL⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ενζύμου και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **AOx** 1:6 κ.ο. σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ενζύμου και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **LOx** 49,2 U mL⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ενζύμου και διάλυση σε υδατικό διάλυμα **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Αιθανολικό διάλυμα **[Fe₃O(PhCO₂)₆(H₂O)₃]·PhCO₂** 6 % κ.ο.:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας συμπλόκου και διάλυση σε αιθανόλη.
- ✓ Αιθανολικό διάλυμα **Fe₂O₃** 6 % κ.ο.:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε αιθανόλη.
- ✓ Αιθανολικό διάλυμα **Fe (II) – MOF** 0,6 % κ.ο.:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας μεταλλο-οργανικής κατασκευής και διάλυση σε αιθανόλη υπό υπερηχητική ανάδευση για 20 λεπτά.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **γλυκόζης** 0,05 και 0,01 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας **β-D-γλυκόζης**, διάλυση σε δισαπτεσταγμένο ύδωρ.
 - Παραμονή για 24 ώρες στους 4 °C για την αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των ανωμερών μορφών, πριν από τη χρήση.

- Αποθήκευση στους 4 °C για έως μία εβδομάδα.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **χολίνης** 7 mmol L⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Διάλυμα **χοληστερόλης** 6 mmol L⁻¹ σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου, διάλυση σε μίγμα **ισοπροπυλικής αλκοόλης/TritonX-100** αναλογίας 1:1, με θέρμανση, ωστόσο ομογενοποιηθεί, και έπειτα επαναδιάλυση του μίγματος που προκύπτει σε **Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄** 0,1 mol L⁻¹ pH = 6,8.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **αιθανόλης** 0,1 mol L⁻¹:
 - Αραίωση κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αντιδραστηρίου σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **γαλακτικού οξέος** 0,1 mol L⁻¹:
 - Αραίωση κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αντιδραστηρίου σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **ουρικού οξέος** 5 mmol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Υδατικό διάλυμα **καφεΐνης** 5 mmol L⁻¹:
 - Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου και διάλυση σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων **Pb (II)** και **Cd (II)** 10 ppm:
 - Αραίωση κατάλληλης ποσότητας των πυκνών διαλυμάτων αντιδραστηρίων σε δισαππεσταγμένο ύδωρ.
- ✓ Αιθανολικά διαλύματα **Nafion** 1, 2, 3, και 4 % κ.ο.:
 - Αραίωση κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος αντιδραστηρίου σε αιθανόλη.
- ✓ Συνθετικό πλάσμα αίματος^[262]:
 - NaCl 116 mmol L⁻¹, CaCl₂ 1,8 mmol L⁻¹, KCl 5,4 mmol L⁻¹, NaHCO₃ 26 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,5 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,9 mmol L⁻¹ και NaH₂PO₄ 0,2 mmol L⁻¹.

- ✓ Συνθετικός ιδρώτας^[263]:
 - NH_4Cl 3 mmol L⁻¹, MgCl_2 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, CaCl_2 0,4 mmol L⁻¹, KCl 8 mmol L⁻¹, NaCl 80 mmol L⁻¹, ουρικό οξύ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ουρία 22 mmol L⁻¹ και γαλακτικό οξύ 5,5 mmol L⁻¹.

Όλα τα διαλύματα εργασίας των ενζύμων αποθηκεύονταν στους $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Όλα τα διαλύματα των αναλυτών, το συνθετικό πλάσμα αίματος και ο συνθετικός ιδρώτας αποθηκεύονταν στους $4\text{ }^\circ\text{C}$. Τα διαλύματα μεταλλικών ιόντων, συμπλόκου και MOFs αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου.

7.2.3 Πολυμερική μεμβράνη PVA

Για να πραγματοποιηθούν οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις των βιοδεικτών σε πραγματικό ιδρώτα, παρασκευάστηκε πολυμερική μεμβράνη (φιλμ) για τη συλλογή ιδρώτα μέσω φυσικής εφίδρωσης^[264].

Η συλλογή ιδρώτα πραγματοποιείται από το άκρο ενός δακτύλου και βασίζεται στην επαφή του δακτύλου με την επιφάνεια της πορώδους μεμβράνης υδρογέλης (PVA), η οποία μπορεί να απορροφά σταγονίδια ιδρώτα από το άκρο του δακτύλου σε μικρό χρονικό διάστημα (π.χ. 120 δευτερόλεπτα). Η μεμβράνη PVA τοποθετείται στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό ενός βιοδείκτη κατά τη μεταφορά του ιδρώτα από το δάκτυλο προς το ενζυμικό στρώμα που καλύπτει τον μεταλλάκτη (ηλεκτρόδιο). Μία τέτοιου είδους απλή και ταχεία παρακολούθηση ενός βιοδείκτη, που βασίζεται στην αφή, συμβάλλει στη βελτίωση της διαχείρισης μίας ασθένειας (π.χ. διαβήτη), καθώς οι συγκεντρώσεις των ουσιών στον ιδρώτα μπορούν να συσχετιστούν με τις συγκεντρώσεις τους στο αίμα.

Διαδικασία σύνθεσης πολυμερικής μεμβράνης PVA: Το διάλυμα εργασίας της PVA παρασκευάστηκε με τη διάλυση του πολυμερούς σε δισαππεσταγμένο ύδωρ με αναλογία 1:10 κ.β. Το διάλυμα εργασίας KOH παρασκευάστηκε με διάλυση του αντιδραστηρίου σε δισαππεσταγμένο ύδωρ σε αναλογία 1:5 κ.β. Ακολούθως, 10 g του διαλύματος PVA μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως, όπου προστέθηκαν σταγόνα-σταγόνα 14 g του διαλύματος KOH μαζί με 2 mL ύδατος που περιείχε 2,6 g λευκής κρυσταλλικής ζάχαρης, υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης. Στη συνέχεια, το μίγμα υποβλήθηκε σε ήπια θέρμανση προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού και να ξεκινήσει η δημιουργία του πορώδους φιλμ. Με το πέρας της διαδικασίας αυτής,

η πλέον στερεοποιημένη μεμβράνη υδρογέλης που δημιουργήθηκε, εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, για την πλήρη απομάκρυνση της καραμελωμένης ζάχαρης και της περίσσειας του KOH, μέχρι το φιλμ να αποκτήσει ουδέτερο pH.

Η συντιθέμενη μεμβράνη PVA που προκύπτει (Εικόνα 2), κόβεται σε μικρά κομμάτια επιθυμητού μεγέθους και αποθηκεύεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) στους $4 \text{ }^\circ\text{C}$ για μελλοντική χρήση.

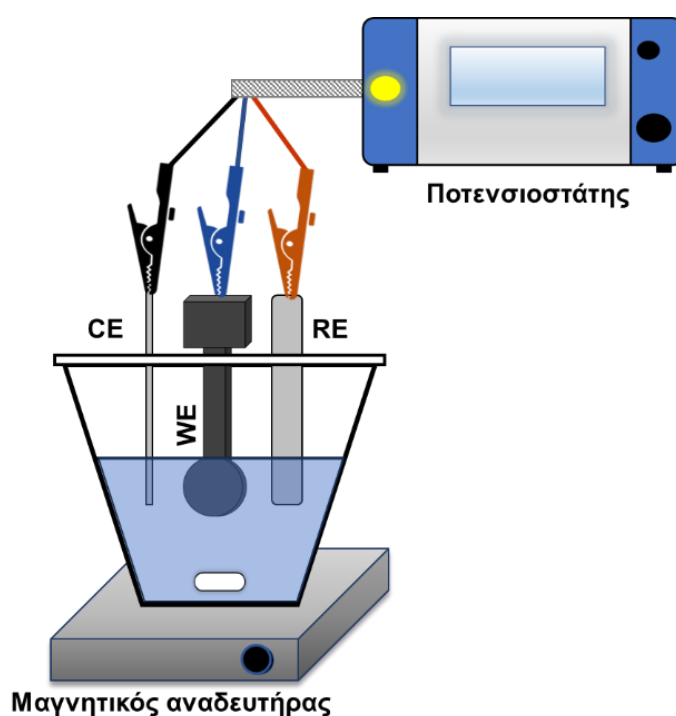


Εικόνα 2. Φωτογραφία της πορώδους πολυμερικής μεμβράνης υδρογέλης PVA.

7.2.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- ✓ Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης $\pm 0,1 \text{ mg}$, μοντέλο Radwag As 220.R2.
- ✓ Μαγνητικός αναδευτήρας speed safe (Hanna).
- ✓ Ποτενσιοστάτης EmStat3 με λογισμικό PS Trace 4.2 Software (Palm Sens).
- ✓ Δι-ποτενσιοστάτης μStat300 με λογισμικό DropView 8400 Software (Metrohm DropSense).
- ✓ Οπτικό μικροσκόπιο, μοντέλο Karl Suss PA200 (SUSS Microtec).
- ✓ Ηλεκτρονική συσκευή μέτρησης pH, μοντέλο Hellamco 420 με ηλεκτρόδιο υάλου, συνδεδεμένη με μαγνητικό αναδευτήρα Heidolph MR 3000.

- ✓ Ηλεκτρική θερμαντική εστία με ικανότητα μαγνητικής ανάδευσης *IKA®RH basic*.
- ✓ Υπερηχητικό λουτρό με καλάθι, μοντέλο ISOLAB (*Laborgeräte GmbH*).
- ✓ Μικροπιπέττες των 10, 100, 200 και 1000 μL , *witeg* (GER) και *alpha+* (UK).
- ✓ Γυάλινες κυψέλες περιεκτικότητας 5 και 10 mL.
- ✓ Ηλεκτρόδια εργασίας (WE): ηλεκτρόδια άνθρακα που εκτυπώθηκαν με τρισδιάστατη εκτύπωση από εμπορικά διαθέσιμο αγώγιμο νήμα CB/PLA, CB/ABS ή από αγώγιμο νήμα ιδιοκατασκευής.
- ✓ Ηλεκτρόδιο αναφοράς (RE): ηλεκτρόδιο **Ag/AgCl**, κορεσμένο σε **KCl** (*Thermo Electron*, UK, CR4 65603/4).
- ✓ Βοηθητικό ηλεκτρόδιο (CE): ηλεκτρόδιο από έλασμα λευκοχρύσου **Pt**.
- ✓ Υποδοχέας τριών ηλεκτροδίων.
- ✓ Σύνδεσμοι τύπου κροκόδειλου (*crocodile clips*).



Σχήμα 36. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροχημικής διάταξης.

7.3 Πρωτόκολλο σύνθεσης αγώγιμου νήματος

7.3.1 Υλικά – Αντιδραστήρια

- ✓ Νανοσωματίδια **Bi₂O₃**, 90 – 210 nm/σωματίδιο (*Merck*).
- ✓ Νανοσωματίδια **CuO**, < 50 nm/σωματίδιο (*Merck*).
- ✓ Σωματίδια αιθάλης **CB**, Cabot VULCAN XC-72R (*Berlin Catalysts*).
- ✓ Πούδρα γραφίτη **GR**, λεπτόκοκκη εξαιρετικής καθαρότητας (*Fisher*).
- ✓ Σφαιρίδια **PLA** (*3D Edge*).
- ✓ Διμεθυλαιθέρας της πολυ(αιθυλενο-γλυκόλης) **PEG-DME**, Mn:500 (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη) **PEG**, Mn:2000 (*Sigma–Aldrich*).
- ✓ Διχλωρομεθάνιο **DCM** ≥99.8% (*Chem–Lab*).

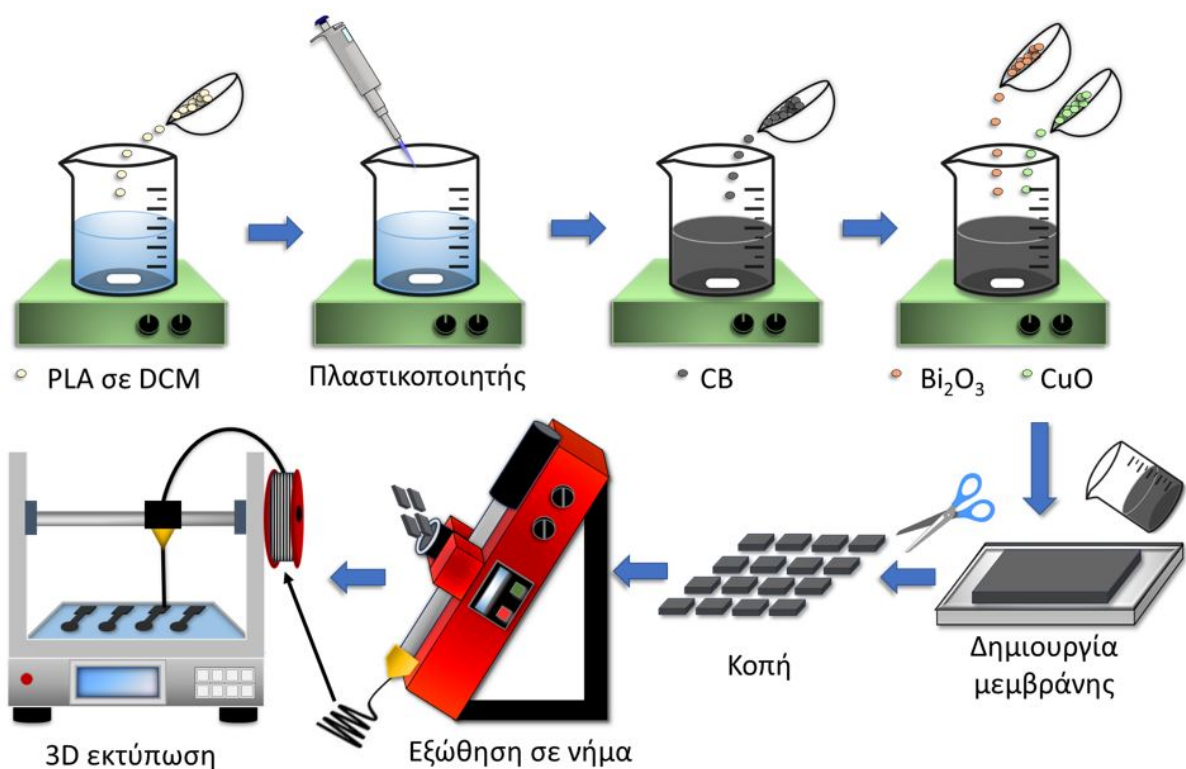
7.3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- ✓ Εξωθητήρας νήματος διαμέτρου 1,75 mm **Noztek Pro** (*Noztek*).
- ✓ Τρισδιάστατος εκτυπωτής δύο κεφαλών **Creator Pro** (*Flashforge*).
- ✓ Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης ± 0,1 mg, μοντέλο Radwag As 220.R2.
- ✓ Μαγνητικός αναδευτήρας speed safe (*Hanna*).
- ✓ Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης FEI Quanta Inspect S (*Thermo Fisher*).
- ✓ Θερμοβαρμετρικός αναλυτής TGA/DCS1 (*Mettler Toledo*).

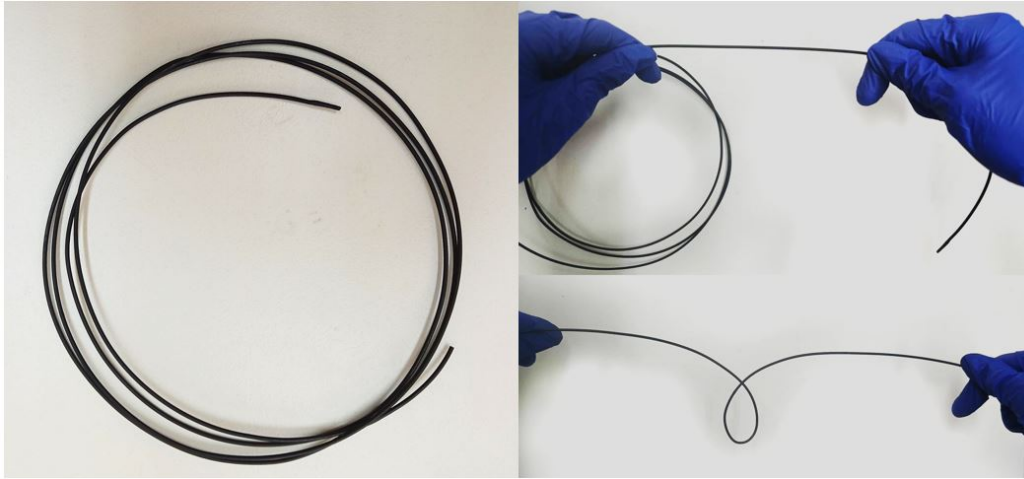
7.3.3 Διαδικασία σύνθεσης

Αρχικά, τα σφαιρίδια PLA διαλύθηκαν σε διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 0,1 g mL⁻¹. Το ποτήρι με το μίγμα τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα για ~ 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από την πλήρη διαλυτοποίηση του PLA σε DCM, προστέθηκε ο κατάλληλος πλαστικοποιητής (PEG-500), με αναλογία ως προς το PLA 10% κ.ο. και το μίγμα αναδεύτηκε για άλλα 30 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν σε διάφορες αναλογίες αγώγιμα σωματίδια αιθάλης ή γραφίτη, που λειτούργησαν ως αγώγιμα υλικά πλήρωσης και το μίγμα αφέθηκε για μία ώρα ακόμη υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη μείωση του όγκου κατά ~ 60%. Ακολούθως, έγινε προσθήκη νανοσωματιδίων Bi₂O₃ και CuO σε μορφή πούδρας σε διάφορες αναλογίες και η ανάδευση συνεχίστηκε για επιπλέον 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το προκύπτον αιώρημα

αποχύθηκε σε ύαλο, όπου αφέθηκε στον απαγωγό για την πλήρη εξάτμιση του DCM, κατά τη διάρκεια μίας νύχτας. Ύστερα, η αποξηραμένη αγώγιμη μεμβράνη κόπηκε σε μικρά κομμάτια και εισήχθη στον εξωθητήρα, με θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 200 °C και διάμετρο ακροφυσίου 1,75 mm, για την παραγωγή ενός νήματος *Bi/Cu/CB/PLA*. Τέλος, το κάθε νήμα τοποθετήθηκε στον τροφοδότη της κεφαλής ενός τρισδιάστατου εκτυπωτή για να εκτυπωθούν τα ηλεκτρόδια. Οι συνθήκες εκτύπωσης ήταν 60 °C για την πλατφόρμα και 220 °C για την κεφαλή. Το Σχήμα 37 απεικονίζει τη διαδικασία σύνθεσης του αγώγιμου νήματος ενώ στην Εικόνα 3, φαίνεται το νήμα.



Σχήμα 37. Διαδικασία σύνθεσης πολυμερικού αγώγιμου νήματος προς εκτύπωση ηλεκτροδίων.



Εικόνα 3. Φωτογραφίες του νήματος *Bi/Cu/CB/PLA* μετά την εξώθηση (αριστερά), ευθυγραμμισμένου (δεξιά πάνω) και κυρτωμένου (δεξιά κάτω). Οι φωτογραφίες αναδεικνύουν την ευκαμψία και εκτυπωσιμότητα του διαμορφωμένου νήματος.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

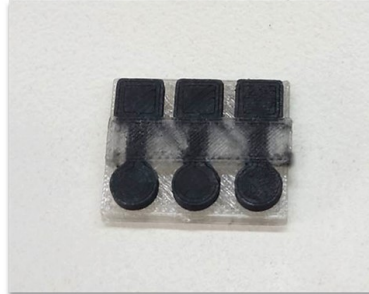
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΙΔΡΩΤΑ

Κατασκευάστηκαν 3D εκτυπωμένοι ενζυμικοί βιοαισθητήρες και αναπτύχθηκαν ηλεκτροχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τριών βιοδεικτών (γλυκόζης, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος), καθώς και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης σε ιδρώτα. Αυτοί οι βιοδείκτες σχετίζονται με την άσκηση, την κατανάλωση τροφής και επηρεάζουν τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης, οπότε ο ποσοτικός τους έλεγχος με αναίμακτες διαδικασίες θεωρείται πολύ σημαντικός, ειδικά σε ηλικιωμένα άτομα, σε υπέρβαρα άτομα, σε καρδιοπαθείς, διαβητικούς κ.ά. Για παράδειγμα, η κατανάλωση αλκοόλ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τους καρδιαγγειακούς κινδύνους μέσω της προκαλούμενης υπότασης ή υπέρτασης, ενώ σχετίζεται με την άμεση αγγειοδιαστολή, αύξηση της κορτιζόλης και μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η πρόσληψη καφεΐνης οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης μέσω της αναστολής του υποδοχέα αδενοσίνης και απελευθέρωση ορμονών του στρες, όπως η νορεπινεφρίνη και η κορτιζόλη. Η σωματική άσκηση έχει σημαντικό αντίκτυπο στη φυσιολογική απόκριση του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην αρτηριακή πίεση και τα επίπεδα γαλακτικού οξέος. Κατά την παρατεταμένη άσκηση, τα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αίμα και στον ιδρώτα αυξάνονται λόγω μεταβολικού στρες, ο καρδιακός ρυθμός αυξάνεται για να καλύψει τη μυϊκή ζήτηση σε οξυγόνο και η αρτηριακή πίεση αυξάνεται λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας αγγειοδιασταλτικών μεσολαβητών, όπως το μονοξείδιο του αζώτου. Το ουρικό οξύ είναι παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, διαβήτη τύπου II και νεφρική νόσο. Η γλυκόζη είναι ο σημαντικότερος βιοδείκτης διαβητικού ελέγχου και ο προσδιορισμός της στον ιδρώτα αποτελεί απαίτηση στη σημερινή εποχή, συντελώντας στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη, μέσω της αναίμακτης παρακολούθησης των επιπέδων της^[265,266].

Για την ανάπτυξη των ηλεκτροχημικών μεθόδων προσδιορισμού αυτών των βιοδεικτών στον ιδρώτα χρησιμοποιήθηκε η 3D εκτυπωμένη συσκευή (Εικόνα 4). Για

τις εφαρμογές σε πραγματικό ιδρώτα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της Εικόνας 5, που είναι βιοαισθητήρας αφής και οι μετρήσεις γίνονται με χρήση πολυμερικής μεμβράνης PVA.



Εικόνα 4. 3D εκτυπωμένη συσκευή για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων προσδιορισμού βιοδεικτών σε ιδρώτα.

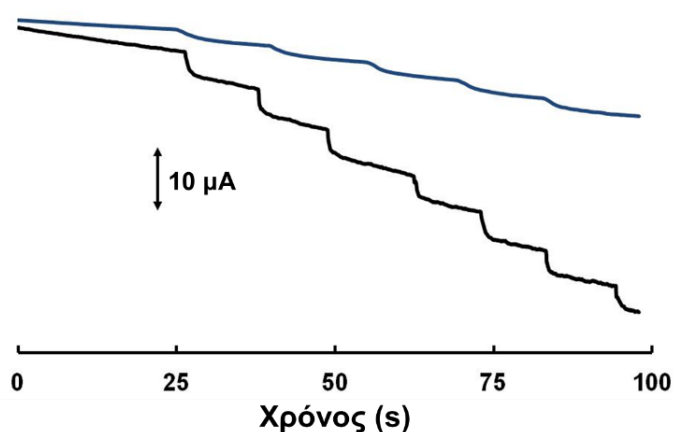


Εικόνα 5. 3D εκτυπωμένος βιοαισθητήρας αφής για την ανίχνευση βιοδεικτών σε ιδρώτα.

8.1 Επιλογή αγώγιμου νήματος εκτύπωσης βιοαισθητήρων

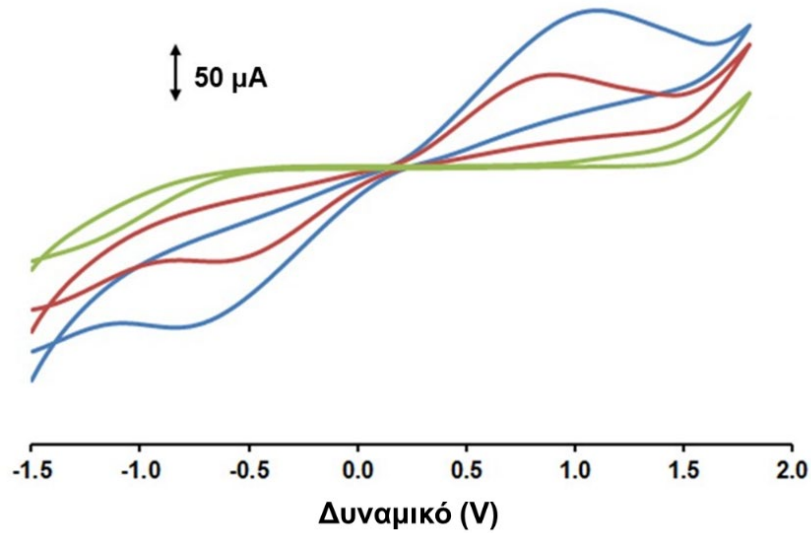
Αρχικά, η ηλεκτροχημική διάταξη του Σχήματος 36 δοκιμάστηκε για τον αμπερομετρικό προσδιορισμό του H_2O_2 σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7. Το H_2O_2 αποτελεί παραπροϊόν διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων και η απόκριση οξειδωσης ή αναγωγής του, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό βιοδεικτών (π.χ. γλυκόζη), όπως φαίνεται στο Σχήμα 38. Ωστόσο, η οξειδωση του H_2O_2 λαμβάνει χώρα σε υψηλό θετικό δυναμικό, όπου οι ενδογενείς ενώσεις των κλινικών δειγμάτων είναι επίσης ηλεκτρο-οξειδώσιμες και προκαλούν σοβαρές παρεμποδίσεις. Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα επιθυμητό να ανιχνεύεται η αναγωγή του H_2O_2 σε χαμηλές τιμές δυναμικού χωρίς παρεμποδίσεις. Έχει αποδειχθεί πως τα ηλεκτρόδια από αιθάλη διευκολύνουν την αναγωγή του H_2O_2 και έτσι, δύο ηλεκτρόδια που εκτυπώθηκαν από διαφορετικά νήματα από αιθάλη (PLA της ProtoPasta και ABS της 3DEdge), δοκιμάστηκαν για τον αμπερομετρικό προσδιορισμό του H_2O_2 μέσω αναγωγής σε δυναμικό $-0,7 \text{ V}$.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας από νήμα CB/PLA, παρουσίασε υψηλότερες αποκρίσεις αναγωγής του H_2O_2 σε σύγκριση με αυτό του CB/ABS και έτσι, επιλέχθηκε για την εκτύπωση των ηλεκτροδίων εργασίας των συσκευών, καθώς και του ηλεκτροδίου αναφοράς και του βοηθητικού.



Σχήμα 38. Αμπερομετρικές αποκρίσεις διαδοχικών προσθηκών $1,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ σε αναδεδυμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) σε τυπωμένα με νήμα αιθάλης ηλεκτρόδια εργασίας από: ABS (μπλε) και PLA (μαύρο).

Το CB/PLA ηλεκτρόδιο εργασίας εξετάστηκε με κυκλική βολταμμετρία σε ηλεκτρολύτη $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (Σχήμα 39) και παρουσίασε καθοδικές και ανοδικές κορυφές, αντικατοπτρίζοντας τις ιδιότητες οξειδοαναγωγής του ηλεκτροενεργού ζεύγους $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.



Σχήμα 39. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε εκτυπωμένο 3D ηλεκτρόδιο CB/PLA: σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (πράσινο), παρουσία 2:2 και 4:4 $\text{mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα). Ρυθμός σάρωσης: 50 mV s^{-1} .

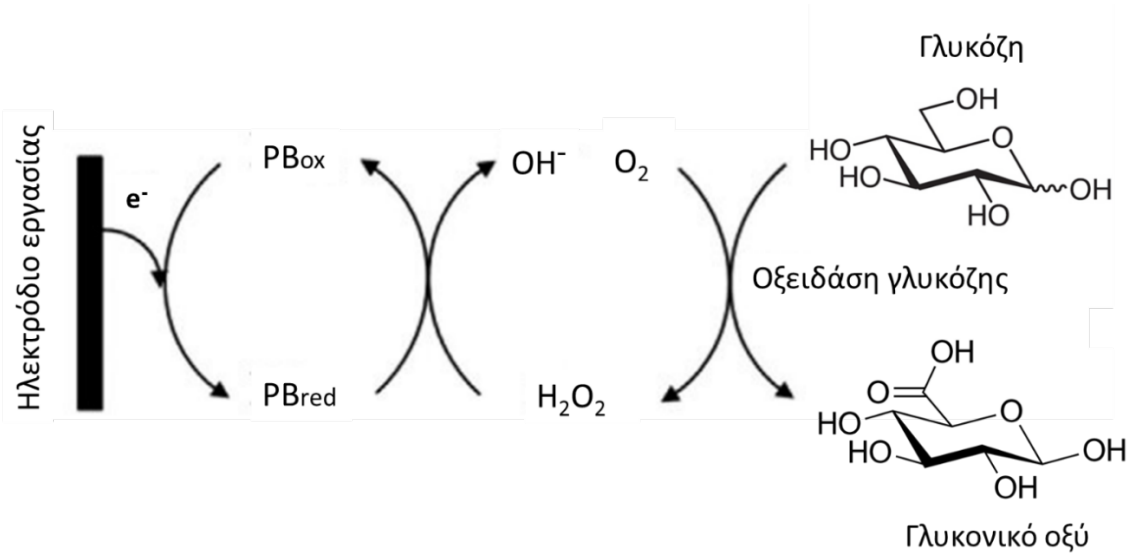
8.2 Προσδιορισμός γλυκόζης

8.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου

Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία των ηλεκτροδίων προς τα υποστρώματα ενζύμων οξειδάσης μπορούν να αυξηθούν με μορφοποίηση των ηλεκτροδίων με Prussian Blue (PB), το οποίο μπορεί να καταλύσει αποτελεσματικά και επιλεκτικά την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για το λόγο αυτό χρησιμεύει ως διαμεσολαβητής για την ανίχνευση διαφόρων βιομορίων, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης^[267-269].

Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα γλυκόζης, η 3D συσκευή βυθίστηκε σε διάλυμα Prussian Blue και υποβλήθηκε σε δέκα συνεχόμενους κύκλους κυκλικής βολταμμετρίας σε εύρος δυναμικού από $-0,9$ V έως $1,0$ V, ώστε ο διαμεσολαβητής να επιστρωθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Ακολούθως, αφού το ηλεκτρόδιο στέγνωσε, τοποθετήθηκαν στην επιφάνειά του, 5 μ L διαλύματος οξειδάσης της γλυκόζης (750 kU mL^{-1} , GOx), αφέθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω προσρόφησης, και ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο τέλος, 5 μ L διαλύματος Nafion 1% κ.ο. εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του στεγνού ηλεκτροδίου και επίσης, αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Η κυκλική βολταμμετρία (CV) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών $0,1$ mol L^{-1} (pH 4) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} . Το pH του επιδερμικού δέρματος και επομένως ο ιδρώτας που εκκρίνεται κυμαίνεται, από $4-7,5$, καθώς ο όξινος μανδύας καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος^[270]. Γι' αυτό το λόγο ο προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά, σε στατικό διάλυμα φωσφορικών [$0,1$ mol L^{-1} (pH 4)]. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ως προς το 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς CB/PLA, ήταν $-0,7$ V. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γλυκόζης σε συνθετικό ιδρώτα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε δοκιμή σε πραγματικό ιδρώτα, ακουμπώντας το άκρο ενός δακτύλου στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα γλυκόζης (Εικόνα 5), όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί το φιλμ PVA. Ο ενζυματικός προσδιορισμός της γλυκόζης στηρίζεται στον αμπερομετρικό προσδιορισμό του παραγόμενου H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:

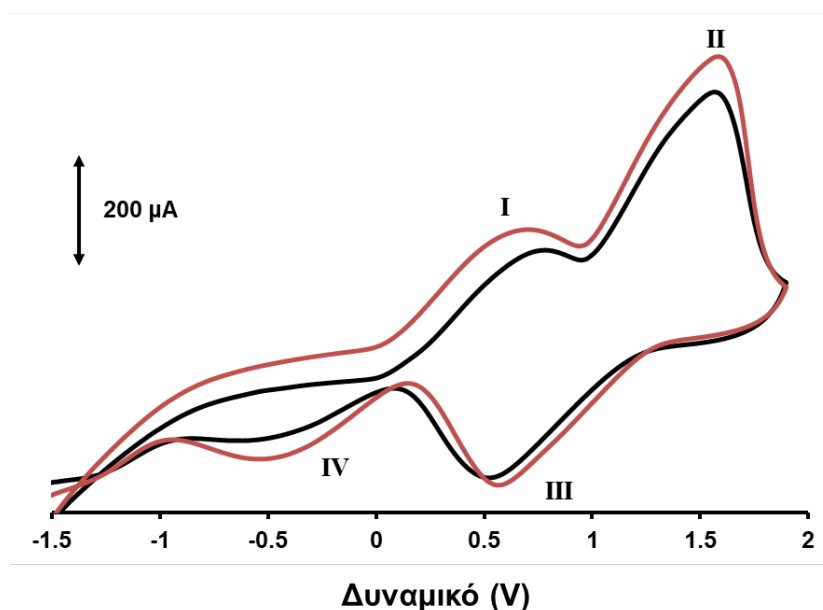


Σχήμα 40. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης γλυκόζης στο ηλεκτρόδιο εργασίας, όπου PB_{ox} : η οξειδωμένη μορφή και PB_{red} : η ανηγμένη μορφή του εναποτιθέμενου Prussian Blue.

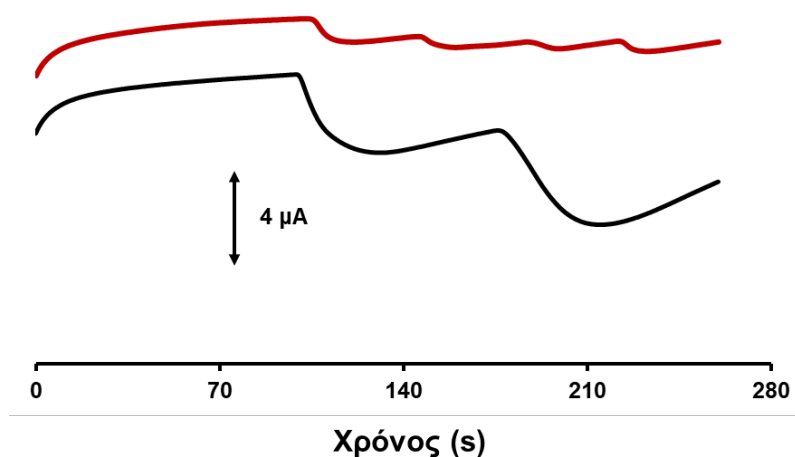
8.2.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα γλυκόζης

Ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος βιοαισθητήρας της γλυκόζης χαρακτηρίστηκε με κυκλική βολταμετρία (CV) σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) απουσία και παρουσία γλυκόζης, σαρώνοντας το δυναμικό από $-1,5$ έως 2 V .

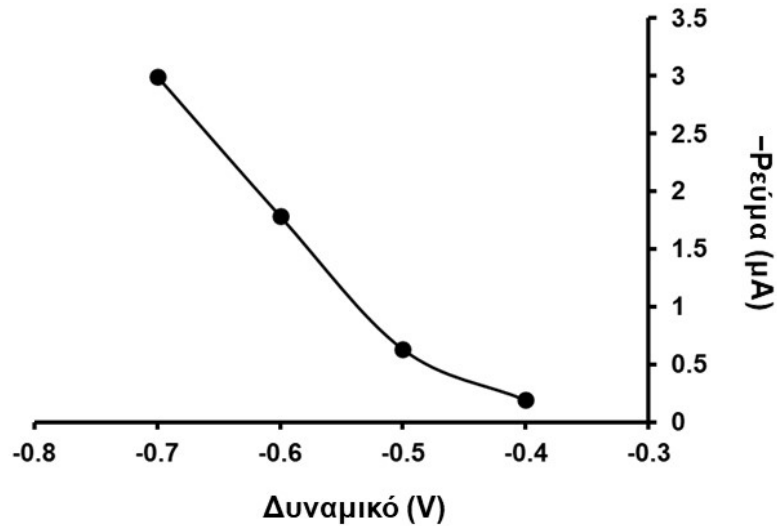
Στα συγκριτικά κυκλικά βολταμογραφήματα απεικονίζονται οι αποκρίσεις του βιοαισθητήρα με διαμεσολαβητή PB (10 κύκλοι) και ακινητοποιημένη οξειδάση της γλυκόζης, απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 500 μmol L^{-1} γλυκόζης (κόκκινη γραμμή) (Σχήμα 41). Όπως απεικονίζεται στο κυκλικό βολταμογράφημα του βιοαισθητήρα με PB/GOx, διακρίνονται δύο κορυφές οξειδωσης (I, II) που οφείλονται στην οξείδωση του Prussian White (PW) σε PB (κορυφή I) και στην οξείδωση του PB σε Berlin Green (BG). Η κορυφή III οφείλεται στην αναγωγή του BG σε PB και η κορυφή IV, στην αναγωγή του PB σε PW^[271]. Συγκεκριμένα, η οξειδωμένη και η ανηγμένη μορφή του PB είναι ικανές να οξειδώνουν και ανάγουν ηλεκτροκαταλυτικά το υπεροξείδιο του υδρογόνου, που παράγεται από την ενζυμική αντίδραση, καθώς οι κορυφές II και IV αυξάνονται παρουσία γλυκόζης. Αυτό φαίνεται και από την αύξηση της ευαισθησίας των αμπερομετρικών αποκρίσεων προσδιορισμού γλυκόζης παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας PB (Σχήμα 42). Ως δυναμικό εφαρμογής για τους αμπερομετρικούς προσδιορισμούς επιλέχθηκε το $-0,7 \text{ V}$, με βάση τα κυκλικά βολταμογραφήματα του Σχήματος 41 και το Σχήμα 43.



Σχήμα 41. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα γλυκόζης PB/GOx απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 500 μmol L⁻¹ γλυκόζης (κόκκινη γραμμή).

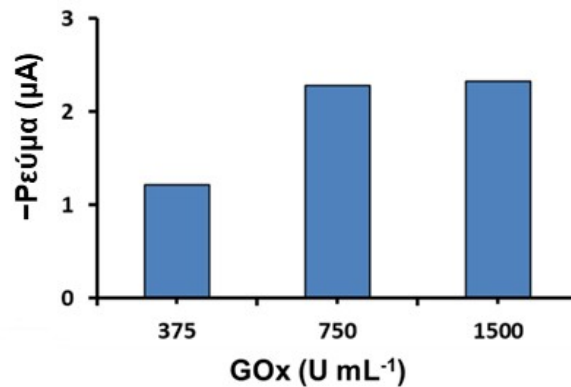


Σχήμα 42. Η επίδραση της ποσότητας του Prussian Blue στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε διαδοχικές προσθήκες 30 μmol L⁻¹ γλυκόζης. Ο διαμεσολαβητής επιστρώθηκε στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα με δέκα συνεχόμενους κύκλους κυκλικής βολταμμετρίας σε εύρος δυναμικού από -0,9 V έως 1,0 V (μαύρη γραμμή) και με έναν κύκλο (κόκκινη γραμμή).



Σχήμα 43. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) που περιέχει 30 μmol L^{-1} γλυκόζης.

Μελετήθηκε ακόμη η συγκέντρωση του ενζύμου GOx, από $375 - 1500 \text{ U mL}^{-1}$ (Σχήμα 44), με τα 750 kU mL^{-1} GOx να επιλέγονται τελικά.

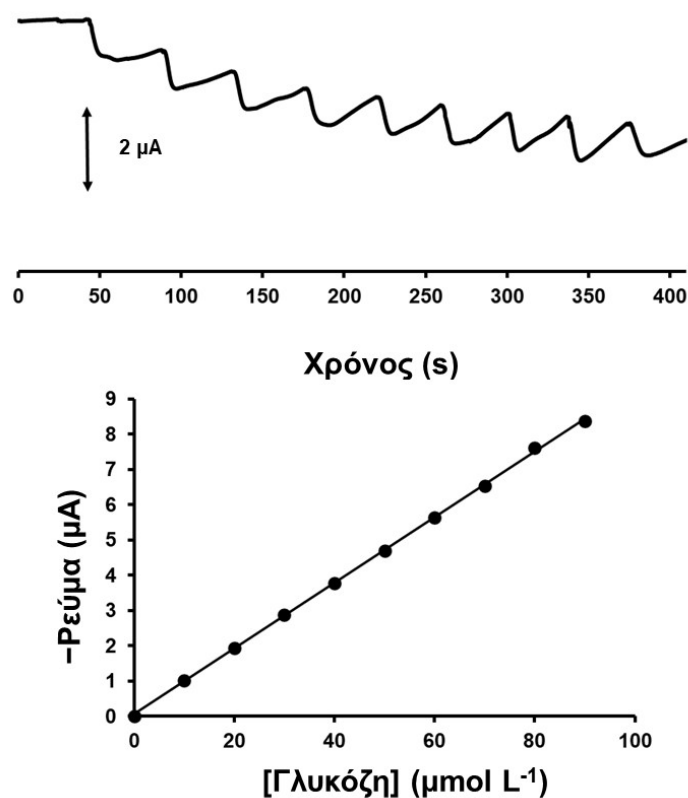


Σχήμα 44. Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης γλυκόζης ($375 - 1500 \text{ U mL}^{-1}$) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε 30 μmol L^{-1} γλυκόζης.

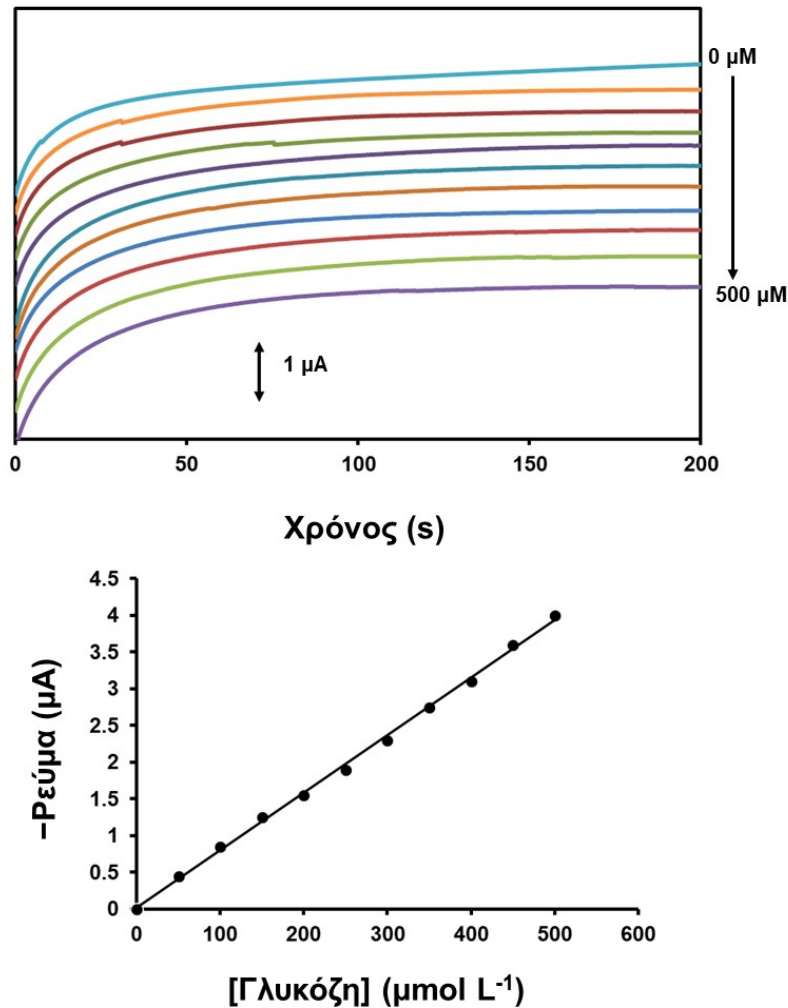
8.2.3 Καμπύλες αναφοράς

Λήφθηκαν δύο καμπύλες αναφοράς, κατασκευασμένες με αμπερομετρία και χρονοαμπερομετρία. Στην αμπερομετρία, λήφθηκαν χωρίς ανάδευση εννιά διαδοχικές

προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης, με εφαρμοζόμενο δυναμικό $-0,7 \text{ V}$ σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) (Σχήμα 45), ενώ στη χρονοαμπερομετρία λήφθηκαν δέκα διαδοχικές προσθήκες γλυκόζης των $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ χωρίς ανάδευση (Σχήμα 46).



Σχήμα 45. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε 9 διαδοχικές προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4). Κάτω: η σχετική καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 46. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις ενός βιοαισθητήρα γλυκόζης παρουσία 0 έως 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (ανά 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} με pH 4. Κάτω: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

Η γραμμικότητα της καμπύλης για τη γλυκόζη και στις δύο περιπτώσεις ήταν ικανοποιητική για εύρος συγκεντρώσεων 0 – 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ για την πρώτη μέθοδο, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9997 και για εύρος συγκεντρώσεων 0 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ για τη δεύτερη μέθοδο, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9951. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) ήταν 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 20,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, αντίστοιχα, που είναι ικανοποιητικά, λαμβάνοντας υπόψιν πως στον ανθρώπινο ιδρώτα τα επίπεδα γλυκόζης κυμαίνονται από 60 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [272,273]. Ο υπολογισμός των LODs έγινε χρησιμοποιώντας την εξίσωση $\text{LOD} = 3SD/\alpha$, όπου SD : η μέση τιμή της τυπικής απόκλισης και α : η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης. Τα όρια ανίχνευσης είναι συγκρίσιμα με αυτά άλλων ενζυμικών βιοαισθητήρων (Πίνακας 6).

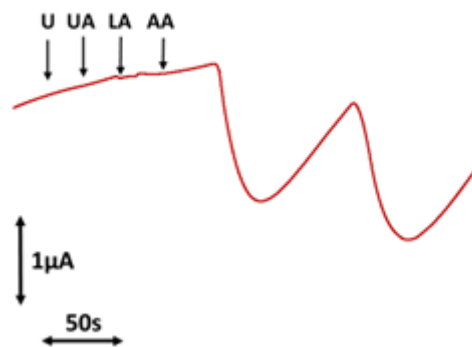
Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε, εξετάζοντας οκτώ διαφορετικούς βιοαισθητήρες. Οι αμπερομετρικές αποκρίσεις ενός διαλύματος που περιείχε 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης καταγράφηκαν και έδωσαν τιμή % σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) 5,2 %, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία κατασκευής και λειτουργίας του τρισδιάστατα εκτυπωμένου αισθητήρα.

Ηλεκτρόδιο	Γραμμικότητα	LOD	Εφαρμογή	Αναφορά
Nafion/GOx/Pt- νανοσύμπλεγμα/Prussian Blue-Au – Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα	3 – 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	–	274
Prussian Blue/Οξειδίο γραφενίου/GOx – Ηλεκτρόδιο Pt	2 – 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Πλάσμα αίματος	275
GOx-γέλη-Οξειδίο γραφενίου (ανηγμένο)-Au – Ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας	1,25 – 850 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 0,85 – 7,72 mmol L^{-1}	1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	276
Οξειδίο γραφενίου (ανηγμένο)- GOx/επαγωγή με λείζερ – διαψηφιακό ηλεκτρόδιο	0,01 – 3,0 mmol L^{-1}	0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	277
Nafion/GOx/Οξειδίο γραφενίου (ανηγμένο)/SiO ₂ –νανοσωλήνας άνθρακα με PDMS (πολυ- διμεθυλοσιλοξάνη)	0,1 – 9 mmol L^{-1}	3,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	278
GOx/Χιτοζάνη – σπόγγος γραφενίου/Prussian Blue	8,17 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	279
Σύμπλεγμα MoS ₂ @MnO ₂ /GOx	0 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	280
GOx/Κβαντικές κουκκίδες N- γραφενίου/Πολυ(ανιλίνη)– Ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας	0 – 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$	34 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Συνθετικός ιδρώτας	281
Νανοϊνα μεταξιού/Οξειδίο γραφενίου (ανηγμένο)/GOx	0 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 100 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	282
3D εκτυπωμένος βιοαισθητήρας PB/GOx	0 – 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 0 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Συνθετικός ιδρώτας	Παρούσα μελέτη

Πίνακας 6. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ενζυμικών βιοαισθητήρων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό γλυκόζης, συγκριτικά με τον βιοαισθητήρα της παρούσας εργασίας.

8.2.4 Παρεμποδίσεις

Ορισμένες ουσίες που υπάρχουν στα βιολογικά δείγματα, πιθανώς να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της γλυκόζης. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση των συνηθέστερων ενώσεων που ενδέχεται να επηρεάσουν τις μετρήσεις [ουρία (U), ουρικό οξύ (UA), γαλακτικό οξύ (LA) και ασκορβικό οξύ (AA)] με την προσθήκη τους στο διάλυμα (10 mL διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ με pH 4), ακολουθούμενη από δύο διαδοχικές προσθήκες 10 μL διαλύματος γλυκόζης $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Οι συγκεκριμένες ουσίες δεν παρεμπόδισαν τις αποκρίσεις του βιοαισθητήρα στη γλυκόζη, υποδεικνύοντας την καλή εκλεκτικότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου (Σχήμα 47).

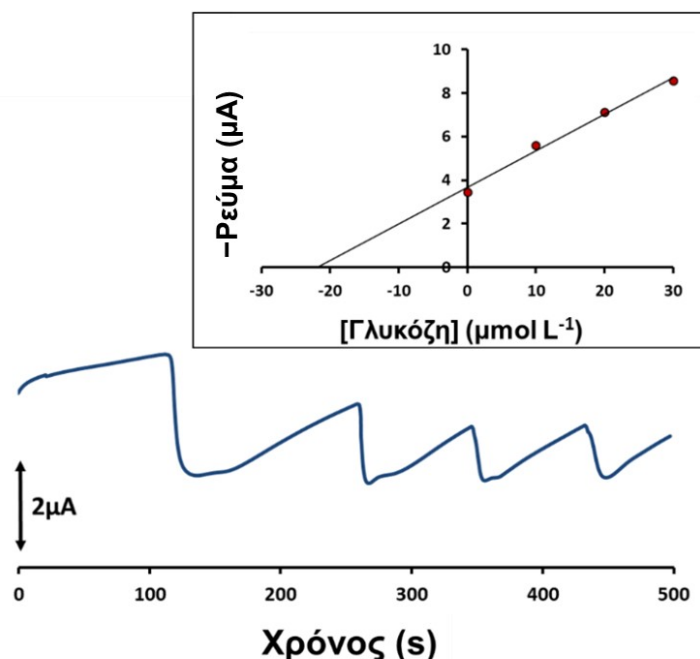


Σχήμα 47. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης έναντι στην προσθήκη 10 mmol L^{-1} ουρίας, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος, 55 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ασκορβικού οξέος και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης.

8.2.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

Για να εκτιμηθεί η αναλυτική ικανότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου ο βιοαισθητήρας γλυκόζης που κατασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης σε συνθετικό ιδρώτα. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε συνθετικός ιδρώτας με περιεκτικότητα σε γλυκόζη $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Στην ηλεκτροχημική κυψελίδα εισάχθηκαν 5 mL διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης πραγματοποιήθηκε προσθήκη 200 μL του παραπάνω διαλύματος και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Για να υπολογιστεί η τιμή ανάκτησης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σταθερής προσθήκης (Σχήμα 48). Η ίδια διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε 3 φορές και η μέση τιμή

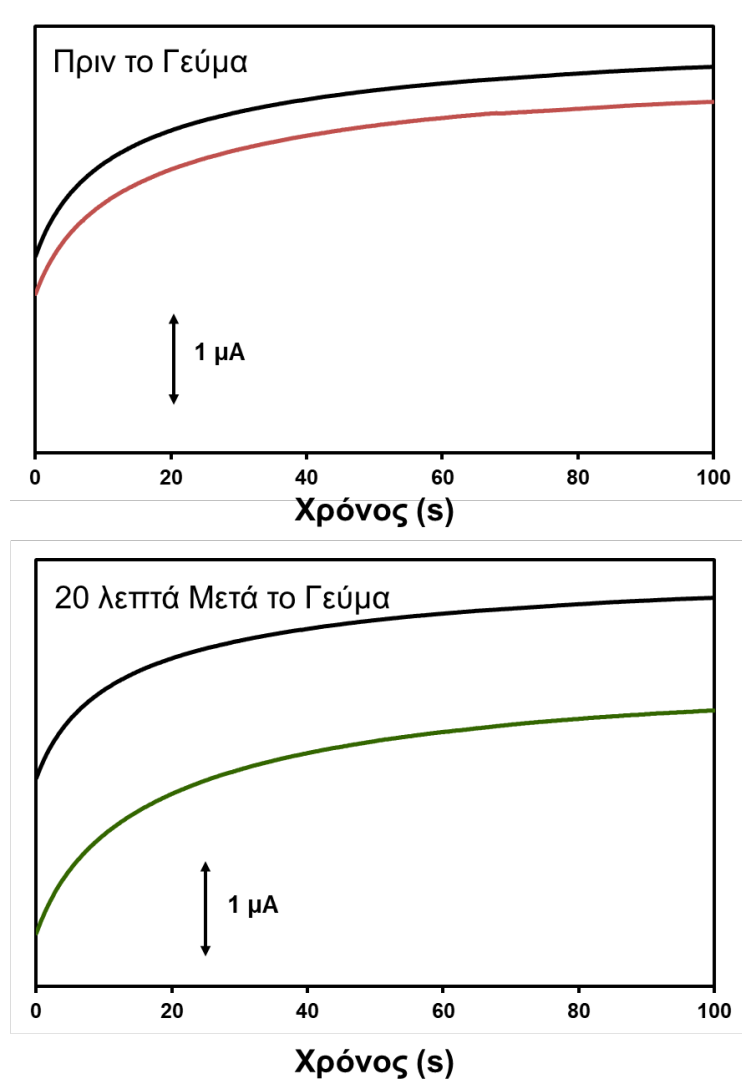
ανάκτησης που υπολογίστηκε ήταν 103 %, υποδεικνύοντας την καταλληλότητα και την ακρίβεια του 3D εκτυπωμένου βιοαισθητήρα για αναλύσεις σε βιολογικά δείγματα.



Σχήμα 48. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε δείγμα επιμολυσμένου με γλυκόζη συνθετικού ιδρώτα ακολουθούμενο από τρεις διαδοχικές προσθήκες 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο.

8.2.6 Απόκριση βιοαισθητήρα γλυκόζης σε πραγματικό ιδρώτα

Για να δοκιμαστεί η απόκριση του βιοαισθητήρα γλυκόζης σε πραγματικό ιδρώτα, χρησιμοποιήθηκε η 3D συσκευή της Εικόνας 5. Ένα κομμένο κομμάτι από την πολυμερική μεμβράνη PVA, τοποθετήθηκε πάνω στο ηλεκτροχημικό σύστημα, καλύπτοντας τις κυκλικές περιοχές των τριών ηλεκτροδίων. Οι τετραγωνικές περιοχές τους συνδέθηκαν μέσω συνδέσμων (crocodile clips) με τον ποτενσιοστάτη. Πριν από κάθε μέτρηση, η μεμβράνη διαποτιζόταν με μερικές σταγόνες 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών με pH 4. Αρχικά, λήφθηκε μέτρηση για 100 s. Ακολούθως, ένα νηστικό άτομο των 50 κιλών, ακούμπησε την άκρη ενός δακτύλου στην επιφάνεια της μεμβράνης συνεχόμενα για 2 λεπτά και έπειτα, λήφθηκε άλλη μία μέτρηση για 100 s. Η ίδια διαδικασία ακολούθησε 20 λεπτά κατόπιν κατανάλωσης γλυκίσματος. Τα διαγράμματα χρονοαμπερομετρικού προσδιορισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 49.



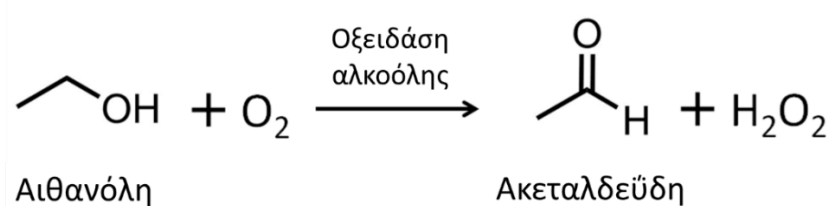
Σχήμα 49. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γλυκόζης με μεμβράνη PVA πριν από την τοποθέτηση του ανθρώπινου δακτύλου (μαύρες γραμμές), μετά την τοποθέτηση δακτύλου νηστικού ατόμου (κόκκινη γραμμή), και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου 20 λεπτά κατόπιν κατανάλωσης γεύματος (πράσινη γραμμή).

8.3 Προσδιορισμός αιθανόλης

8.3.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου

Ο βιοαισθητήρας αιθανόλης κατασκευάστηκε ως εξής: 5 mL διαλύματος οξειδάσης της αλκοόλης AOX (1:6 κ.ο. από διάλυμα 10 – 40 U mg⁻¹) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια της κυκλικής περιοχής του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας της συσκευής και αφέθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω προσρόφησης, και την ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, 5 mL διαλύματος Nafion 1% κ.ο. εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Η κυκλική βολταμμετρία (CV) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s⁻¹. Ο προσδιορισμός της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά σε στατικό διάλυμα φωσφορικών [0,1 mol L⁻¹ (pH 4)], σε κυψελίδα των 10 mL και παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ως προς το 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς CB/PLA ήταν -0,7 V. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης σε συνθετικό ιδρώτα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε δοκιμή σε πραγματικό ιδρώτα, ακουμπώντας το άκρο ενός δακτύλου στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα αιθανόλης, όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί το φιλμ PVA. Ο ενζυματικός προσδιορισμός αιθανόλης στηρίζεται στον αμπερομετρικό προσδιορισμό του παραγόμενου H₂O₂, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

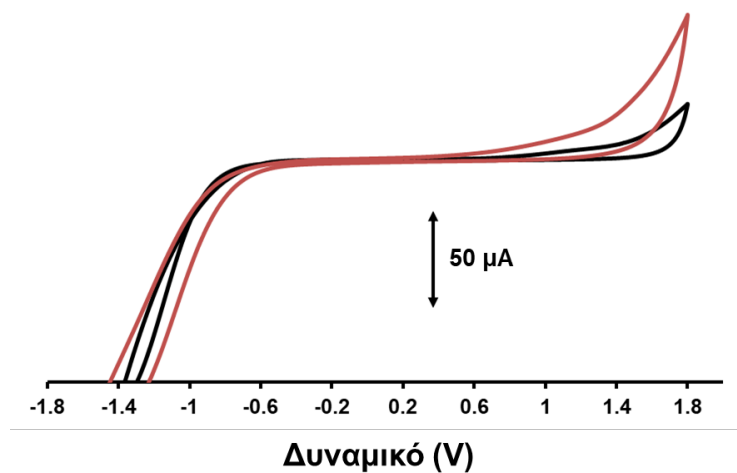


Σχήμα 50. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης της αιθανόλης στον βιοαισθητήρα.

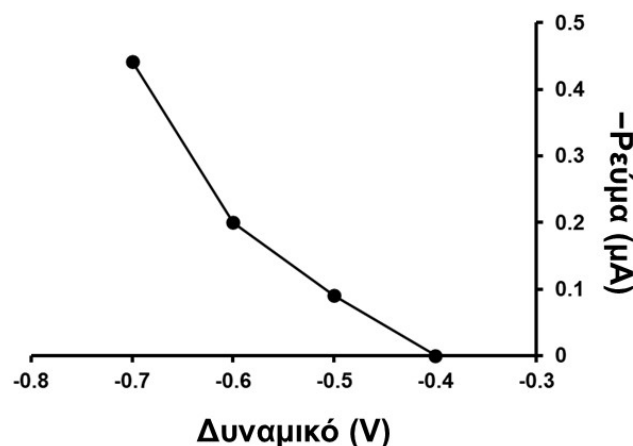
8.3.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα αιθανόλης

Ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος βιοαισθητήρας αιθανόλης χαρακτηρίστηκε με κυκλική βολταμμετρία (CV) σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 0,1 mol L⁻¹ (pH 4) απουσία και παρουσία αιθανόλης, σαρώνοντας το δυναμικό από -1,4 έως +1,8 V (Σχήμα 51). Όπως απεικονίζεται στα κυκλικά βολταμμογραφήματα, παρουσιάστηκε

ενίσχυση στο σήμα του ρεύματος από την αναγωγή του παραγόμενου H_2O_2 με την αύξηση συγκέντρωσης αιθανόλης στο διάλυμα, αποδεικνύοντας την καταλληλότητα του αισθητήρα για τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Όπως απεικονίζεται στο κυκλικό βολταμμογράφημα του βιοαισθητήρα με AOx (Σχήμα 52), παρουσία αιθανόλης παρουσιάζεται αύξηση του σήματος στο 1,0 V περίπου, λόγω οξειδωσης του παραγόμενου H_2O_2 , καθώς και αύξηση στα περίπου $-0,6$ V, λόγω αναγωγής του παραγόμενου H_2O_2 . Ως δυναμικό εφαρμογής για τους αμπερομετρικούς προσδιορισμούς επιλέχθηκε το $-0,7$ V, με βάση τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του Σχήματος 51 και το Σχήμα 52.



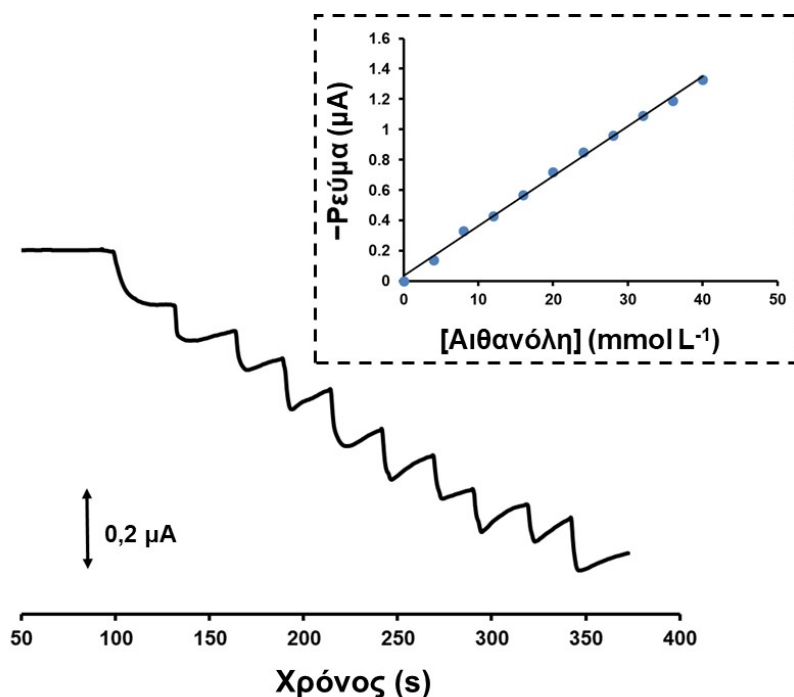
Σχήμα 51. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα αιθανόλης απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 20 mmol L^{-1} αιθανόλης (κόκκινη γραμμή).



Σχήμα 52. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ με $\text{pH } 4$, που περιέχει 12 mmol L^{-1} αιθανόλης.

8.3.3 Καμπύλες αναφοράς

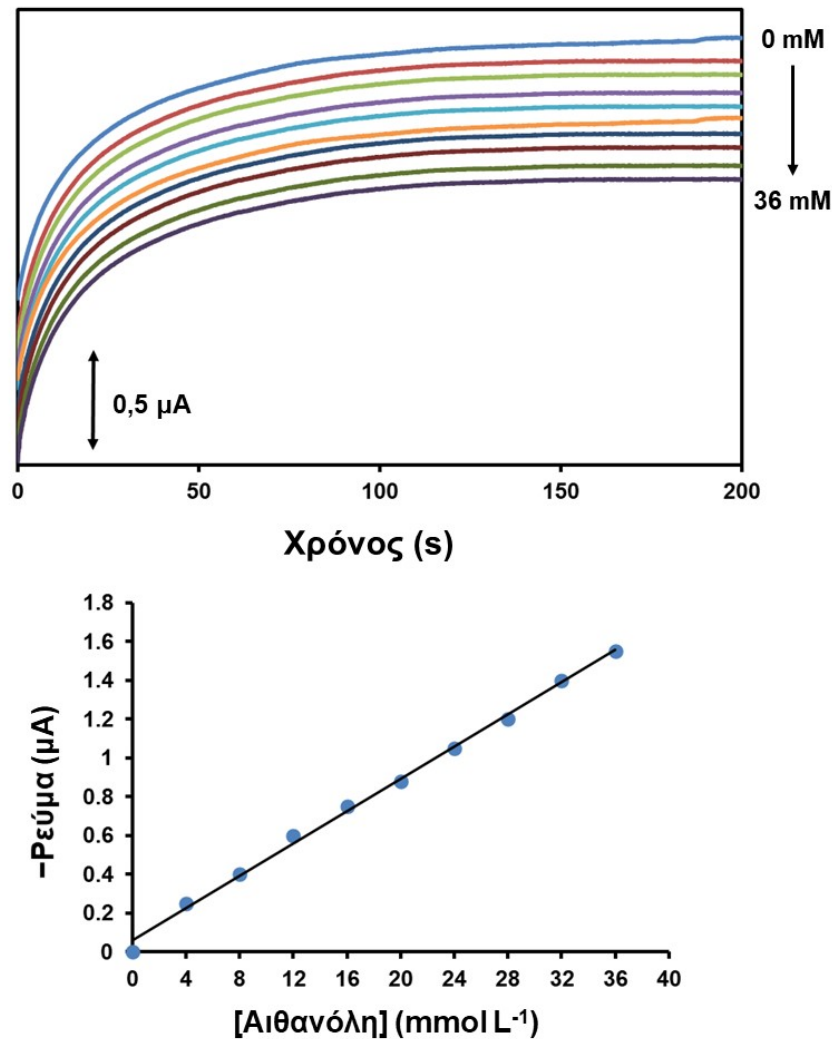
Η καμπύλη βαθμονόμησης της αιθανόλης λήφθηκε με δέκα διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L⁻¹ αιθανόλης σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ με pH 4. Το διάγραμμα αμπερομετρικού προσδιορισμού, καθώς και η σχετική καμπύλη αναφοράς παρατίθενται στο επόμενο σχήμα (Σχήμα 53).



Σχήμα 53. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε 10 διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L⁻¹ αιθανόλης σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4). Η σχετική καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται ως ένθετο.

Η γραμμικότητα της καμπύλης για την αιθανόλη ήταν ικανοποιητική για εύρος συγκεντρώσεων 0 έως 40 mmol L⁻¹, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9966. Το όριο ανίχνευσης ήταν 1,42 mmol L⁻¹. Ο υπολογισμός του LOD έγινε χρησιμοποιώντας την εξίσωση $LOD = 3SD/\alpha$.

Επίσης, κατασκευάστηκε και καμπύλη αναφοράς με χρονοαμπερομετρία με 9 διαδοχικές προσθήκες αιθανόλης των 4 mmol L⁻¹, χωρίς ανάδευση (Σχήμα 54). Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν 0,9968 και το LOD = 1,29 mmol L⁻¹.

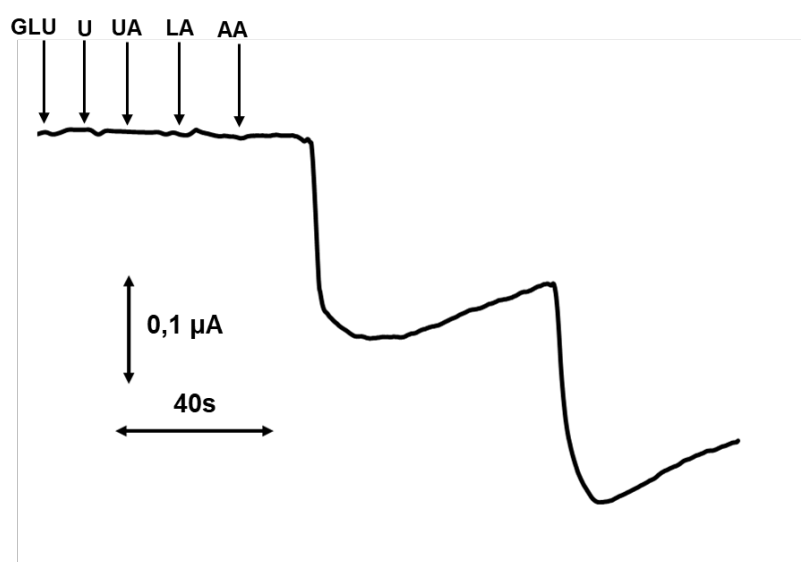


Σχήμα 54. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις ενός βιοαισθητήρα αιθανόλης παρουσία 0 έως 36 mmol L⁻¹ αιθανόλης (ανά 4 mmol L⁻¹ από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ με pH 4. Κάτω: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε, εξετάζοντας οκτώ διαφορετικούς βιοαισθητήρες. Οι αμπερομετρικές αποκρίσεις ενός διαλύματος που περιείχε 16 mmol L⁻¹ αιθανόλης καταγράφηκαν και έδωσαν τιμή % σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) 6,8 %, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία κατασκευής και λειτουργίας του τρισδιάστατα εκτυπωμένου αισθητήρα.

8.3.4 Παρεμποδίσεις

Για να εκτιμηθεί η εκλεκτικότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου, μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων ουσιών, που υπάρχουν στα βιολογικά δείγματα και ενδεχομένως να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η προσθήκη γλυκόζης (GLU), ουρίας (U), ουρικού οξέος (UA), γαλακτικού οξέος (LA) και ασκορβικού οξέος (AA) στο διάλυμα φωσφορικών (10 mL, 0,1 mol L⁻¹ με pH 4), ακολουθούμενη από 2 διαδοχικές προσθήκες 20 μL διαλύματος αιθανόλης 1 mol L⁻¹. Οι συγκεκριμένες ουσίες δεν παρεμπόδισαν τις αποκρίσεις του βιοαισθητήρα στην αιθανόλη, επιβεβαιώνοντας την εκλεκτικότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου (Σχήμα 55).

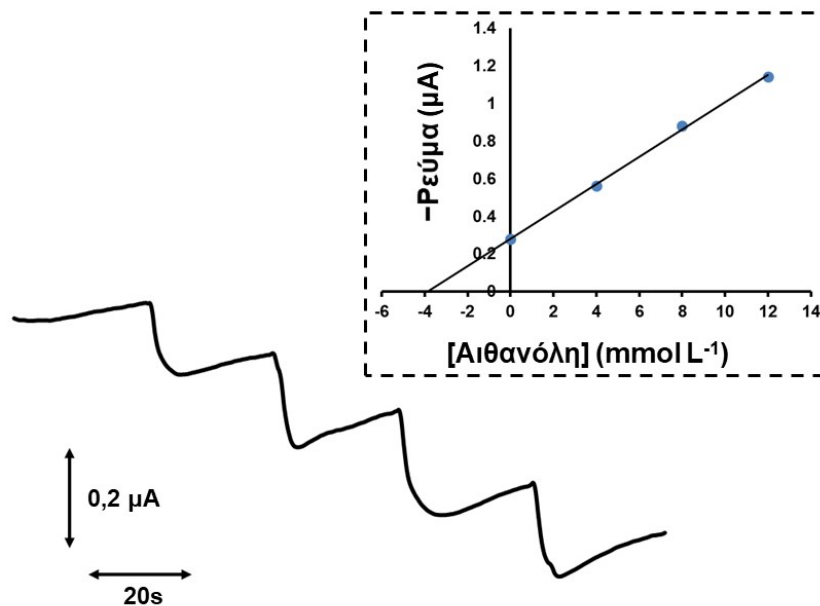


Σχήμα 55. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης έναντι στην προσθήκη 170 μmol L⁻¹ γλυκόζης, 10 mmol L⁻¹ ουρίας, 50 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος, 55 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος, 10 μmol L⁻¹ ασκορβικού οξέος και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες 5 mmol L⁻¹ αιθανόλης.

8.3.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

Ο βιοαισθητήρας αιθανόλης που κατασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό αιθανόλης σε συνθετικό ιδρώτα. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε συνθετικός ιδρώτας με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 100 mmol L⁻¹. Στην ηλεκτροχημική κυψελίδα εισάχθηκαν 5 mL διαλύματος φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης πραγματοποιήθηκε προσθήκη 200 μL του παραπάνω

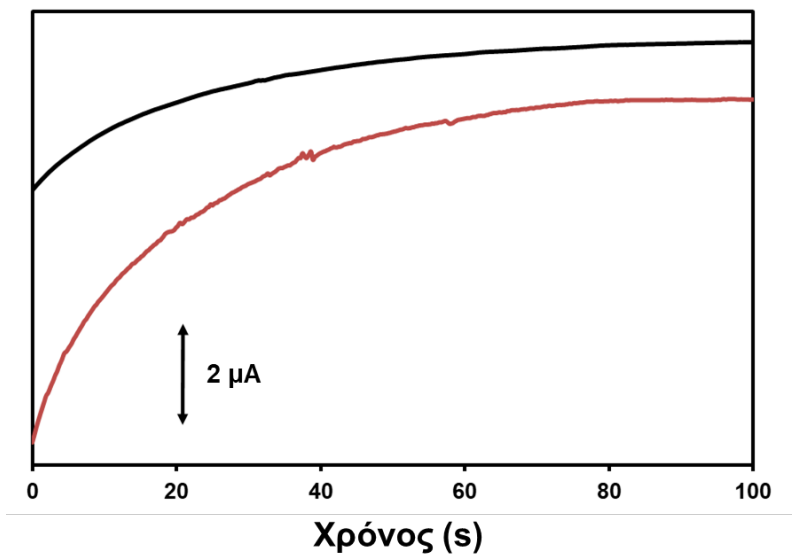
διαλύματος και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} αιθανόλης. Για να υπολογιστεί η τιμή ανάκτησης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σταθερής προσθήκης (Σχήμα 56). Η ίδια διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε 3 φορές και η μέση τιμή ανάκτησης που υπολογίστηκε ήταν $96,6 \%$, υποδεικνύοντας την καταλληλότητα και την ακρίβεια του 3D εκτυπωμένου βιοαισθητήρα για αναλύσεις σε βιολογικά δείγματα.



Σχήμα 56. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε δείγμα επιμολυσμένου με αιθανόλη συνθετικού ιδρώτα ακολουθούμενο από τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} αιθανόλης. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο.

8.3.6 Απόκριση βιοαισθητήρα αιθανόλης σε πραγματικό ιδρώτα

Η απόκριση του βιοαισθητήρα αιθανόλης σε πραγματικό ιδρώτα δοκιμάστηκε ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 8.2.6 για τη γλυκόζη, με τη διαφορά ότι αρχικά, λήφθηκε μία μέτρηση για 100 s και, κατόπιν το άτομο ακούμπησε την άκρη του δακτύλου στην επιφάνεια της μεμβράνης για 2 λεπτά συνεχόμενα αφού προηγουμένως το είχε βουτήξει σε διάλυμα αιθανόλης 20 mmol L^{-1} και έπειτα, λήφθηκε άλλη μία μέτρηση για 100 s (Σχήμα 57).



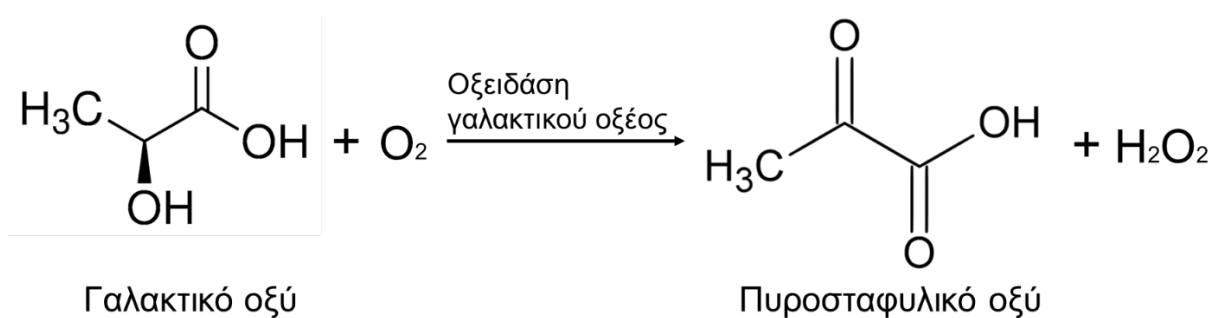
Σχήμα 57. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις βιοαισθητήρα αιθανόλης με μεμβράνη PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση δακτύλου που προηγουμένως είχε βουτηχθεί σε διάλυμα αιθανόλης 20 mmol L^{-1} (κόκκινη γραμμή).

8.4 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

8.4.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου

Ο βιοαισθητήρας γαλακτικού οξέος κατασκευάστηκε ως εξής: 5 μL διαλύματος οξειδάσης του γαλακτικού οξέος LOx ($49,2 \text{ U mL}^{-1}$) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια της κυκλικής περιοχής ενός 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου και αφέθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω προσρόφησης, και την ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, 5 μL διαλύματος Nafion 1% κ.ο. εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

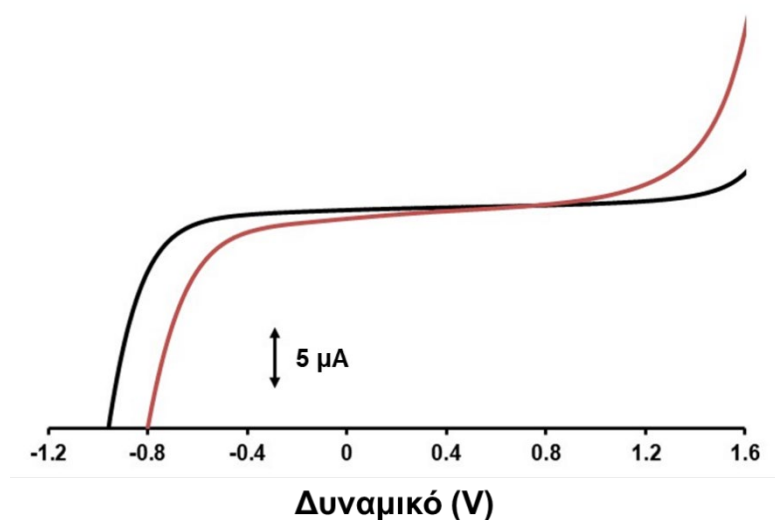
Η βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης (LS) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} . Ο προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά σε στατικό διάλυμα φωσφορικών [$0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4)] σε κυψελίδα των 10 mL και παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ως προς το 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς CB/PLA, ήταν $-0,7 \text{ V}$. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος σε συνθετικό ιδρώτα έγινε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε δοκιμή σε πραγματικό ιδρώτα, ακουμπώντας το άκρο ενός δακτύλου στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος, όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί το φιλμ PVA. Ο ενζυματικός προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος στηρίζεται στον αμπερομετρικό προσδιορισμό του παραγόμενου H_2O_2 , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σχήμα 58. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης του γαλακτικού οξέος στον βιοαισθητήρα.

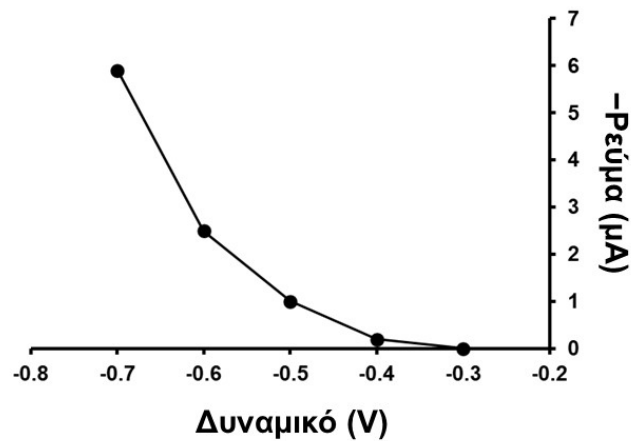
8.4.2 Χαρακτηρισμός και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος

Για να γίνει ο χαρακτηρισμός του τρισδιάστατα εκτυπωμένου βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκε βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), απουσία και παρουσία του γαλακτικού οξέος, σαρώνοντας το δυναμικό από $-1,6$ έως $1,6 \text{ V}$ (Σχήμα 59). Με την αύξηση της συγκέντρωσης του βιοδείκτη στο σύστημα, παρατηρήθηκε αύξηση στο σήμα του ρεύματος οξειδωσης και αναγωγής του παραγόμενου H_2O_2 , υποδεικνύοντας την ικανότητα του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος.

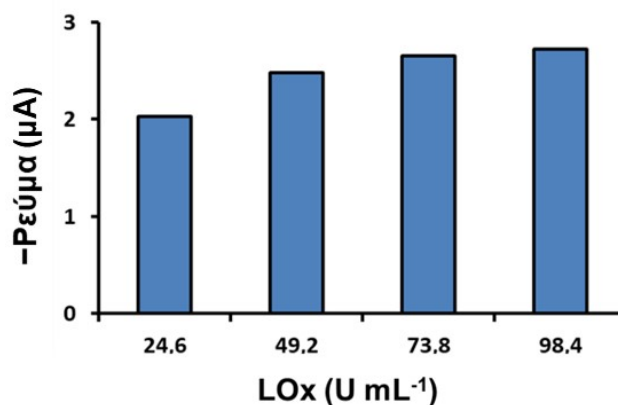


Σχήμα 59. Βολταμμογραφήματα γραμμικής σάρωσης που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία 40 mMol L^{-1} γαλακτικού οξέος (κόκκινη γραμμή).

Μελετήθηκαν οι βασικές παράμετροι προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος, οι οποίες επηρεάζουν τις αποκρίσεις του βιοαισθητήρα, συμπεριλαμβανομένου του εφαρμοζόμενου δυναμικού και τη συγκέντρωση του ενζύμου LOx. Οι βέλτιστες τιμές που επιλέχθηκαν ήταν: δυναμικό $-0,7 \text{ V}$ και $49,2 \text{ U mL}^{-1} \text{ LOx}$ (Σχήματα 60 – 61).



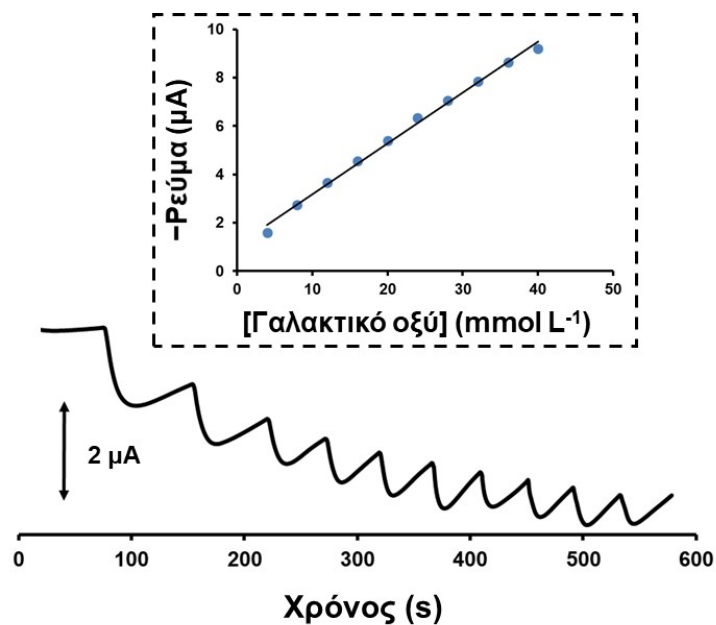
Σχήμα 60. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4) που περιέχει 20 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος.



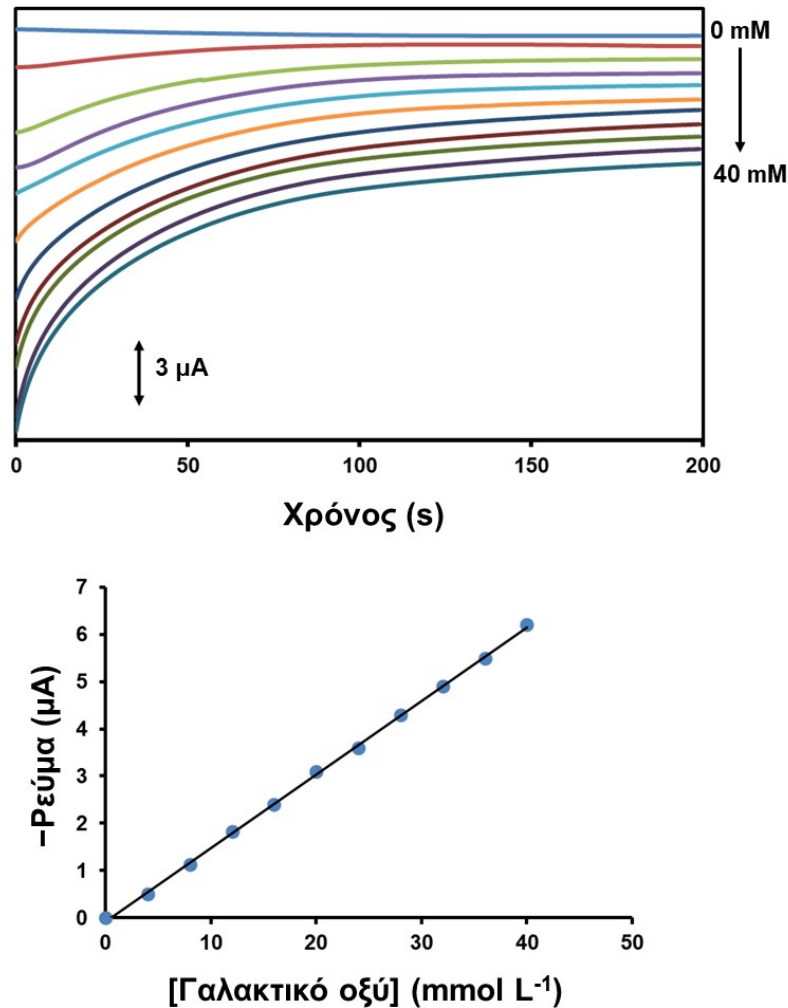
Σχήμα 61. Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης γαλακτικού οξέος ($24,6 - 98,4 \text{ U mL}^{-1}$) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε διάλυμα 8 mmol L^{-1} .

8.4.3 Καμπύλες αναφοράς

Λήφθηκαν δύο καμπύλες αναφοράς, κατασκευασμένες με αμπερομετρία και χρονοαμπερομετρία. Στην αμπερομετρία, λήφθηκαν χωρίς ανάδευση δέκα διαδοχικές προσθήκες των 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος με εφαρμοζόμενο δυναμικό $-0,7 \text{ V}$ σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) (Σχήμα 62), ενώ στη χρονοαμπερομετρία λήφθηκαν χωρίς ανάδευση δέκα διαδοχικές προσθήκες των 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (Σχήμα 63).



Σχήμα 62. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε 10 διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4). Η σχετική καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται ως ένθετο.



Σχήμα 63. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος παρουσία 0 έως 40 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (ανά 4 mmol L^{-1} από πάνω προς τα κάτω) σε μη αναδευόμενο διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} με pH 4. Κάτω: η σχετική καμπύλη αναφοράς.

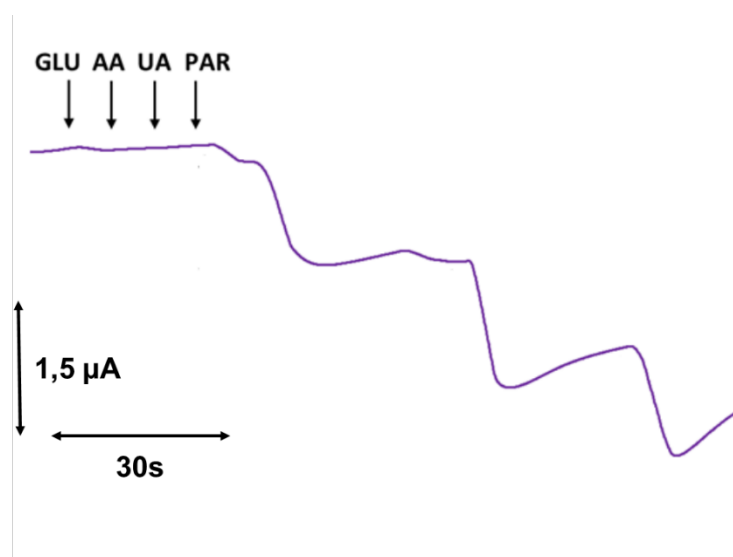
Η γραμμικότητα της καμπύλης για το γαλακτικό οξύ και στις δύο περιπτώσεις ήταν ικανοποιητική για εύρος συγκεντρώσεων 4 – 40 mmol L^{-1} για την πρώτη μέθοδο, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9954 και για εύρος συγκεντρώσεων 0 – 40 mmol L^{-1} για τη δεύτερη μέθοδο, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9975. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) ήταν 0,53 mmol L^{-1} και 0,31 mmol L^{-1} , αντίστοιχα, που είναι πολύ πιο χαμηλά από τα επίπεδα στον ανθρώπινο ιδρώτα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα γαλακτικού οξέος στον ανθρώπινο ιδρώτα κυμαίνονται από 10 έως 25 mmol L^{-1} . Ωστόσο, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, καθώς και υπό ισχαιμικές συνθήκες αυτά τα επίπεδα μπορεί να αυξηθούν έως και 80 mmol L^{-1} [283,284]. Ο υπολογισμός των LODs

έγινε χρησιμοποιώντας την εξίσωση $LOD = 3SD/\alpha$. Τα LODs που βρέθηκαν, είναι συγκρίσιμα με αυτά άλλων ενζυμικών βιοαισθητήρων για προσδιορισμό γαλακτικού οξέος^[285-287].

Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε, εξετάζοντας οκτώ διαφορετικούς βιοαισθητήρες. Οι αμπερομετρικές αποκρίσεις ενός διαλύματος που περιείχε 20 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος καταγράφηκαν και έδωσαν τιμή % σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) 5,8 %.

8.4.4 Παρεμπλοδίσεις

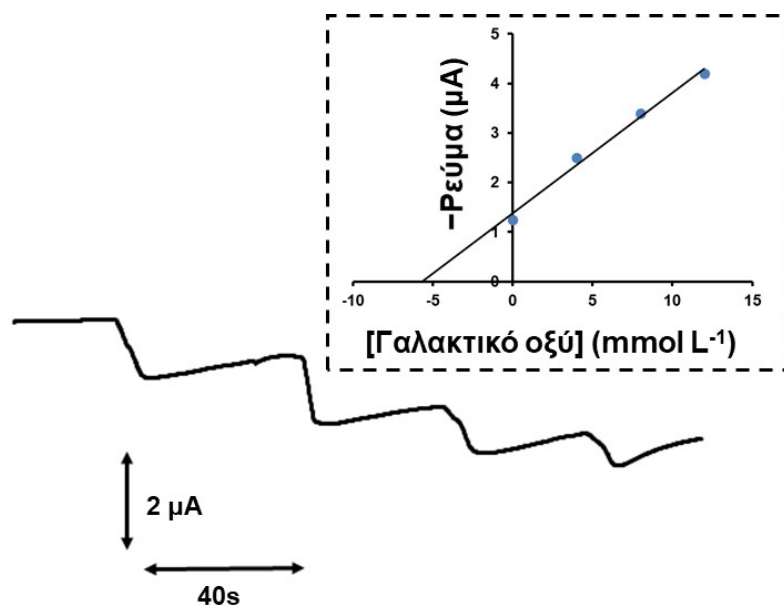
Ορισμένες ουσίες που υπάρχουν στα βιολογικά δείγματα, πιθανώς να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση των συνηθέστερων ουσιών που ενδέχεται να επηρεάσουν τις μετρήσεις [γλυκόζη (GLU), ουρικό οξύ (UA), ασκορβικό οξύ (AA), παρακεταμόλη (PAR)] με την προσθήκη τους στο διάλυμα φωσφορικών (10 mL, 0,1 mol L⁻¹ με pH 4), ακολουθούμενη από τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος. Οι συγκεκριμένες ουσίες δεν παρεμπόδισαν τις αποκρίσεις του βιοαισθητήρα στο γαλακτικό οξύ, υποδεικνύοντας την καλή εκλεκτικότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου (Σχήμα 64).



Σχήμα 64. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος έναντι στην προσθήκη 100 μmol L⁻¹ γλυκόζης, 6 mmol L⁻¹ ασκορβικού οξέος, 6 mmol L⁻¹ ουρικού οξέος, 66 μmol L⁻¹ παρακεταμόλης και έπειτα σε τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος.

8.4.5 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

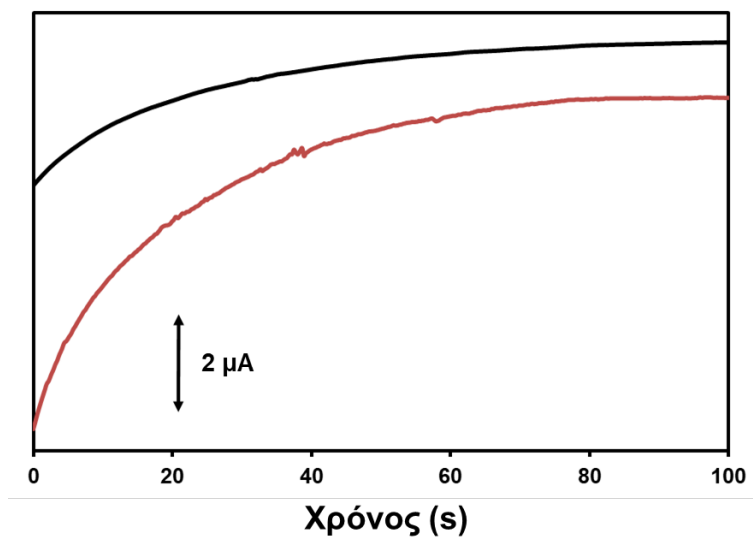
Ο βιοαισθητήρας γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος σε συνθετικό ιδρώτα. Παρασκευάστηκε συνθετικός ιδρώτας με περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ 80 mmol L^{-1} . Στην ηλεκτροχημική κυψελίδα εισάχθηκαν 5 mL διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης πραγματοποιήθηκε προσθήκη $350 \mu\text{L}$ του παραπάνω διαλύματος και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (Σχήμα 65). Η ίδια διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε 3 φορές και η μέση τιμή ανάκτησης που υπολογίστηκε ήταν 101% .



Σχήμα 65. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε προσθήκη $350 \mu\text{L}$ συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με 80 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος και έπειτα σε τρεις διαδοχικές προσθήκες 4 mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος. Η αντίστοιχη καμπύλη σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται ως ένθετο.

8.4.6 Απόκριση βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε πραγματικό ιδρώτα

Η απόκριση του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος σε πραγματικό ιδρώτα δοκιμάστηκε ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 8.2.6 για τη γλυκόζη, με τη διαφορά ότι αρχικά, λήφθηκε μία μέτρηση για 100 s και, κατόπιν το άτομο ακούμπησε την άκρη ενός δακτύλου στην επιφάνεια της μεμβράνης για 2 λεπτά συνεχόμενα, αφού προηγουμένως το είχε βουτήξει σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 10 mmol L^{-1} , και έπειτα, λήφθηκε άλλη μία μέτρηση (Σχήμα 66).



Σχήμα 66. Χρονοαμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα γαλακτικού οξέος με PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου, που είχε προηγουμένως βουτηχθεί σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 10 mmol L^{-1} (κόκκινη γραμμή).

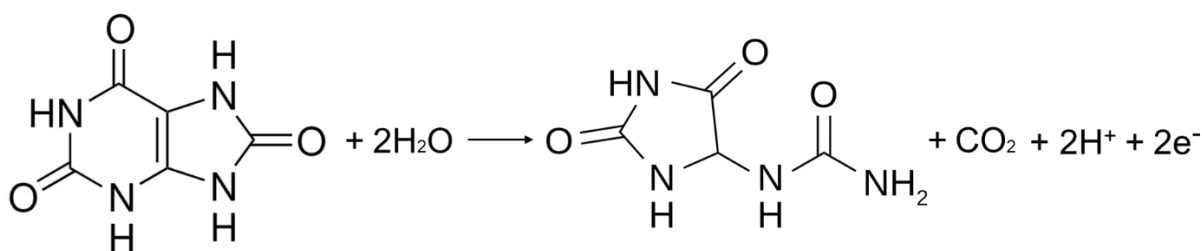
8.5 Ταυτόχρονος προσδιορισμός ουρικού οξέος και καφεΐνης

8.5.1 Αρχές ηλεκτροχημικών μεθόδων

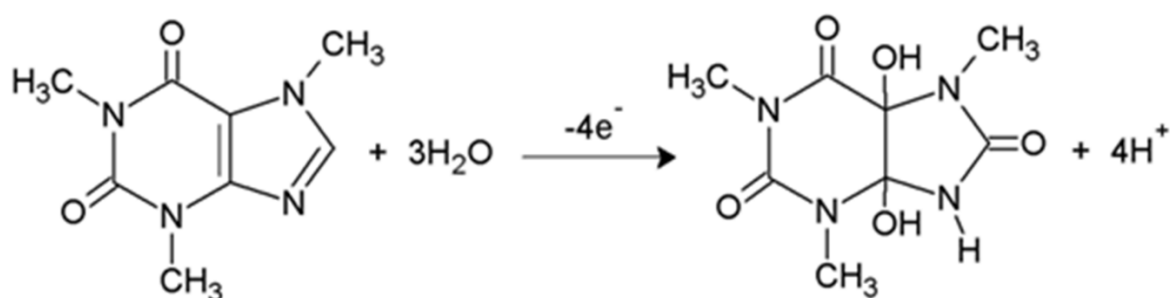
Για τον ταυτόχρονο βολταμετρικό προσδιορισμό του ουρικού οξέος και της καφεΐνης, απαιτούνταν στάδιο ενεργοποίησης του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας με κυκλική βολταμετρία. Για το σκοπό αυτό, ο αισθητήρας τοποθετείται σε ηλεκτροχημική κυψελίδα των 10 mL, που περιέχει διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ με pH 4. Η ενεργοποίηση αποτελείται από δύο στάδια: κατά το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης εφαρμόζεται δυναμικό 1,8 V για 200 s και έπειτα γίνεται σάρωση από 1,8 V μέχρι $-1,8 \text{ V}$. Κατά το δεύτερο στάδιο της ενεργοποίησης εφαρμόζεται δυναμικό $-1,8 \text{ V}$ για 200 s και γίνεται σάρωση από $-1,8 \text{ V}$ μέχρι 1,8 V.

Έχει αποδειχθεί ότι μετά από ανοδική πόλωση ηλεκτροδίων τύπου άνθρακα, ηλεκτροπαράγεται επί τόπου στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων το οξειδίο του γραφενίου και άλλες λειτουργικές ομάδες, ενώ η επακόλουθη καθοδική πόλωση μετατρέπει το ηλεκτροχημικά παραγόμενο οξειδίο του γραφενίου σε ηλεκτροχημικά ενεργό ανηγμένο οξειδίο του γραφενίου, βελτιώνοντας περαιτέρω τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες των ηλεκτροδίων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η ηλεκτροχημική επεξεργασία του τρισδιάστατα εκτυπωμένου CB/PLA ηλεκτροδίου αφαιρεί μέρος του πολυμερούς υλικού από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκθεσης του ενεργού ανθρακικού περιεχομένου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου^[288].

Η κυκλική βολταμετρία (CV) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} . Για τις βολταμετρικές μετρήσεις διαφορικού παλμού του ουρικού οξέος και της καφεΐνης, το διάλυμα αναδεύτηκε στις 1000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 120 s εφαρμόζοντας δυναμικό $-1,4 \text{ V}$, ενώ η βολταμετρική σάρωση, έγινε χωρίς ανάδευση. Ως ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4). Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς τόσο σε ηλεκτρολύτη όσο και σε συνθετικό ιδρώτα. Η δοκιμή σε πραγματικό ιδρώτα πραγματοποιήθηκε, ακουμπώντας το άκρο ενός δακτύλου στην επιφάνεια του ηλεκτροχημικού αισθητήρα, όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί το φιλμ PVA. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί των αντιδράσεων του ουρικού οξέος και της καφεΐνης, παρουσιάζονται στα ακόλουθα σχήματα:



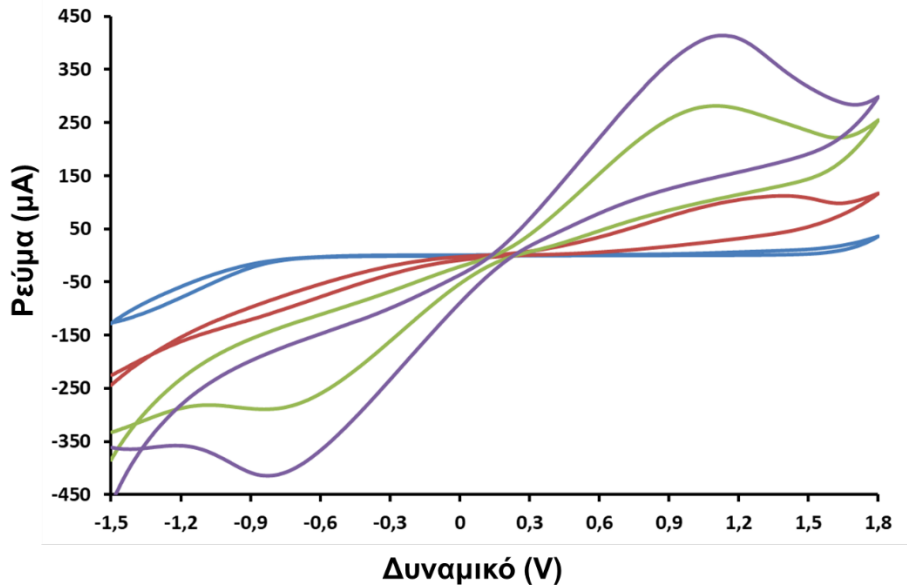
Σχήμα 67. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης ουρικού οξέος στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας.



Σχήμα 68. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης καφεΐνης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας.

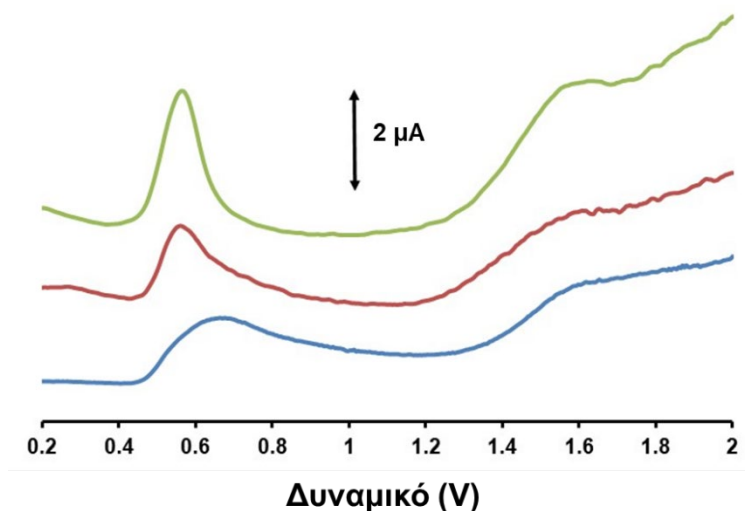
8.5.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα

Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία, πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου εργασίας. Τα στάδια ενεργοποίησης περιγράφονται στην προηγούμενη υποενότητα. Στο παρακάτω σχήμα, παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα που έχουν ληφθεί σε μη ενεργοποιημένο και ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας, με διάφορους χρόνους ενεργοποίησης, σε διάλυμα $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, σαρώνοντας το δυναμικό από $-1,5$ έως $1,8 \text{ V}$. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 69, η ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου έδωσε ενισχυμένο σήμα ρεύματος.



Σχήμα 69. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που λήφθηκαν με μη ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας σε διάλυμα $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ απουσία (μπλε γραμμή) και παρουσία $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (κόκκινη γραμμή) και με ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο για 100 (πράσινη γραμμή) και 200 δευτερόλεπτα (μωβ γραμμή), παρουσία $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$.

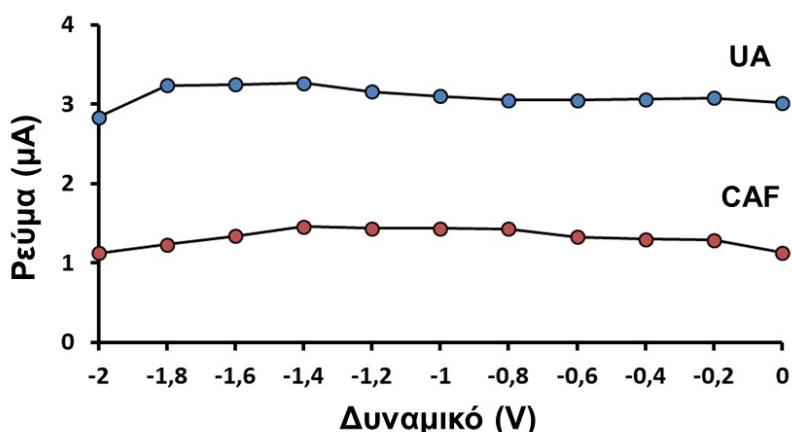
Στο Σχήμα 70, παρουσιάζονται τα βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού (DP) για ηλεκτρόδιο εργασίας μη ενεργοποιημένο και ενεργοποιημένο σε 2 διαφορετικούς χρόνους παρουσία 20 μmol L^{-1} ουρικού οξέος και 15 μmol L^{-1} καφεΐνης σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με εφαρμογή δυναμικού $-1,4 \text{ V}$ για 120 s . Οι καλύτερες αποκρίσεις των κορυφών οξειδωσης του ουρικού οξέος ($\sim 0,5 \text{ V}$) και της καφεΐνης ($\sim 1,5 \text{ V}$) επιτεύχθηκαν με ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου για 200 s .



Σχήμα 70. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 4$), παρουσία $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος και $15 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνης, σε μη ενεργοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας (μπλε) και σε ηλεκτρόδιο με ενεργοποίηση για 100 (κόκκινο) και 200 δευτερόλεπτα (πράσινο).

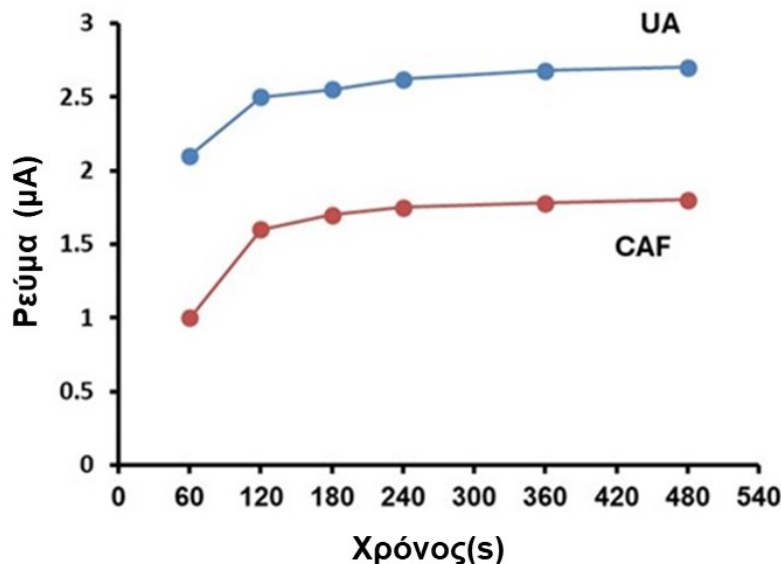
8.5.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού ουρικού οξέος και καφεΐνης

Η εφαρμογή δυναμικού δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τις βολταμμετρικές αποκρίσεις των δύο αναλυτών. Στην περίπτωση της καφεΐνης, η κορυφή οξειδωσής της, αυξήθηκε ελάχιστα σε δυναμικό εφαρμογής $-1,4 \text{ V}$. Για το λόγο αυτό, ως δυναμικό εφαρμογής επιλέχθηκε η συγκεκριμένη τιμή (Σχήμα 71).



Σχήμα 71. Μεταβολή του ύψους των κορυφών οξειδωσής του ουρικού οξέος (UA) και της καφεΐνης (CAF) συγκέντρωσης $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ και $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 4$), συναρτήσεως του δυναμικού εφαρμογής. Χρόνος εφαρμογής: 120 s .

Όσον αφορά στο χρόνο εφαρμογής δυναμικού, η επίδρασή του εξετάστηκε για χρονικό διάστημα 0 – 480 s σε διάλυμα που περιείχε 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος και 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Όπως δείχνει το Σχήμα 72, σε χαμηλούς χρόνους εφαρμογής δυναμικού (έως 120 s) οι κορυφές οξειδωσης των αναλυτών αυξήθηκαν και μετά σταθεροποιήθηκαν. Τελικά επιλέχθηκαν τα 120 s ως χρόνος εφαρμογής.



Σχήμα 72. Μεταβολή του ύψους των κορυφών οξειδωσης του ουρικού οξέος (UA) και της καφεΐνης (CAF) συγκέντρωσης 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 4), συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής. Δυναμικό εφαρμογής: $-1,4 \text{ V}$.

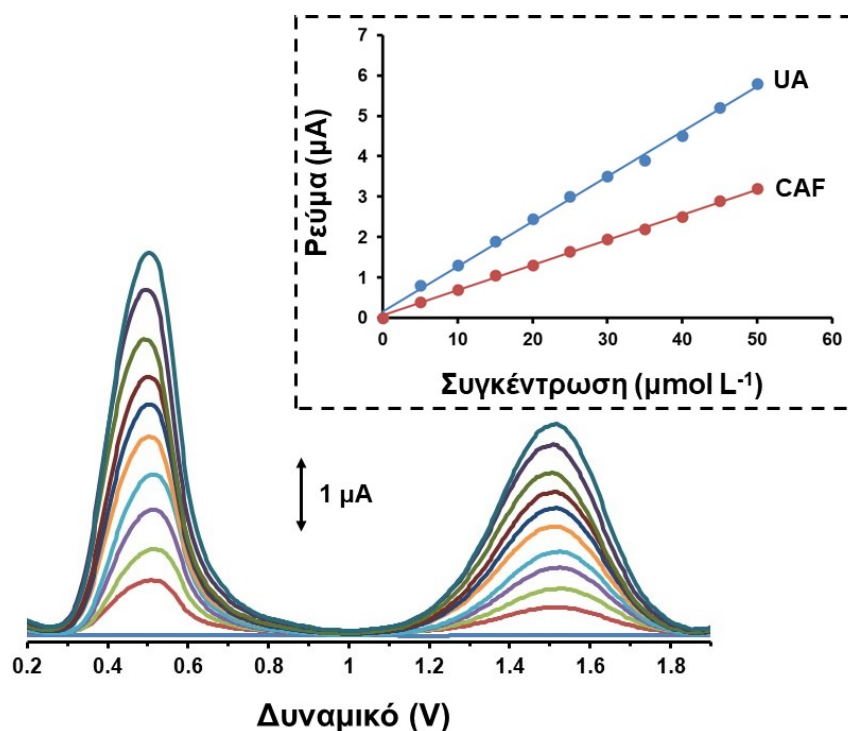
Οι βέλτιστες συνθήκες, προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ευαισθησία σε σύντομο χρόνο ανάλυσης, λαμβάνοντας καλοσχηματισμένες κορυφές και χαμηλή επίδραση υποβάθρου, ήταν σε συχνότητα 50 Hz, βήμα αύξησης 10 mV, ύψος παλμού 50 mV, χρόνο εφαρμογής δυναμικού 120 s και εφαρμοζόμενο δυναμικό $-1,4 \text{ V}$.

8.5.4 Καμπύλες αναφοράς

Οι καμπύλες αναφοράς του ουρικού οξέος και της καφεΐνης λήφθηκαν σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 4) σε ηλεκτροχημική κυψελίδα των 10 mL στις βέλτιστες συνθήκες (δυναμικό εφαρμογής: $-1,4 \text{ V}$, χρόνος εφαρμογής δυναμικού: 120 s). Οι κορυφές οξειδωσης παρουσίασαν γραμμική εξάρτηση με τη συγκέντρωση, στο εύρος

5 – 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ για το ουρικό οξύ με $R^2 = 0,9974$ και στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης για την καφεΐνη με $R^2 = 0,9985$ (Σχήμα 73).

Τα όρια ανίχνευσης του ουρικού οξέος και της καφεΐνης, που υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$, ήταν 1,51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ και 1,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$, αντίστοιχα. Τα LODs που βρέθηκαν ήταν χαμηλά και συγκρίσιμα με αυτά άλλων ηλεκτροδίων στη βιβλιογραφία (Πίνακες 7 και 8).



Σχήμα 73. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για το ουρικό οξύ και την καφεΐνη που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα σε εύρος συγκέντρωσης 5 – 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα (ανά 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω), σε 0,1 mol L^{-1} ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 4) με εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s. Οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται ως ένθετο.

Η αναπαραγωγιμότητα μελετήθηκε εξετάζοντας οκτώ επαναλαμβανόμενες αποκρίσεις του αισθητήρα σε διάλυμα που περιείχε 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικό οξύ και καφεΐνη και οι % σχετικές τυπικές αποκλίσεις (% RSD), βρέθηκαν 5,4 % και 6,3 %, αντίστοιχα. Ακόμη εξετάστηκαν οι βολταμμετρικές αποκρίσεις σε πέντε διαφορετικούς αισθητήρες, σε διάλυμα που περιείχε 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικό οξύ και καφεΐνη και οι % RSD βρέθηκαν 7,7 % και 8,9 %, αντίστοιχα.

Ηλεκτρόδιο	Γραμμικότητα	LOD	Εφαρμογή	Αναφορά
Φιλμ από 4-αμινο-σαλικυλικό οξύ με UOx(ουρική οξειδάση)/Prussian Blue/Ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας γραφίτη	10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινα ούρα	289
Οξειδιο γραφενίου/ KAuCl_4	10 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Γάλα Χυμός φρούτων Ανθρώπινα ούρα	290
L-Κυστεΐνη/Ηλεκτρόδιο γέλης-άνθρακα	10 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ορός αίματος	291
Ουρικάση/Οξειδιο γραφενίου-Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα	20 – 490 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$	–	292
Ηλεκτρόδιο αμιγούς γραφενίου	6 – 1330 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$	–	293
Pd/Οξειδιο γραφενίου- Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα	6 – 469,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ούρα και ορός ποντικού	294
Ηλεκτρόδιο υδρογέλης	30 – 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	295
Νανοσωλήνας άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων	0 – 1600 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,58 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	296

Πίνακας 7. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ηλεκτροδίων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό ουρικού οξέος.

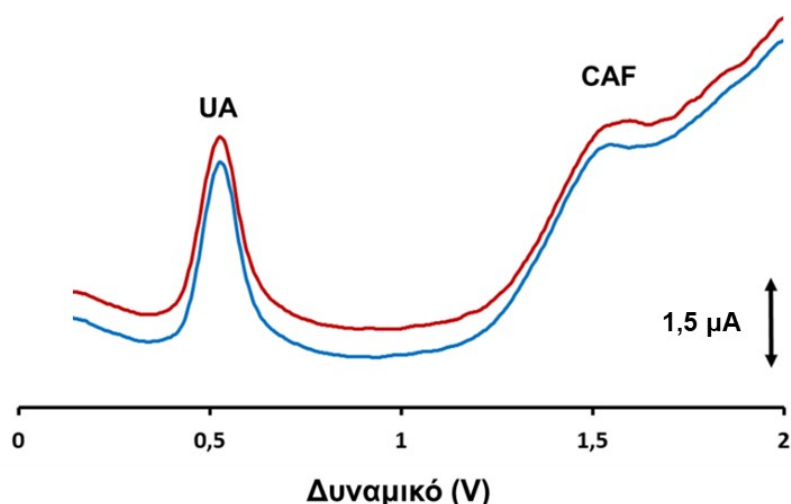
Ηλεκτρόδιο	Γραμμικότητα	LOD	Εφαρμογή	Αναφορά
3D ηλεκτρόδιο άνθρακα	0 – 115,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Φαρμακευτικά σκευάσματα	84
Νανοϊνα άνθρακα/Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα	25 – 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$	17,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Φαρμακευτικά σκευάσματα	297
Ηλεκτρόδιο φελλού-γραφίτη	0 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Φαρμακευτικά σκευάσματα Αναψυκτικά	298
Στρώση Ag σε πάστα C/Nafion/Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος	10 – 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ανθρώπινος ιδρώτας	299
Ενεργοποιημένος άνθρακας/ ZnCl_2 ή $\text{ZnCl}_2:\text{FeCl}_3$ (1:1)	39,8 – 458 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 39,8 – 637 $\mu\text{mol L}^{-1}$	28,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Αναψυκτικό	300
Μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές/Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα	30 – 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Αθλητικά ροφήματα	301

Πίνακας 8. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές άλλων ηλεκτροδίων που έχουν κατασκευαστεί για προσδιορισμό καφεΐνης.

8.5.5 Παρεμποδίσεις

Ελέγχθηκε η μελέτη παρεμποδίσεων ορισμένων ενώσεων που ενδέχεται να συνυπάρχουν στα βιολογικά δείγματα, με την προσθήκη τους σε συνθετικό ιδρώτα που περιείχε $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικό οξύ και $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνη. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και κιτρικό οξύ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα, ασκορβικό οξύ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, γαλακτικό οξύ $5,5 \text{mmol L}^{-1}$, ουρία 10mmol L^{-1} .

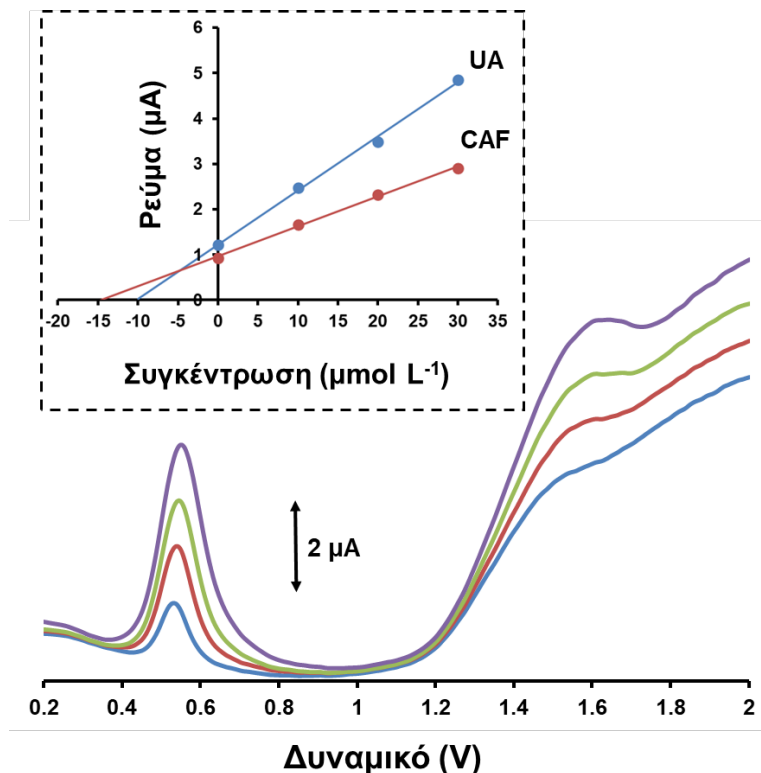
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 74, η προσθήκη των παραπάνω παρεμποδιστών δε φάνηκε να επηρεάζει την απόκριση του αισθητήρα, υποδεικνύοντας την καλή εκλεκτικότητα της παρουσιαζόμενης ηλεκτροχημικής μεθόδου. Συνεπώς, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των δύο αυτών αναλυτών σε βιολογικά δείγματα.



Σχήμα 74. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα με εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s , σε συνθετικό ιδρώτα επιμολυσμένο με ουρικό οξύ σε συγκέντρωση $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ και καφεΐνη $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (μπλε) και παρουσία γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης, κιτρικού οξέος ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα), ασκορβικού οξέος ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), γαλακτικού οξέος ($5,5 \text{mmol L}^{-1}$) και ουρίας (10mmol L^{-1}) (κόκκινο).

8.5.6 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

Ο αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης σε συνθετικό ιδρώτα επιμολυσμένο με $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικό οξύ και $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνη με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης (Σχήμα 75). Η μέση τιμή ανάκτησης τριών μετρήσεων υπολογίστηκε 98 % για την καφεΐνη και 103 % για το ουρικό οξύ.

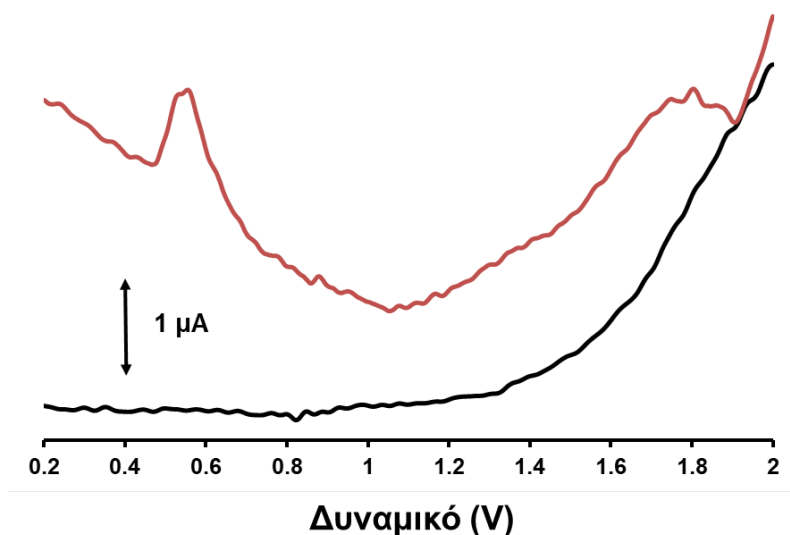


Σχήμα 75. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης σε συνθετικό ιδρώτα επιμολυσμένο με $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικό οξύ και $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ καφεΐνη με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Από κάτω προς τα πάνω: προσθήκη δείγματος και κατόπιν τρεις σταθερές προσθήκες των $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος και καφεΐνης. Εφαρμογή $-1,4 \text{ V}$ για 120 s πριν τη σάρωση. Οι αντίστοιχες καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετο.

8.5.7 Απόκριση αισθητήρα ουρικού οξέος και καφεΐνης σε πραγματικό ιδρώτα

Η απόκριση του αισθητήρα ουρικού οξέος και καφεΐνης σε πραγματικό ιδρώτα δοκιμάστηκε ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στην υποενότητα 8.2.6 για τη γλυκόζη. Αρχικά, λήφθηκε μία μέτρηση με τη μεμβράνη του PVA πάνω στον αισθητήρα και, κατόπιν το άτομο ακούμπησε την άκρη ενός δακτύλου στην επιφάνεια

της μεμβράνης για 2 λεπτά συνεχόμενα με εφαρμογή δυναμικού $-1,4$ V, αφού προηγουμένως το είχε βουτήξει σε διάλυμα που περιείχε ουρικό οξύ και καφεΐνη σε συγκέντρωση $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα, και έπειτα, λήφθηκε άλλη μία μέτρηση (Σχήμα 76).



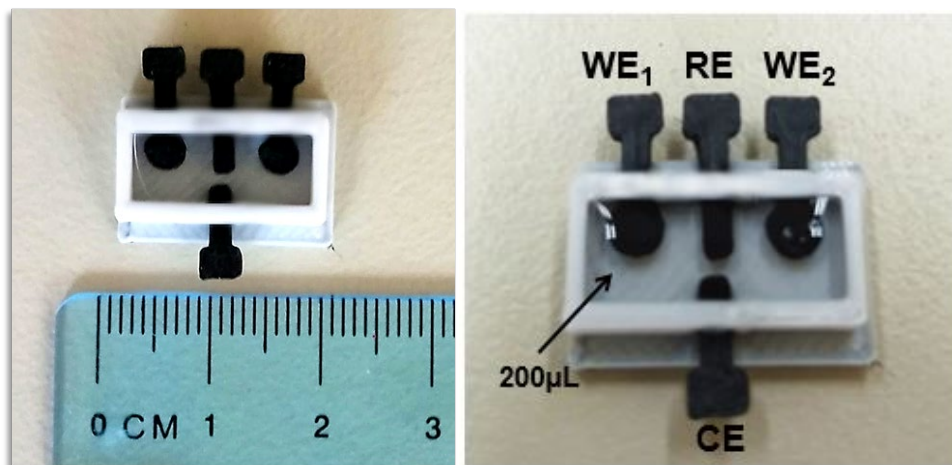
Σχήμα 76. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του αισθητήρα με PVA πριν από την τοποθέτηση ανθρώπινου δακτύλου (μαύρη γραμμή) και μετά την τοποθέτηση του δακτύλου που είχε προηγουμένως βουτηχθεί σε διάλυμα ουρικού οξέος και καφεΐνης συγκέντρωσης $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ το καθένα (κόκκινη γραμμή).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΒΙΟΣΥΣΚΕΥΕΣ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

9.1 Ταυτόχρονος προσδιορισμός χολίνης και χοληστερόλης

Η 3D βιοδιάταξη που εφαρμόστηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό χολίνης και χοληστερόλης κατασκευάστηκε εξ ολοκλήρου με τρισδιάστατο εκτυπωτή δύο κεφαλών όπως έχει περιγραφεί στο Κεφάλαιο 7 και παρουσιάζεται στην Εικόνα.



Εικόνα 6. Φωτογραφίες της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό χολίνης/χοληστερόλης.

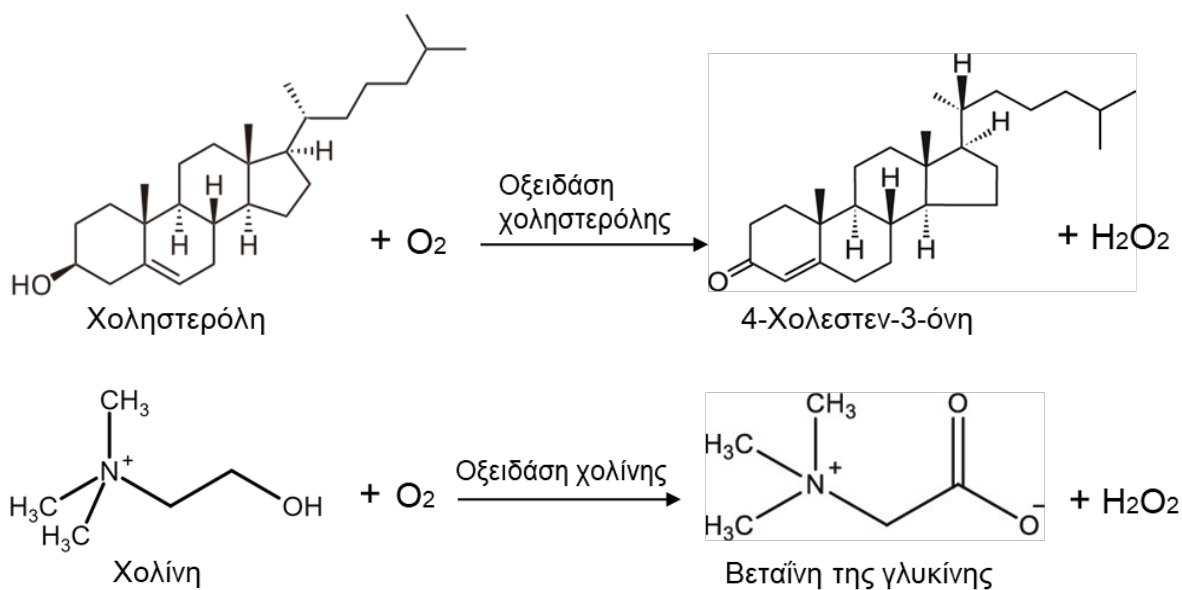
Η διάταξη αποτελείται από μικρή κυψελίδα των 200 μL (τυπωμένη από μη αγωγίμο νήμα PLA) και από τέσσερα ενσωματωμένα ηλεκτρόδια (εκτυπωμένα από αγωγίμο νήμα αιθάλης/PLA), που αντιστοιχούν σε δύο ηλεκτρόδια εργασίας (WEs), τα οποία μοιράζονται ένα κοινό ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς (RE) και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο (CE). Τα ηλεκτρόδια αυτά συνδέονται με έναν φορητό διποτενσιοστάτη, επιτρέποντας ταυτόχρονες ανεξάρτητες μετρήσεις. Ο βασικός στόχος ήταν η επίτευξη της μέγιστης ευκολίας στη λειτουργία καθώς και του χαμηλού κόστους τόσο για την κατασκευή όσο και για την ανάπτυξη των βιοδοκιμών, ώστε όλες αυτές οι διαδικασίες να μπορούν εύκολα να πραγματοποιηθούν στο σημείο ελέγχου. Η αναλυτική χρησιμότητα αυτής της 3D εκτυπωμένης βιοσυσκευής, αναδεικνύεται μέσω του ταυτόχρονου αμπερομετρικού προσδιορισμού δύο καρδιακών βιοδεικτών (χολίνη και χοληστερόλη) στην ίδια σταγόνα αίματος, μέσω των ενζυμικών αντιδράσεων που αναπτύσσονται στα δύο ενσωματωμένα ηλεκτρόδια εργασίας. Τα ηλεκτρόδια που εκτυπώνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έχουν για την ακινητοποίηση των

ενζύμων, χωρίς να απαιτούν κάποιο στάδιο λείανσης ή χημικής κατεργασίας, απλουστεύοντας έτσι σημαντικά την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων.

9.1.1 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων

Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και χολίνης, 5 μL οξειδάσης χοληστερόλης (500 U mL^{-1}) και 5 μL οξειδάσης χολίνης (250 U mL^{-1}) εναποτέθηκαν στις επιφάνειες των WE₁ και WE₂, αντίστοιχα, τα ηλεκτρόδια αφέθηκαν 5 λεπτά για την ακινητοποίηση των βιοϋποδοχέων μέσω προσρόφησης και, ακολούθησε ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου με ρεύμα αέρα από πιστολάκι μαλλιών για 1 επιπλέον λεπτό. Στη συνέχεια, 5 μL διαλύματος Nafion 1% κ.ο. τοποθετήθηκαν σε κάθε επιφάνεια των ηλεκτροδίων εργασίας και αφέθηκαν να στεγνώσουν για 4 λεπτά.

Η κυκλική βολταμμετρία (CV) πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} . Ο προσδιορισμός χοληστερόλης και χολίνης πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά, χωρίς ανάδευση και παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ως προς το 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο αναφοράς CB/PLA, ήταν $-0,7 \text{ V}$. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της χοληστερόλης και της χολίνης σε συνθετικό αίμα. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί αντίδρασης στα ηλεκτρόδια για τη χοληστερόλη και τη χολίνη είναι οι ακόλουθοι:

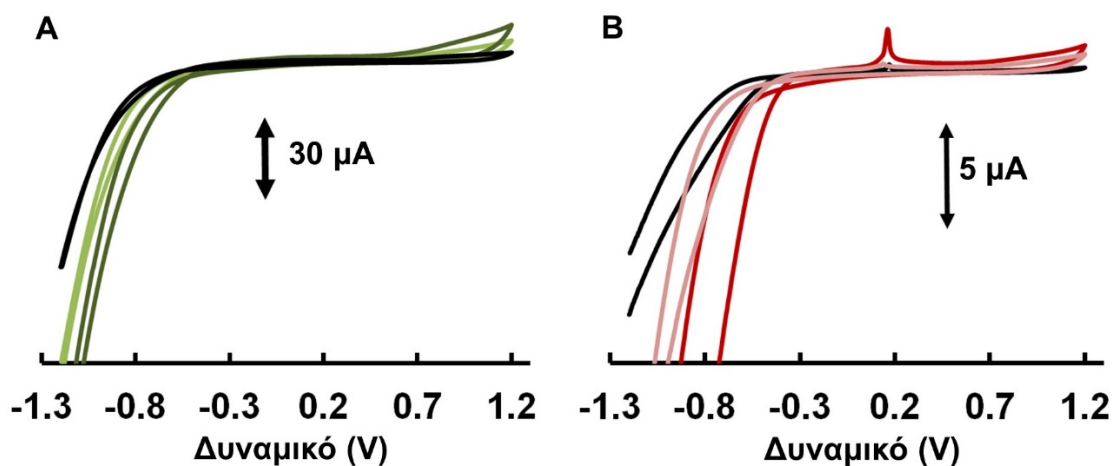


Σχήμα 77. Προτεινόμενοι μηχανισμοί αντίδρασης χοληστερόλης και χολίνης στους βιοαισθητήρες.

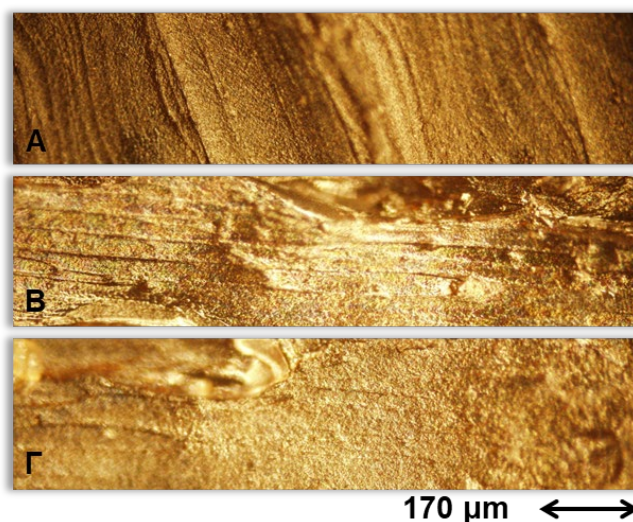
9.1.2 Χαρακτηρισμός των ενζυμικών βιοαισθητήρων χολίνης και χοληστερόλης

Η βιοδραστικότητα της 3D εκτυπωμένης βιοσυσσκευής έναντι της χοληστερόλης και της χολίνης αξιολογήθηκε με κυκλική βολταμμετρία απουσία και παρουσία των βιοδεικτών (Σχήμα 78). Και οι δύο βιοαισθητήρες παρουσίασαν ενίσχυση στο σήμα του ρεύματος από την αναγωγή του παραγόμενου H_2O_2 με την αύξηση των συγκεντρώσεων των βιοδεικτών στη συσκευή, αποκαλύπτοντας την καταλληλότητα της διάταξης για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης και της χολίνης.

Ακόμη, η επιφάνεια των 3D εκτυπωμένων ηλεκτροδίων, που μορφοποιήθηκαν με οξειδάση της χοληστερόλης $ChIOx/Nafion$ και οξειδάση της χολίνης $ChOx/Nafion$, εξετάστηκε με οπτικό μικροσκόπιο. Οι φωτογραφίες που λήφθηκαν πριν και μετά τον εγκλωβισμό των ενζυμικών βιοϋποδοχέων με τη μεμβράνη του Nafion στα ηλεκτρόδια εργασίας, παρουσιάζονται στην Εικόνα 7, υποδεικνύοντας ότι επιτεύχθηκε εκτεταμένη κάλυψη των επιφανειών των ηλεκτροδίων.



Σχήμα 78. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε: A) 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα χοληστερόλης παρουσία 0 (μαύρη γραμμή), 60 (ανοιχτή πράσινη γραμμή) και 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης (πράσινη γραμμή), B) 3D εκτυπωμένο βιοαισθητήρα χολίνης παρουσία 0 (μαύρη γραμμή), 1 (ροζ γραμμή) και 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης (κόκκινη γραμμή).

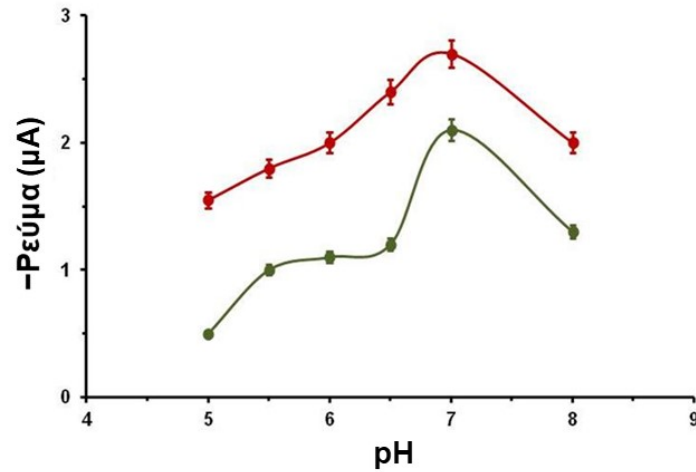


Εικόνα 7. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας: A) εκτυπωμένου ως έχει, B) μορφοποιημένου με ChlOx/ Nafion και Γ) με ChOx/Nafion.

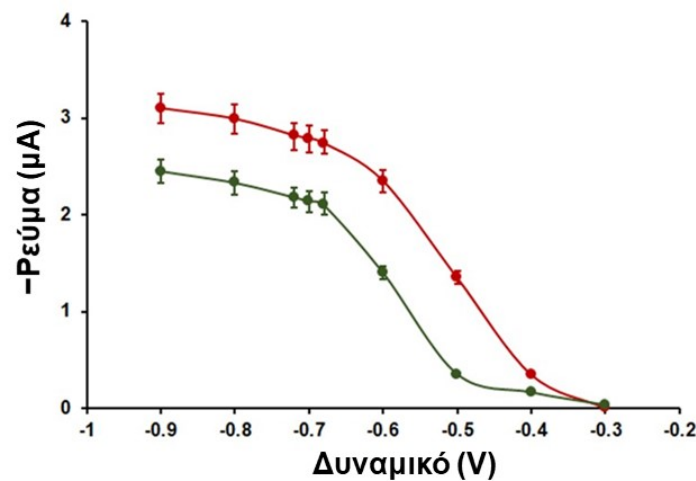
Τέλος, η σταθερότητα του δυναμικού του ενσωματωμένου θερμοπλαστικού ηλεκτροδίου αναφοράς της μικροδιάταξης ελέγχθηκε σε σύγκριση με ένα εμπορικό ηλεκτρόδιο Ag/AgCl σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) για διάστημα 15 ημερών, και το δυναμικό του δεν μετατοπίστηκε περισσότερο από 20 mV κατά τη διάρκεια αυτής της δοκιμής. Η αναπαραγωγιμότητα του δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων αναφοράς μελετήθηκε επίσης, με την καταγραφή του δυναμικού του ηλεκτροδίου αναφοράς σε 8 διαφορετικές μικροσυσκευές (σε σχέση με ένα εμπορικό ηλεκτρόδιο Ag/AgCl) και η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) ήταν μικρότερη από 4,8%.

9.1.3 Βελτιστοποίηση ηλεκτροχημικής μεθόδου

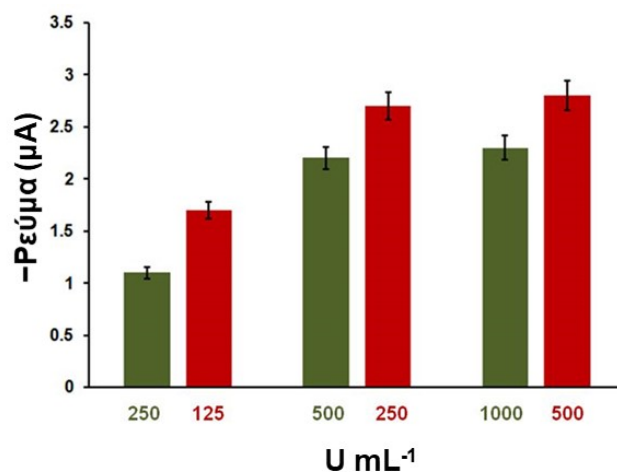
Εξετάστηκαν οι βασικές παράμετροι, συμπεριλαμβανομένου του pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB), του εφαρμοζόμενου δυναμικού, της συγκέντρωσης του ενζύμου και της συγκέντρωσης του Nafion, οι οποίες επηρεάζουν τις αποκρίσεις των βιοαισθητήρων. Οι τιμές που επιλέχθηκαν ήταν: pH 7, δυναμικό $-0,7 \text{ V}$, 500 U mL^{-1} ChlOx και 250 U mL^{-1} ChOx, 1% κ.ο. Nafion (Σχήματα 79 – 82).



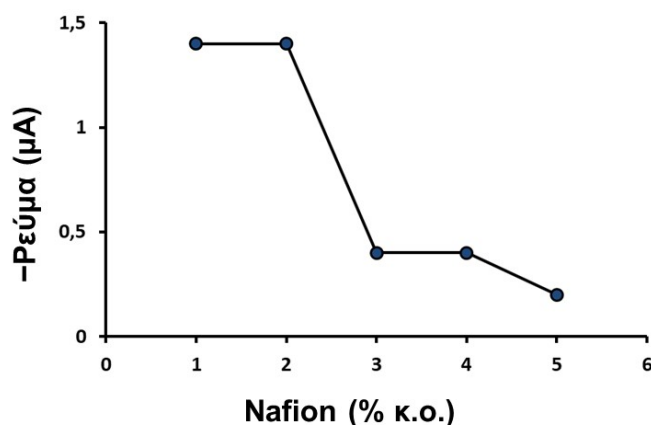
Σχήμα 79. Η επίδραση του pH στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης (πράσινη γραμμή) και του βιοαισθητήρα χολίνης (κόκκινη γραμμή) σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB που περιέχει 120 μmol L^{-1} χοληστερόλης και 2 μmol L^{-1} χολίνης. Εφαρμοζόμενο δυναμικό: $-0,7 \text{ V}$. Τα σημεία στις καμπύλες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).



Σχήμα 80. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης (πράσινη γραμμή) και του βιοαισθητήρα χολίνης (κόκκινη γραμμή) σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PB (pH 7) που περιέχει 120 μmol L^{-1} χοληστερόλης και 2 μmol L^{-1} χολίνης. Κάθε σημείο στις καμπύλες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).



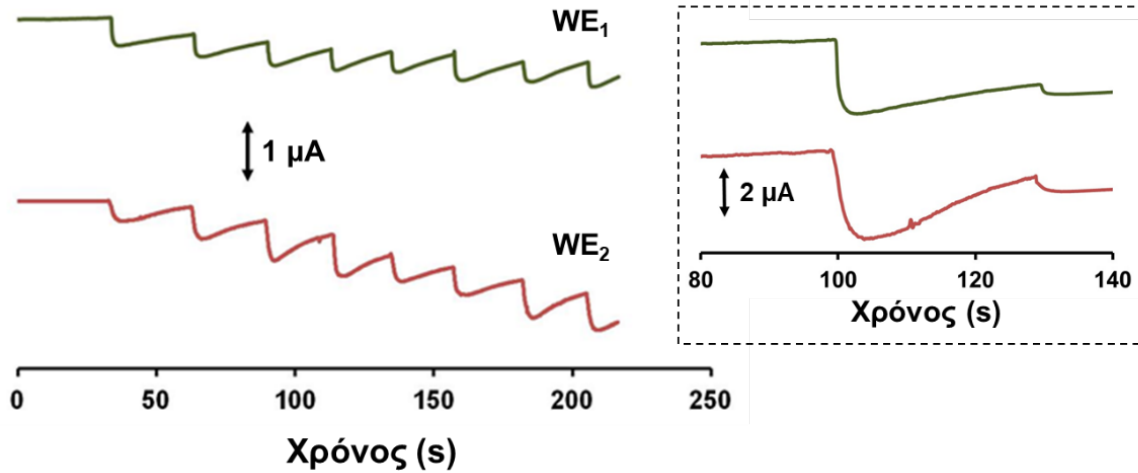
Σχήμα 81. Η επίδραση της συγκέντρωσης της οξειδάσης της χοληστερόλης (250–1000 U mL⁻¹) και της οξειδάσης της χολίνης (125–500 U mL⁻¹) στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε διάλυμα 120 μmol L⁻¹ (πράσινες μπάρες) και του βιοαισθητήρα χολίνης σε διάλυμα 2 μmol L⁻¹ (κόκκινες μπάρες). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης ± SD (n = 3).



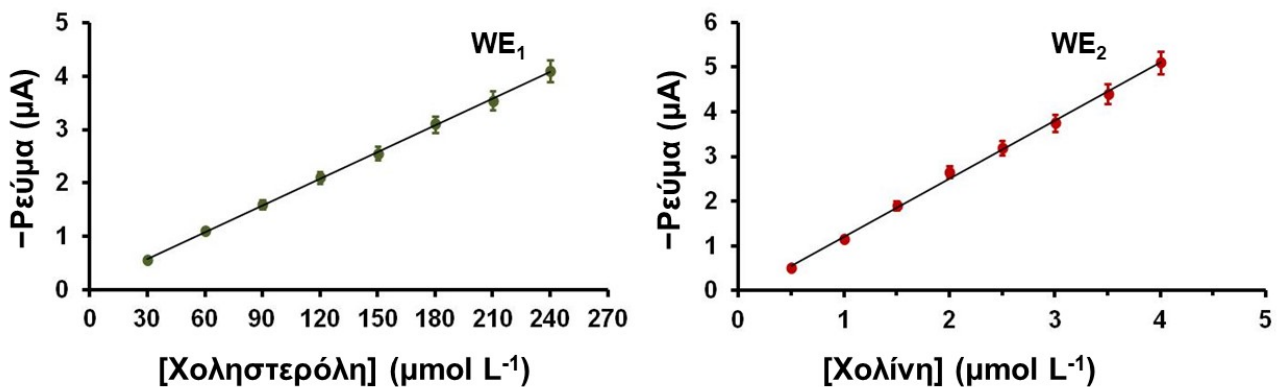
Σχήμα 82. Η επίδραση της % κ.ο. συγκέντρωσης του Nafion στις αμπερομετρικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα χολίνης σε διάλυμα 1 μmol L⁻¹.

9.1.4 Καμπύλες αναφοράς

Οι καμπύλες βαθμονόμησης της χοληστερόλης και της χολίνης (Σχήματα 83 και 84) λήφθηκαν με την προσθήκη στη βιοδιάταξη 200 μL 0,1 mol L⁻¹ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7) ακολουθούμενη από 8 διαδοχικές προσθήκες 1 μL διαλύματος που περιείχε 6 mmol L⁻¹ χοληστερόλης και 100 μmol L⁻¹ χολίνης, σε στατικό διάλυμα με εφαρμοζόμενο δυναμικό -0,7 V.



Σχήμα 83. Ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις της μικροδιάταξης σε 8 διαδοχικές προσθήκες $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης (WE_1) και $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης (WE_2) σε μη αναδευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{mol L}^{-1}$ (pH 7). Ένθετο: Αποκρίσεις της μικροδιάταξης στην παρουσία $210 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης, ακολουθούμενες από μία προσθήκη $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης.



Σχήμα 84. Οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς για τη χοληστερόλη και τη χολίνη. Κάθε σημείο στα διαγράμματα είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

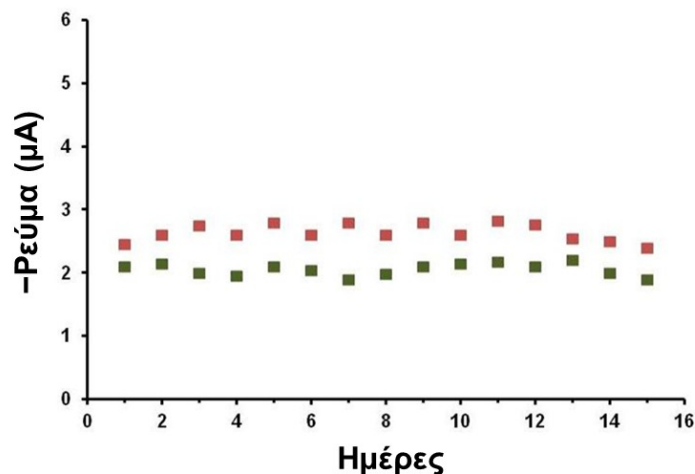
Και οι δύο βιοαισθητήρες εμφάνισαν ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις που αυξάνονταν γραμμικά καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση κάθε βιοδείκτη, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0,9994 για τη χοληστερόλη και 0,9992 για τη χολίνη. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) της χοληστερόλης και της χολίνης υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$, και ήταν $3,36$ και $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ αντίστοιχα, τα οποία είναι πολύ χαμηλότερα από τα κατώτατα όριά τους στο αίμα για το στεφανιαίο σύνδρομο

(28 $\mu\text{mol L}^{-1}$ για τη χολίνη και 6 mmol L^{-1} για τη χοληστερόλη)^[302,303]. Αυτά τα LODs επιτρέπουν την αραίωση των κλινικών δειγμάτων, μειώνοντας τις ισχυρές μητρικές επιδράσεις.

9.1.5 Αναπαραγωγιμότητα και σταθερότητα βιοαισθητήρων

Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε, εξετάζοντας οκτώ διαφορετικές βιοδιατάξεις. Οι αμπερομετρικές αποκρίσεις ενός διαλύματος που περιείχε 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης καταγράφηκαν και έδωσαν τιμές % σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) 4,9 % και 5,7 % αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία κατασκευής και λειτουργίας της τρισδιάστατα εκτυπωμένης βιοσυσκευής.

Η σταθερότητα αποθήκευσης της βιοσυσκευής εξετάστηκε με τη μέτρηση των αποκρίσεων ενός διαλύματος που περιείχε 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης, κατά τη διάρκεια 15 ημερών. Οι συσκευές αποθηκεύτηκαν στους 4 °C και παρακολουθούνταν καθημερινά, προσφέροντας σταθερές αποκρίσεις των βιοδεικτών (Σχήμα 85).



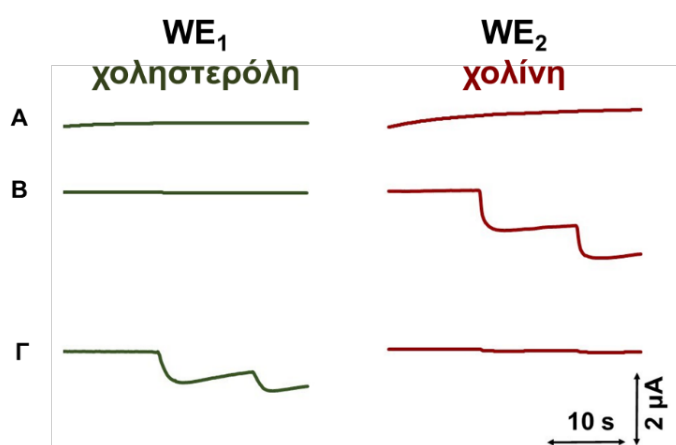
Σχήμα 85. Η σταθερότητα των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και χολίνης της 3D εκτυπωμένης διάταξης, που αντιστοιχεί σε αμπερομετρικές αποκρίσεις σε 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης (πράσινα σημεία) και 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης (κόκκινα σημεία) κατά τη διάρκεια 15 ημερών από την κατασκευή.

9.1.6 Εκλεκτικότητα και παρεμβολές

Οι πολυπλεξικοί βιοαισθητήρες οφείλουν να εξουδετερώνουν φαινόμενα παρεμβολής και διασταυρούμενης δραστηριότητας μεταξύ των βιοαναλυτών-στόχων, καθώς και την παρεμβολή μεταξύ των γειτονικών ηλεκτροδίων εργασίας. Για το σκοπό αυτό, διενεργήθηκαν πειράματα στη 3D μικροσυσκευή με την προσθήκη ενός τυφλού διαλύματος και διαλυμάτων χοληστερόλης και χολίνης.

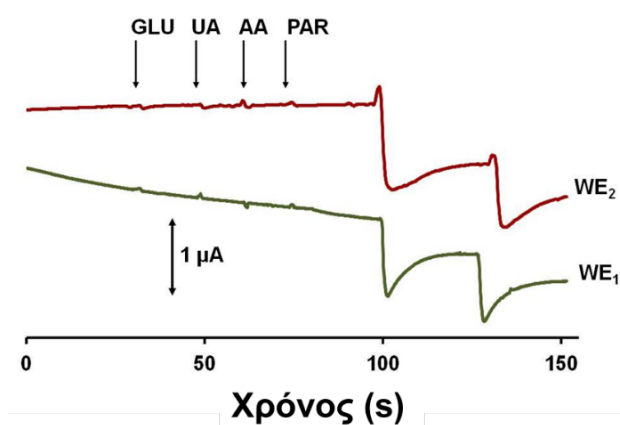
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 86, δεν υπήρξε καμία απόκριση στο τυφλό διάλυμα και από τους δύο βιοαισθητήρες, ενώ όταν η χοληστερόλη ή η χολίνη εισήχθη στη μικροκυψελίδα, μόνο ο αντίστοιχος βιοαισθητήρας αποκρίθηκε προς τον αντίστοιχο βιοδείκτη, το οποίο αποδεικνύει ότι η διασταυρούμενη δραστηριότητα είναι αμελητέα.

Η πιθανή παρεμβολή θα μπορούσε να προκύψει από το παραγόμενο H_2O_2 , το οποίο θα έρεε από την επιφάνεια του κάθε ηλεκτροδίου εργασίας και θα επηρέαζε την απόκριση του περιβαλλόμενου ηλεκτροδίου εργασίας. Αυτό εξαρτάται από την χωρική απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων και από τη χρονική κλίμακα των μετρήσεων. Στη μικροκυψελίδα η απόσταση μεταξύ των δύο βιοαισθητήρων είναι 1 cm, ενώ η μέγιστη τιμή του συντελεστή διάχυσης του H_2O_2 είναι $15 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Σύμφωνα με την εξίσωση διάχυσης του Einstein [$d = (2 \cdot D \cdot t)^{1/2}$, όπου d : η μέση απόσταση που διανύεται (cm), D : ο συντελεστής διάχυσης, και t : ο χρόνος (s)] προβλέπεται ότι το H_2O_2 θα διαρρέυσει περίπου κατά 0,08 εκ. σε 225 s. Έτσι, η παρεμβολή που σχετίζεται με τη διάχυση στη συσκευή είναι μηδαμινή.



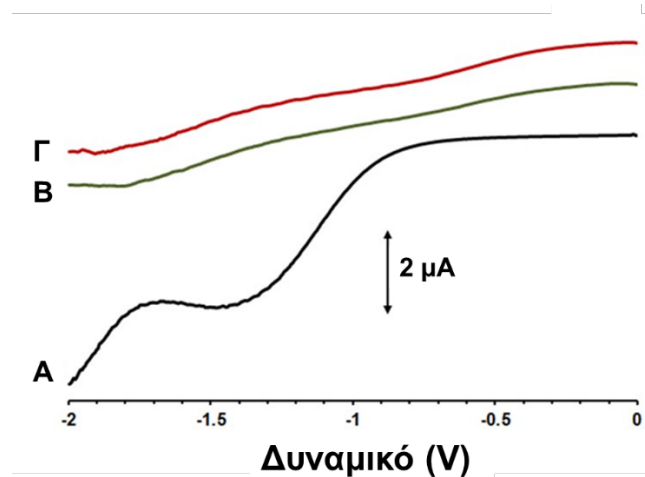
Σχήμα 86. Ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και χολίνης: A) σε τυφλό διάλυμα, B) μετά από δύο διαδοχικές προσθήκες $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης, και Γ) μετά από δύο διαδοχικές προσθήκες $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης και $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης.

Παρότι τα ένζυμα είναι απόλυτα εκλεκτικά, ο αμπερομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου H_2O_2 παρουσιάζει παρεμποδίσεις λόγω των ηλεκτρο-οξειδώσιμων ενδογενών και εξωγενών ενώσεων που συνυπάρχουν στα βιολογικά δείγματα. Καθώς η ανίχνευση του H_2O_2 στη συσκευή πραγματοποιείται σε δυναμικό αναγωγής $-0,7$ V, οι συνεισφορές από τέτοιου είδους ουσίες αναμένεται να είναι αμελητέες. Εξάλλου, η επικάλυψη των βιοαισθητήρων με Nafion χρησιμεύει όχι μόνο για τον εγκλωβισμό των βιοϋποδοχέων στις επιφάνειες των ηλεκτροδίων εργασίας αλλά κι ως ηλεκτροστατικός φραγμός έναντι των παρεμποδιστών. Πράγματι, η παρουσία γλυκόζης (GLU), ουρικού οξέος (UA), ασκορβικού οξέος (AA) και παρακεταμόλης (PAR) δεν επηρέασε τις αποκρίσεις και των δύο βιοαισθητήρων (Σχήμα 87).



Σχήμα 87. Ταυτόχρονες αποκρίσεις των βιοαισθητήρων χοληστερόλης (WE_1) και χολίνης (WE_2) έναντι στην προσθήκη $0,1$ $mmol L^{-1}$ γλυκόζης, 6 $mmol L^{-1}$ ουρικού οξέος, 6 $mmol L^{-1}$ ασκορβικού οξέος, 7 $mmol L^{-1}$ παρακεταμόλης και έπειτα σε δύο διαδοχικές προσθήκες 60 $\mu mol L^{-1}$ χοληστερόλης και 1 $\mu mol L^{-1}$ χολίνης.

Όσον αφορά στο διαλυμένο οξυγόνο, δεν προκαλεί παρεμποδίσεις στον αμπερομετρικό προσδιορισμό της χολίνης και της χοληστερόλης, καθώς το διαλυμένο οξυγόνο καταναλώνεται και από τις δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Αυτό ελέγχθηκε με βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DP) από $0,0$ V έως $2,0$ V σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1$ $mol L^{-1}$ (pH 7), παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Το διαλυμένο οξυγόνο παρουσίασε μία μεγάλη κορυφή αναγωγής στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο CB/PLA, η οποία εξαφανίστηκε όταν αυτό μορφοποιήθηκε με ChIOx/Nafion, ChOx/Nafion και στο διάλυμα εργασίας προστέθηκε χοληστερόλη ή χολίνη (Σχήμα 88).



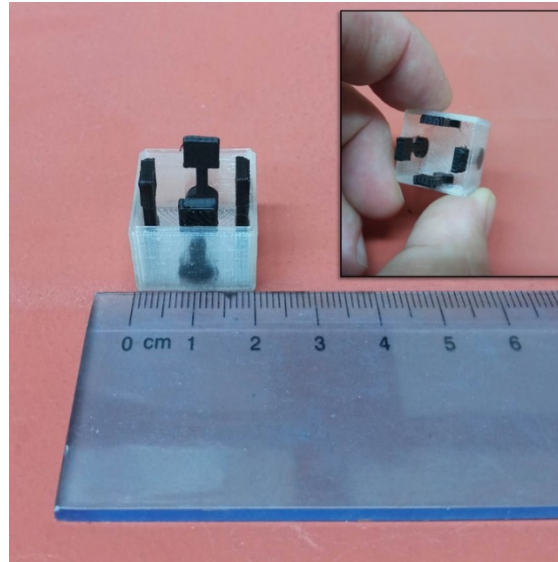
Σχήμα 88. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού ενός A) εκτυπωμένου ως έχει ηλεκτροδίου CB/PLA σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα, B) βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα που περιέχει $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χοληστερόλης, και Γ) βιοαισθητήρα χολίνης σε μη αποξυγονωμένο διάλυμα που περιέχει $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης.

9.1.7 Εφαρμογή σε συνθετικό αίμα

Προκειμένου να γίνει εκτίμηση της καταλληλότητας της πολυπλεξικής βιοσυσκευής σε βιολογικά δείγματα, αναλύθηκαν δύο δείγματα συνθετικού αίματος, τα οποία περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις και των δύο βιοδεικτών (το ένα 4 mmol L^{-1} χοληστερόλης και $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ χολίνης και το άλλο 7 mmol L^{-1} και $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, αντίστοιχα). Επίσης, τα δείγματα συνθετικού αίματος περιείχαν συγκεντρώσεις παρεμποδιστικών ουσιών, οι οποίες ενδέχεται να υπάρχουν στο ανθρώπινο αίμα ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ AA, $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ UA, $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ GLU, $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ PAR). Για το σκοπό αυτό, προστέθηκαν $5 \mu\text{L}$ κάθε δείγματος στη μικροκυψελίδα, αραιώθηκαν με $195 \mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), και οι συγκεντρώσεις χοληστερόλης και χολίνης υπολογίστηκαν μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης του Σχήματος 84. Οι τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 96 έως 103%, επιβεβαιώνοντας την ακρίβεια των 3D εκτυπωμένων πολυπλεξικών συσκευών και την καταλληλότητά τους για αναλύσεις ρουτίνας στα σημεία φροντίδας (POC).

9.2 Ταυτόχρονος προσδιορισμός γλυκόζης και αιθανόλης

Η 3D εκτυπωμένη βιοδιάταξη που εφαρμόστηκε στον ταυτόχρονο προσδιορισμό γλυκόζης και αιθανόλης κατασκευάστηκε εξ ολοκλήρου με τρισδιάστατο εκτυπωτή δύο κεφαλών όπως έχει περιγραφεί στο Κεφάλαιο 7, και παρουσιάζεται στην Εικόνα 8:



Εικόνα 8. Φωτογραφίες της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για ταυτόχρονο προσδιορισμό γλυκόζης/αιθανόλης.

Η τρισδιάστατα εκτυπωμένη ηλεκτροχημική συσκευή (χωρητικότητας 3 mL) αποτελείται από μία κυψελίδα (από μη αγώγιμο νήμα PLA) και 4 ενσωματωμένα ηλεκτρόδια (από αγώγιμο νήμα CB/PLA), τα οποία αντιστοιχούν σε δύο ηλεκτρόδια εργασίας και μοιράζονται ένα κοινό ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Τα ηλεκτρόδια αυτά συνδέονται με έναν δι-ποτενσιοστάτη, που επιτρέπει ταυτόχρονες ανεξάρτητες μετρήσεις. Η 3D εκτυπωμένη βιοσυσκευή εφαρμόστηκε στον ταυτόχρονο αμπερομετρικό προσδιορισμό δύο δεικτών ποιότητας οίνου (γλυκόζης και αιθανόλης) στο ίδιο δείγμα, μέσω των ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες αναπτύσσονται στα δύο ενσωματωμένα ηλεκτρόδια εργασίας.

9.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων

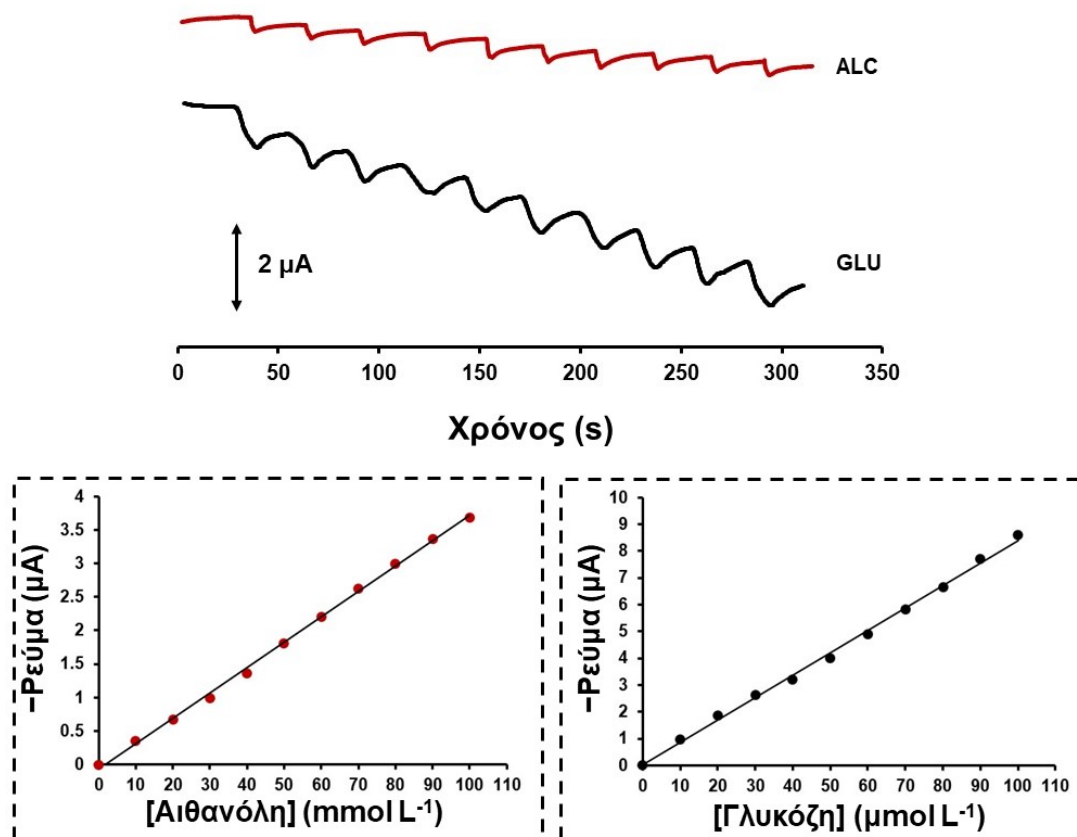
Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων γλυκόζης και αιθανόλης, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στις ενότητες 8.2 και 8.3, αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός

αιθανόλης και γλυκόζης πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά, χωρίς ανάδευση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), και παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ήταν $-0,7 \text{ V}$ ως προς το 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο αναφοράς CB/PLA. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης και της γλυκόζης σε τρεις διαφορετικούς οίνους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης σε στατικό διάλυμα.

9.2.2 Καμπύλες αναφοράς

Οι καμπύλες βαθμονόμησης της αιθανόλης και της γλυκόζης λήφθηκαν με την προσθήκη στη διάταξη 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), ακολουθούμενη από 10 διαδοχικές προσθήκες $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και 10 mmol L^{-1} αιθανόλης, σε στατικό διάλυμα με εφαρμοζόμενο δυναμικό $-0,7 \text{ V}$. Τα διαγράμματα αμπερομετρικού προσδιορισμού και οι σχετικές καμπύλες αναφοράς απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 89). Και οι δύο βιοαισθητήρες εμφάνισαν ταυτόχρονες αμπερομετρικές αποκρίσεις που αυξάνονταν γραμμικά καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση κάθε βιοδείκτη, για εύρος συγκέντρωσης $0 - 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ και συντελεστή συσχέτισης (R^2) $0,9996$ για τη γλυκόζη και για εύρος συγκέντρωσης $0 - 100 \text{ mmol L}^{-1}$ και R^2 ίσο με $0,9983$ για την αιθανόλη. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) της γλυκόζης και της αιθανόλης υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναφοράς με την εξίσωση $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$ και ήταν $2,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ και $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ αντίστοιχα, που είναι πολύ χαμηλά, επιτρέποντας έτσι, την αραιώση των δειγμάτων οίνων και μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τις επιδράσεις μήτρας.

Η αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε εξετάζοντας 6 διαφορετικές βιοσυσκευές σε επίπεδα συγκέντρωσης 50 mmol L^{-1} αιθανόλης και $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Οι τιμές %RSD που λήφθηκαν ήταν $8,4 \%$ για τη γλυκόζη και $9,2 \%$ για την αιθανόλη, αποδεικνύοντας την καλή αναπαραγωγιμότητα της βιοσυσκευής.

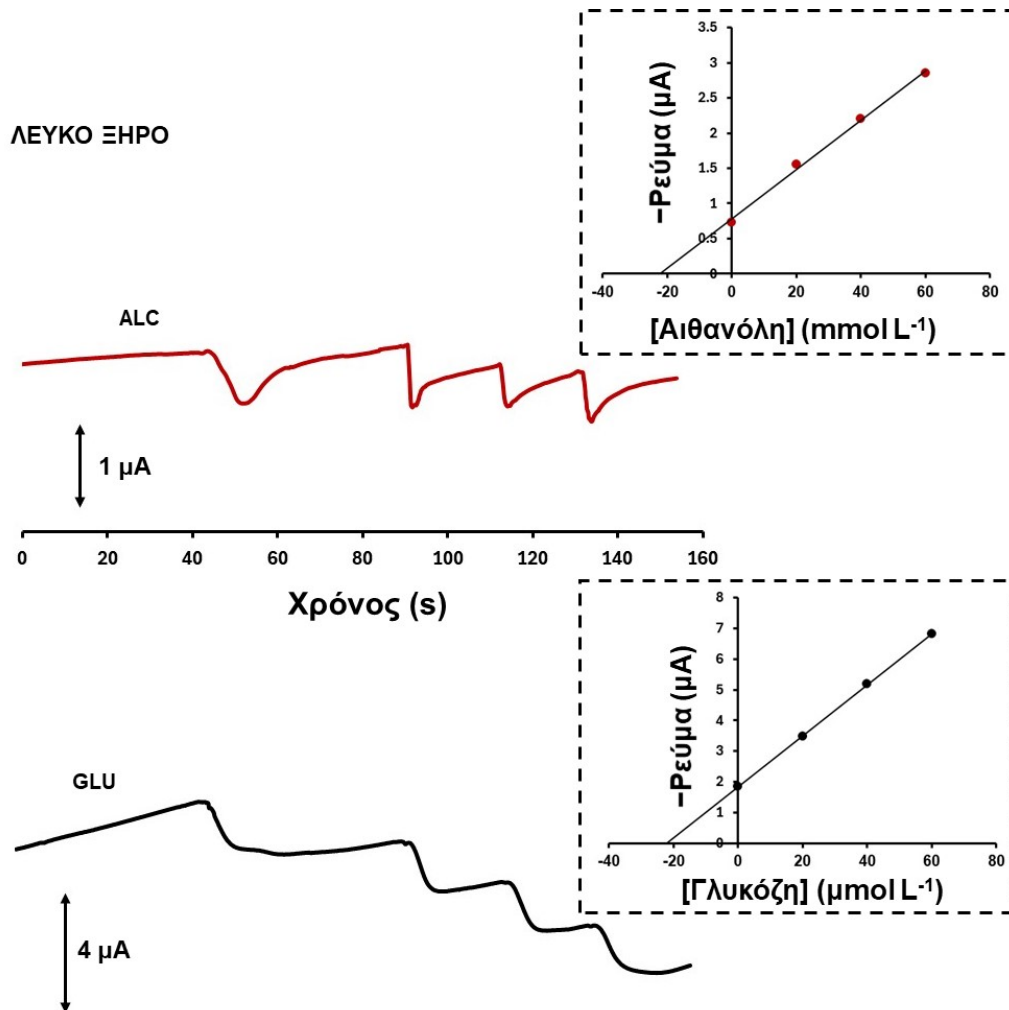


Σχήμα 89. Αμπερομετρικές αποκρίσεις της βιοδιάταξης σε 10 διαδοχικές προσθήκες 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και 10 mmol L^{-1} αιθανόλης σε μη αναδευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 7). Οι σχετικές καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται ως ένθετα (κάτω).

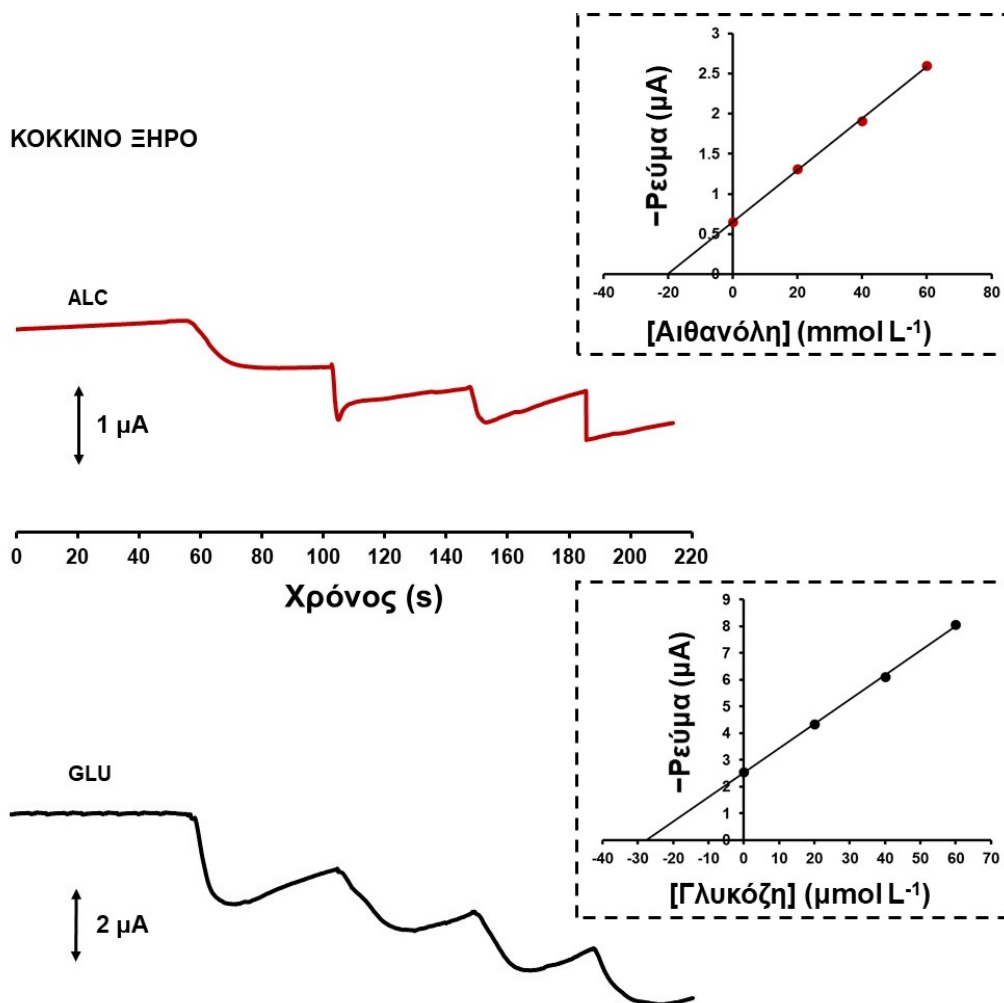
9.2.3 Εφαρμογή σε δείγματα οίνων

Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του προσδιορισμού γλυκόζης και αιθανόλης σε δείγματα κόκκινου ξηρού, λευκού ξηρού και ροζέ ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Πιο συγκεκριμένα, στην ηλεκτροχημική μικροκυψελίδα εισάχθηκαν 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 0,1 mol L^{-1} (pH 7). Κατά τη διάρκεια της μέτρησης πραγματοποιήθηκε προσθήκη 30 μL οίνου και ακολούθησαν 3 διαδοχικές προσθήκες αιθανόλης 20 mmol L^{-1} και 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Η ίδια διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Τα γραφήματα αμπερομετρικού προσδιορισμού και οι καμπύλες σταθερής προσθήκης για κάθε κρασί παρουσιάζονται στα επόμενα σχήματα (Σχήματα 90 – 92).

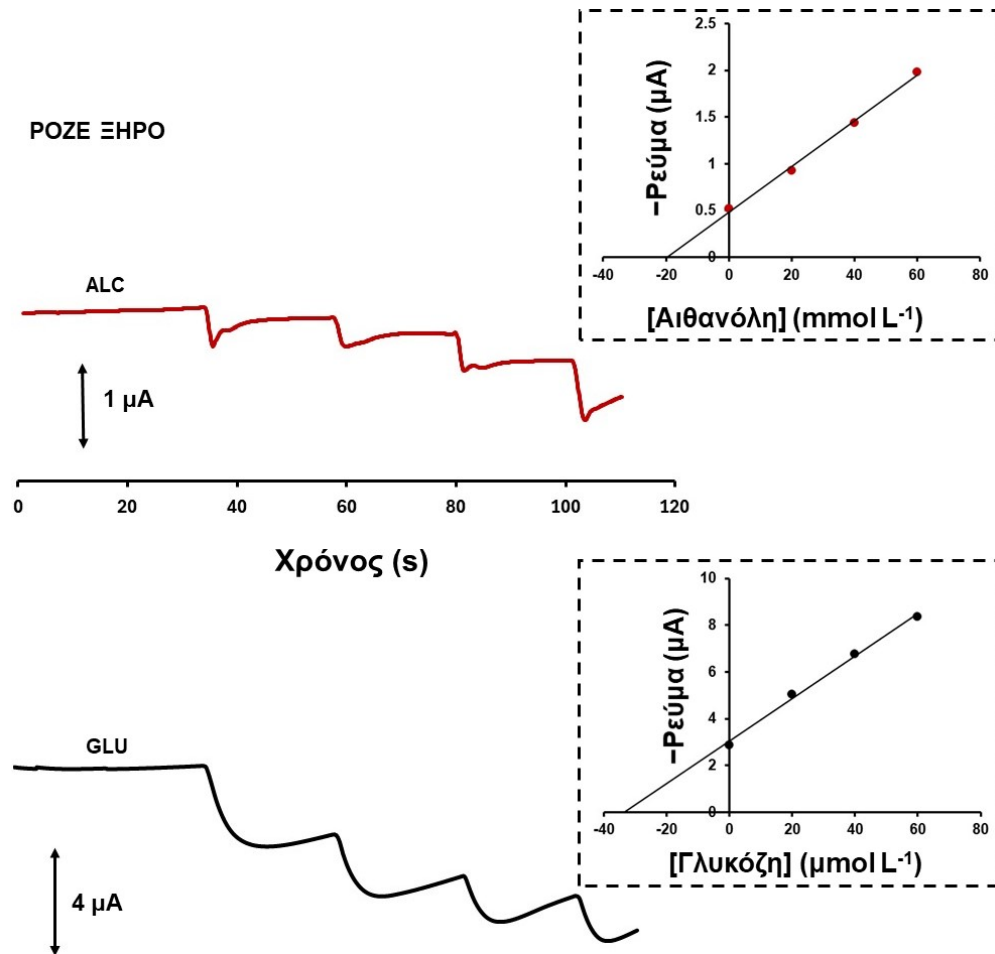
Οι μέσες τιμές ανάκτησης όσον αφορά στην αιθανόλη κυμάνθηκαν από 97 – 104%, επιβεβαιώνοντας την ακρίβεια και την καταλληλότητα της τρισδιάστατα εκτυπωμένης βιοσυσσκευής. Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης που βρέθηκαν στους τρεις ξηρούς οίνους ήταν 2,8 mmol L⁻¹ για τον κόκκινο, 2,2 mmol L⁻¹ για τον λευκό και 3,4 mmol L⁻¹ για τον ροζέ. Γενικά, τα επίπεδα γλυκόζης στους ξηρούς οίνους κυμαίνονται από 2-5 mmol L⁻¹ [304,305].



Σχήμα 90. Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης λευκού ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα.



Σχήμα 91. Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης κόκκινου ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα.



Σχήμα 92. Αμπερομετρικές αποκρίσεις της 3D εκτυπωμένης ενζυμικής βιοσυσσκευής για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περιεκτικότητας αιθανόλης και γλυκόζης ροζέ ξηρού οίνου με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Οι καμπύλες σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται ως ένθετα.

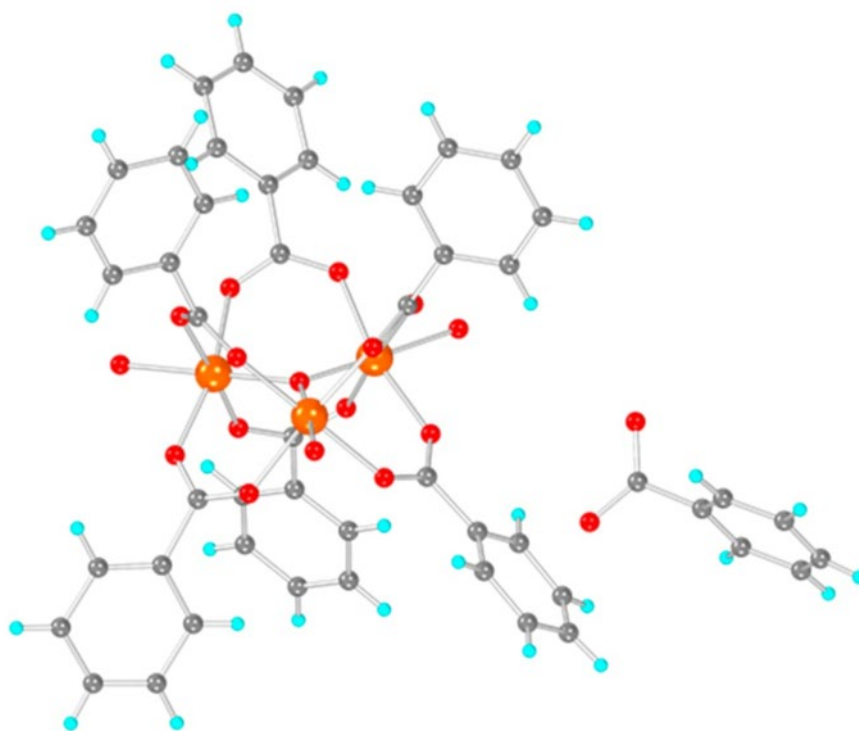
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

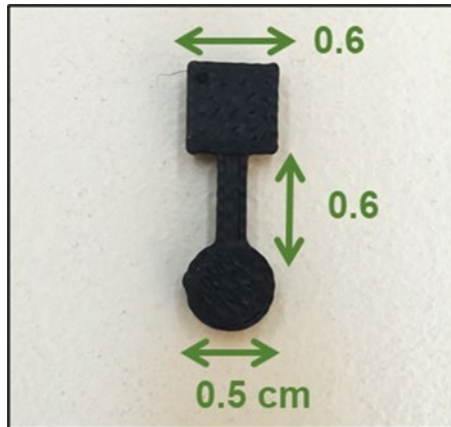
10.1 Προσδιορισμός γλυκόζης με σύμπλοκο σιδήρου (III)

10.1.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου

Για την κατασκευή του αισθητήρα γλυκόζης, 10 μL αιθανολικού διαλύματος του συμπλόκου $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ (6% κ.ο.) (Σχήμα 93) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια της κυκλικής περιοχής ενός 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου CB/PLA (Εικόνα 9), αφέθηκαν για την ακινητοποίηση του συμπλόκου για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από ξήρανση με ρεύμα αέρα από πιστολάκι μαλλιών για 1 επιπλέον λεπτό. Στη συνέχεια, 10 μL διαλύματος Nafion 1% κ.ο. εναποτέθηκαν στο ηλεκτρόδιο και αφέθηκαν να στεγνώσουν.



Σχήμα 93. Δομή $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$. [Όπου: Fe: πορτοκαλί, C: γκρι, H: τirkουάζ, O: κόκκινο].

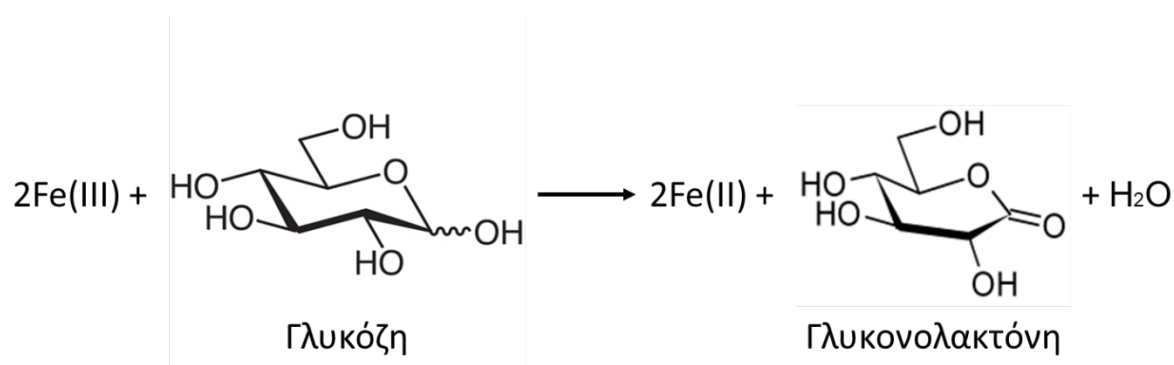


Εικόνα 9. 3D εκτυπωμένος αισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό γλυκόζης με χρήση συμπλόκου σιδήρου.

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα των 5 mL, παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ως βοηθητικό έλασμα Pt. Η κυκλική βολταμμετρία πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} . Για τις βολταμμετρικές μετρήσεις διαφορικού παλμού (DPV), εφαρμόστηκε στάδιο προσυγκέντρωσης στα $-1,4 \text{ V}$ για 360 s , ενώ η βολταμμετρική σάρωση πραγματοποιήθηκε σε στατικό περιβάλλον με τις ακόλουθες παραμέτρους:

- ✓ Ρυθμός σάρωσης (scan rate): 25 mV s^{-1} .
- ✓ Εύρος παλμού (modulation amplitude): 50 mV .
- ✓ Πλάτος παλμού (pulse width): 75 ms .
- ✓ Ρυθμός εφαρμογής παλμού (pulse repeat time): 50 ms .
- ✓ Αύξηση (increment): 10 mV .

Ο μηχανισμός της ηλεκτροκαταλυόμενης οξείδωσης της γλυκόζης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, που έχει μορφοποιηθεί με το σύμπλοκο Fe(III), βασίζεται στην αναγωγή του Fe(III) του συμπλόκου, προς Fe(0), εφαρμόζοντας ένα αρνητικό δυναμικό ($-1,4 \text{ V}$) για 360 s . Στη συνέχεια, ο μεταλλικός Fe(0), που σχηματίστηκε από την διαδικασία καθοδικής πόλωσης, οξειδώνεται ξανά προς Fe(III), κατά τη διάρκεια σάρωσης του δυναμικού από $-1,4$ έως $1,5 \text{ V}$. Τελικά, ο ηλεκτρογενετικά παραγόμενος Fe (III), οξειδώνει τη γλυκόζη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

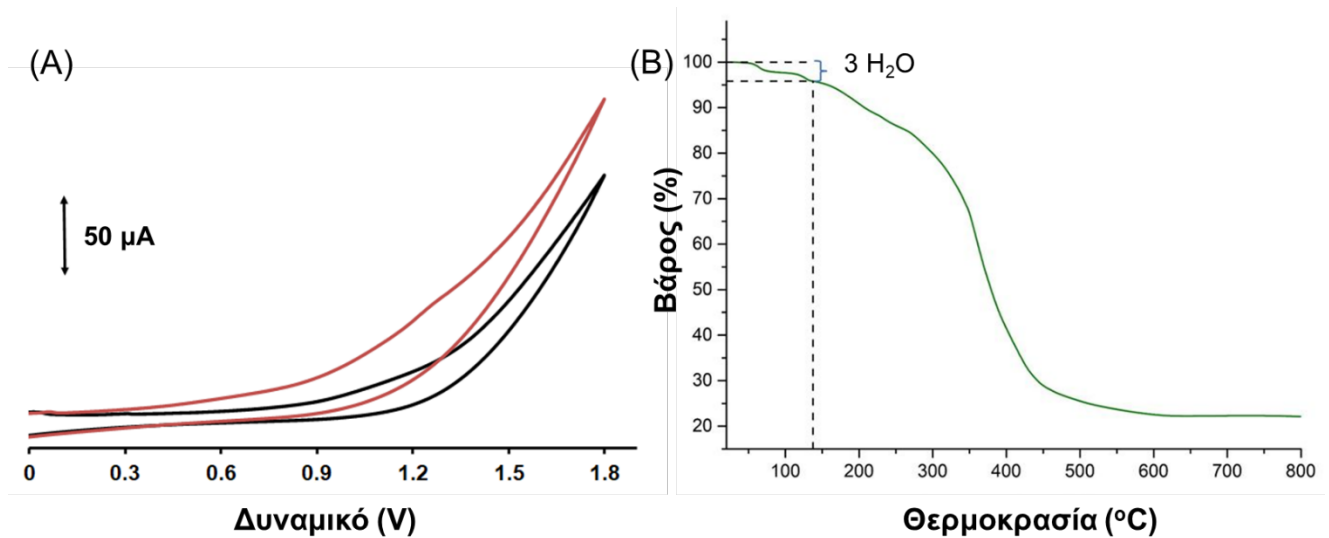


Σχήμα 94. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης γλυκόζης στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας από νήμα CB/PLA.

10.1.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα

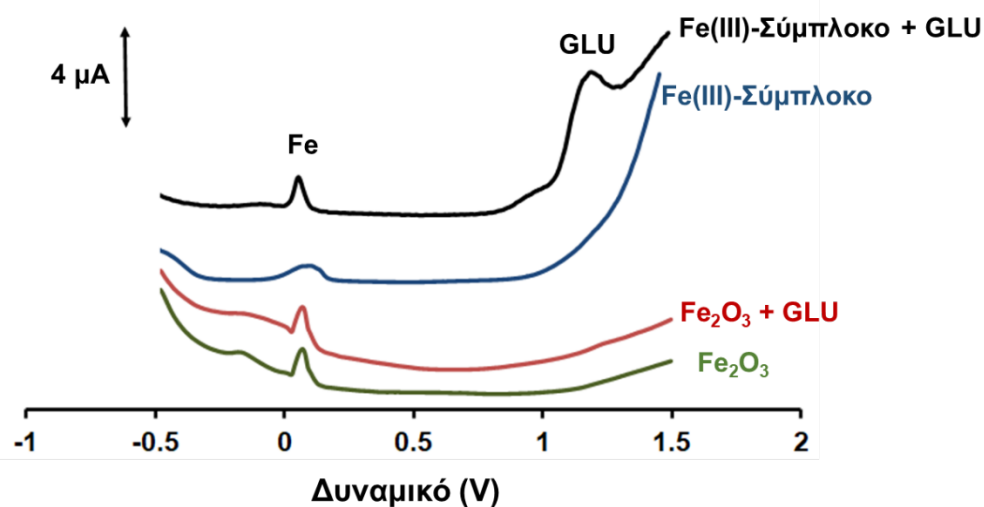
Ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος αισθητήρας γλυκόζης χαρακτηρίστηκε με κυκλική βολταμμετρία, σε διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) απουσία και παρουσία γλυκόζης σε συγκέντρωση 1 mmol L^{-1} (Σχήμα 95^A). Στα κυκλικά βολταμμογραφήματα παρατηρούμε πως με την προσθήκη της γλυκόζης στο διάλυμα, εμφανίζεται μια κορυφή στα $\sim 1,2 \text{ V}$, η οποία αντιστοιχεί στην οξείδωση της γλυκόζης, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα του αισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης.

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση έδειξε ότι το $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$ χάνει $\sim 4,29 \%$ του βάρους του, εντός του εύρους θερμοκρασιών $25\text{--}137 \text{ }^\circ\text{C}$, το οποίο είναι πολύ κοντά στη θεωρητική τιμή που αντιστοιχεί στα τρία συνδεδεμένα μόρια H_2O (θεωρητική τιμή: $4,98\%$), ακολουθούμενο από απώλεια $\sim 10,63 \%$ εντός του εύρους θερμοκρασιών $137\text{--}257 \text{ }^\circ\text{C}$, το οποίο είναι πολύ κοντά στη θεωρητική τιμή ενός βενζοϊκού ανιόντος (θεωρητική τιμή: $11,15 \%$) και αμέσως μετά διασπάται. Το υπόλειμμα πάνω από τους $620 \text{ }^\circ\text{C}$ είναι $22,18 \%$, το οποίο αντιστοιχεί στο Fe_2O_3 (θεωρητική τιμή: $22,06\%$) (Σχήμα 95^B).



Σχήμα 95. Α) Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν σε έναν 3D εκτυπωμένο αισθητήρα γλυκόζης απουσία (μαύρο) και παρουσία 1 mmol L⁻¹ γλυκόζης (κόκκινο). Β) Διάγραμμα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) του [Fe₃O(PhCO₂)₆(H₂O)₃]-PhCO₂ σε εύρος θερμοκρασίας από 25–800 °C.

Το Σχήμα 96 απεικονίζει τις βολταμμετρικές αποκρίσεις του 3D ηλεκτροδίου εργασίας μορφοποιημένου με το σύμπλοκο [Fe₃O(PhCO₂)₆(H₂O)₃]-PhCO₂ και ενός αντίστοιχα μορφοποιημένου με οξείδιο σιδήρου (III) ηλεκτροδίου, έναντι 200 μmol L⁻¹ γλυκόζης (GLU), σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4). Το ηλεκτρόδιο, που μορφοποιήθηκε με το σύμπλοκο Fe(III) παρουσίασε ικανοποιητική συμπεριφορά, παρέχοντας μια καλά σχηματισμένη κορυφή οξειδωσης της γλυκόζης, ενώ το άλλο ηλεκτρόδιο, που μορφοποιήθηκε με το Fe₂O₃, εμφάνισε σχεδόν μηδενική απόκριση στην οξειδωση της γλυκόζης σε όξινο περιβάλλον. Έχει τεκμηριωθεί σε προηγούμενες μελέτες πως ηλεκτρόδια που βασίζονται στα οξείδια Fe₂O₃, Fe₃O₄ και το FeO(OH) απαιτούν ουδέτερο ή βασικό περιβάλλον για να σχηματίσουν Fe(III), το οποίο καταλύει αποτελεσματικά την οξειδωση της γλυκόζης^[306-310].

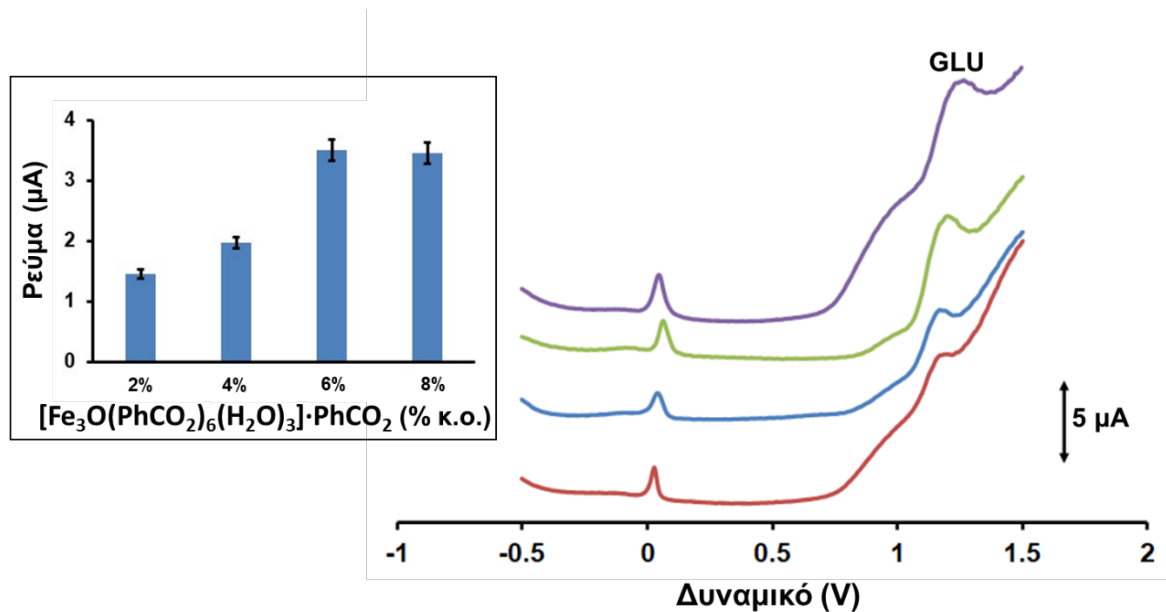


Σχήμα 96. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού ενός 3D ηλεκτροδίου από CB/PLA, μορφοποιημένου με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ (6 % κ.ο σε αιθανόλη) (μπλε και μαύρο) και ενός ηλεκτροδίου μορφοποιημένου με Fe_2O_3 (6 % κ.ο. σε αιθανόλη) (πράσινο και κόκκινο) έναντι $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών με pH 4. Στάδιο προσυγκέντρωσης για το σύμπλοκο Fe (III): $-1,4 \text{ V}$ για 360 s. Για το Fe_2O_3 δεν εφαρμόστηκε στάδιο προσυγκέντρωσης.

10.1.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης

Η επίδραση της συγκέντρωσης του $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ που εναποτίθεται στην επιφάνεια του 3D ηλεκτροδίου, το δυναμικό και ο χρόνος προσυγκέντρωσης για την επιτόπια ηλεκτρογενετική παραγωγή του Fe (III), εξετάστηκαν στις βολταμμετρικές αποκρίσεις ενός διαλύματος φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), που περιείχε γλυκόζη (Σχήματα 97–99).

Όπως δείχνει το Σχήμα 97, το ηλεκτρόδιο που μορφοποιήθηκε με σύμπλοκο Fe (III) σε ποσοστό 6 % κ.ο., πρόσφερε περίπου 1,5 φορές υψηλότερο βολταμμετρικό ύψος κορυφής της γλυκόζης από αυτό του 4 %, και 2,5 φορές υψηλότερο από αυτό του 2 % κ.ο., ενώ η ευαισθησία του ήταν συγκρίσιμη με αυτή του 8 % κ.ο. Ως εκ τούτου, το αιθανολικό διάλυμα του $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ 6 % κ.ο. επιλέχθηκε ως το βέλτιστο, συνδυάζοντας την ελάχιστη κατανάλωση Fe(III)–συμπλόκου με την υψηλή βολταμμετρική απόκριση της γλυκόζης σε όξινες συνθήκες.

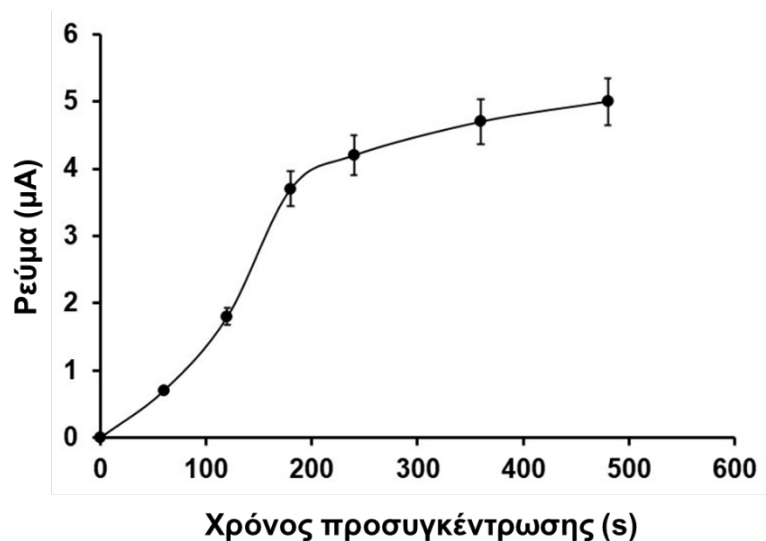


Σχήμα 97. Η επίδραση της συγκέντρωσης του $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών ($\text{pH } 4$) και τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού (2, 4, 6 και 8 % κ.ο. από κάτω προς τα πάνω). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$). Στάδιο προσυγκέντρωσης: $-1,4 \text{ V}$ για 360 s .

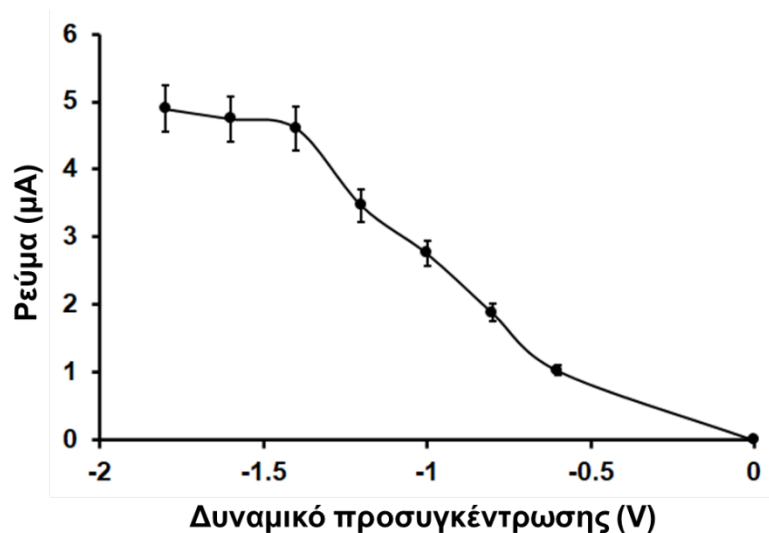
Η επίδραση του χρόνου και του δυναμικού προσυγκέντρωσης του Fe(III) -συμπλόκου στην επιφάνεια του 3D ηλεκτροδίου εξετάστηκε στο εύρος 0 έως 480 s και από $-1,6$ έως 0 V, αντίστοιχα. Αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν την ποσότητα του ηλεκτροπαραγόμενου Fe(III) και, ως εκ τούτου, την ηλεκτροκαταλυτική ικανότητα του 3D εκτυπωμένου αισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 98, οι αποκρίσεις οξειδωσης γλυκόζης αυξήθηκαν με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης.

Όσον αφορά στο δυναμικό προσυγκέντρωσης, παρατηρήθηκε μία σιγμοειδής εξάρτηση σε σχέση με την απόκριση οξειδωσης της γλυκόζης (Σχήμα 99). Τα ύψη των κορυφών της γλυκόζης ήταν χαμηλά σε πιο θετικά δυναμικά, καθώς οι τιμές αυτών των δυναμικών δεν ήταν επαρκώς αρνητικές για να εδραιωθεί η αναγωγή του Fe(III) -συμπλόκου σε μεταλλικό Fe(0) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ενώ σε πιο αρνητικά δυναμικά ευνοήθηκε η εναπόθεση του Fe(0) στο ηλεκτρόδιο και έτσι, οι κορυφές της γλυκόζης αυξήθηκαν ραγδαία μέχρι τα $-1,4 \text{ V}$, όπου και εξομαλύνθηκαν. Για τα περαιτέρω πειράματα επιλέχθηκε ως στάδιο προσυγκέντρωσης τα $-1,4 \text{ V}$ για 360 s ,

ως ένας ικανοποιητικός συνδυασμός μεταξύ υψηλής ευαισθησίας και μικρών χρόνων ανάλυσης.



Σχήμα 98. Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$, εφαρμόζοντας δυναμικό προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

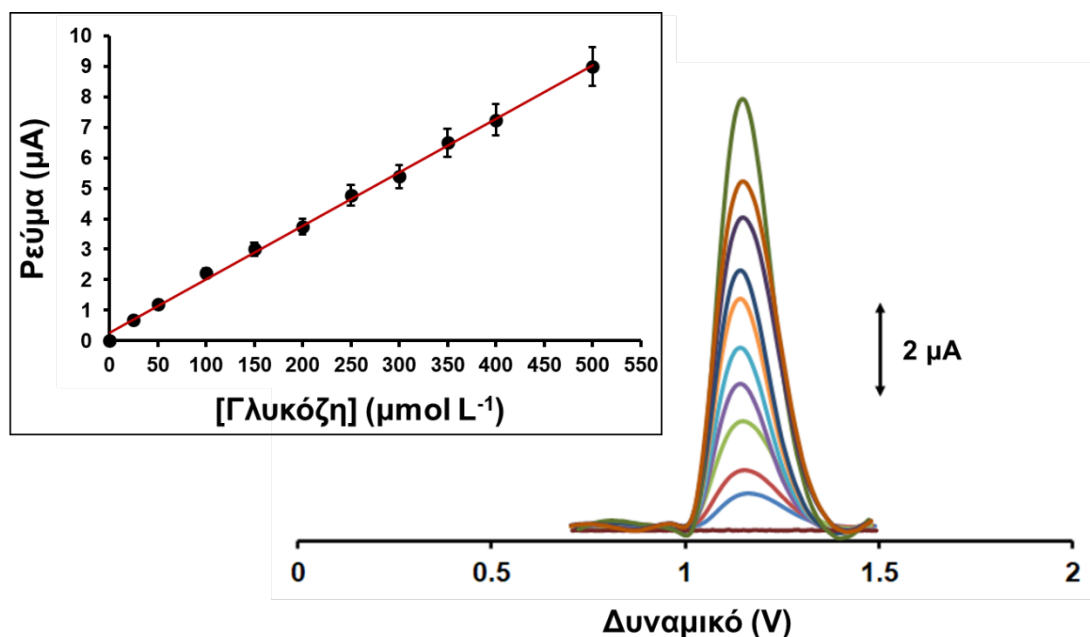


Σχήμα 99. Η επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot \text{PhCO}_2$, εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 360 s. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

10.1.4 Καμπύλη αναφοράς

Η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τον αισθητήρα, που μορφοποιήθηκε με το $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$, λήφθηκε με βολταμμετρία διαφορικού παλμού, σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), στο εύρος συγκέντρωσης 25 έως $500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (Σχήμα 100). Η βολταμμετρική απόκριση του αισθητήρα στην οξείδωση της γλυκόζης αυξανόταν γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,998$, και η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν εντός των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης που εκκρίνονται στον ανθρώπινο ιδρώτα^[93].

Το όριο ανίχνευσης (LOD), που υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς, μέσω της εξίσωσης $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$, βρέθηκε $4,3 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Το LOD που επιτεύχθηκε με τον μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ αισθητήρα, σε όξινες συνθήκες ιδρώτα, είναι συγκρίσιμο με τα LODs άλλων ηλεκτροδίων, που μορφοποιήθηκαν με ενώσεις του σιδήρου, και εφαρμόστηκαν σε ουδέτερο ή βασικό pH (Πίνακας 9).



Σχήμα 100. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού προσδιορισμού γλυκόζης, που ελήφθησαν με τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα σε εύρος συγκέντρωσης $0 - 500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ($0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400$ και $500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω), σε διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) με στάδιο προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$ για 360 s . Εσωκλείεται: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

Ηλεκτρόδιο	Μορφοποίηση	Περιβάλλον εφαρμογής (pH)	LOD	Αναφορά
Υαλώδους άνθρακα	Fe ₂ O ₃	Ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικών (7,5)	0,6 μmol L ⁻¹	306
Υαλώδους άνθρακα	Fe ₂ O ₃	Ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικών (7,5)	6,0 μmol L ⁻¹	307
Υαλώδους άνθρακα	Fe ₃ O ₄	Ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικών (7,0)	15 μmol L ⁻¹	308
Φύλλο σιδήρου	Fe ₃ O ₄	NaOH (13)	0,1 μmol L ⁻¹	309
Υαλώδους άνθρακα	FeO(OH)	Ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικών (7,4)	7,8 μmol L ⁻¹	310

Πίνακας 9. Αναλυτικά χαρακτηριστικά και συνθήκες εφαρμογής άλλων μη-ενζυμικών μορφοποιημένων αισθητήρων γλυκόζης.

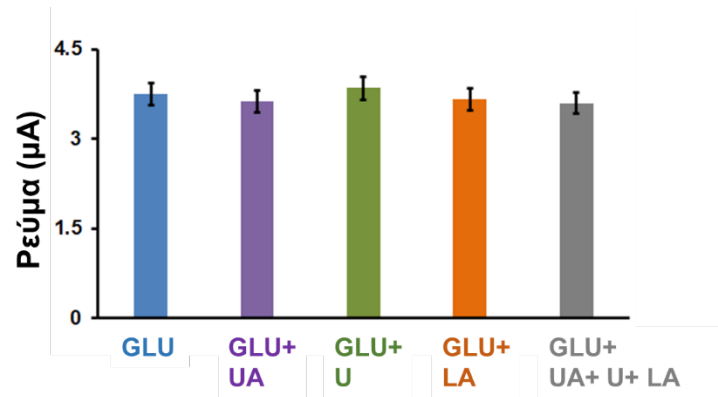
10.1.5 Σταθερότητα αισθητήρα

Η αναπαραγωγιμότητα της ηλεκτροχημικής μεθόδου μελετήθηκε, εξετάζοντας δέκα επαναληπτικές αποκρίσεις ενός αισθητήρα σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4), που περιείχε 250 μmol L⁻¹ γλυκόζης και η % σχετική τυπική απόκλιση %RSD, βρέθηκε 4,8 %. Επιπλέον, εξετάστηκαν οι βολταμμετρικές αποκρίσεις σε έξι διαφορετικούς αισθητήρες έναντι 250 μmol L⁻¹ γλυκόζης σε 0,1 mol L⁻¹ διαλύματος φωσφορικών (pH 4) και η τιμή της %RSD βρέθηκε 8,1 %, αποκαλύπτοντας την ακρίβεια και καταλληλότητα του μορφοποιημένου 3D αισθητήρα γλυκόζης.

10.1.6 Παρεμβολίσεις

Για τους μη-ενζυμικούς αισθητήρες γλυκόζης, η εκλεκτικότητα είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τις μη-επεμβατικές τους εφαρμογές, καθώς οι αισθητήρες μπορούν να υπόκεινται σε παρεμβολίσεις από άλλους βιοδείκτες [όπως ουρία (U), ουρικό οξύ (UA) και γαλακτικό οξύ (LA)], που συνυπάρχουν στα βιολογικά δείγματα και ενδέχεται να επηρεάσουν την ακρίβεια παρακολούθησης της γλυκόζης.

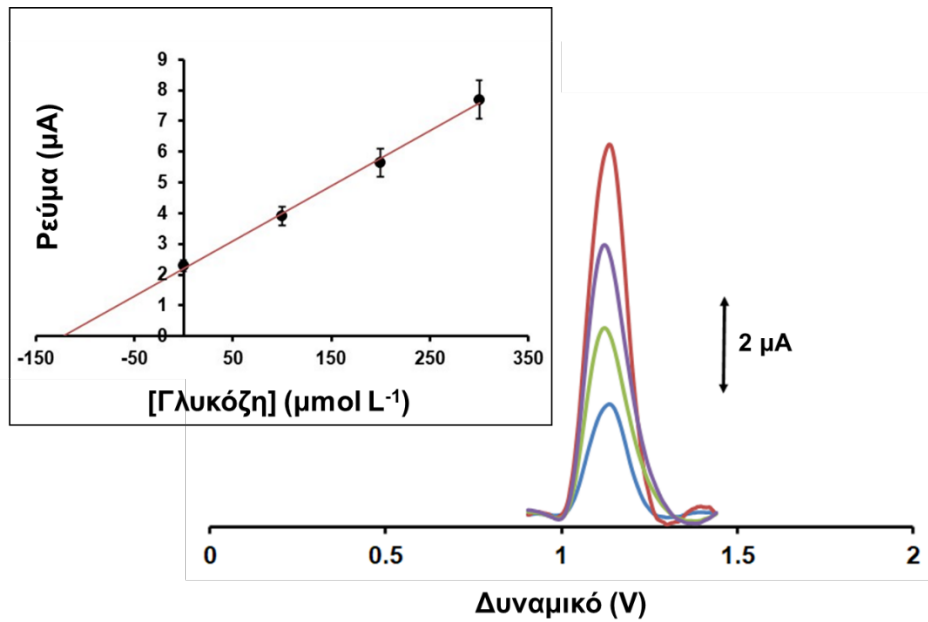
Προκειμένου να εξεταστεί η εκλεκτικότητα του [Fe₃O(PhCO₂)₆(H₂O)₃]·PhCO₂ στον ιδρώτα, 220 mmol L⁻¹ ουρίας, 250 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος και 55 mmol L⁻¹ γαλακτικού οξέος, προστέθηκαν ξεχωριστά και μαζί σε συνθετικό ιδρώτα που περιείχε 200 μmol L⁻¹ γλυκόζης, και μελετήθηκε η επίδρασή τους στη βολταμμετρική κορυφή οξειδωσης της γλυκόζης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 101, οι παραπάνω βιοδείκτες δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική επίδραση στην κορυφή οξειδωσης της γλυκόζης, αποδεικνύοντας την ικανοποιητική εκλεκτικότητα του μορφοποιημένου 3D αισθητήρα γλυκόζης έναντι άλλων συνηθών βιοδεικτών του ιδρώτα.



Σχήμα 101. Η επίδραση των διαφόρων βιοδεικτών του ιδρώτα στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος, που ελήφθησαν με ένα 3D ηλεκτρόδιο μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ σε συνθετικό ιδρώτα, επιμολυσμένο με $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (μπλε μπάρα), $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (μωβ μπάρα), $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 220mmol L^{-1} ουρίας (πράσινη μπάρα), $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 55mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (πορτοκαλί μπάρα), $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος + 220mmol L^{-1} ουρίας + 55mmol L^{-1} γαλακτικού οξέος (γκρι μπάρα). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$).

10.1.7 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

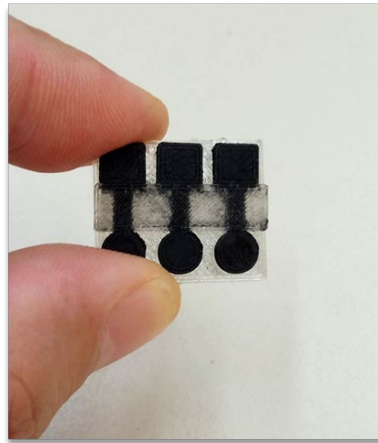
Προκειμένου να αξιολογηθεί η εφαρμοσιμότητα της μη-ενζυματικής μεθόδου στη μη-επεμβατική βιοανάλυση, τρία δείγματα συνθετικού ιδρώτα που περιείχαν 120 (Σχήμα 102), 200 και $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης αναλύθηκαν με τον μορφοποιημένο με $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot\text{PhCO}_2$ αισθητήρα. Ο συνθετικός ιδρώτας περιείχε επίσης $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος, 22mmol L^{-1} ουρίας και $5,5 \text{mmol L}^{-1}$ γαλακτικού οξέος. Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στα δείγματα ιδρώτα εφαρμόστηκε η μέθοδος σταθερής προσθήκης με υπολογισμό των αντίστοιχων τιμών ανάκτησης. Οι τιμές ανάκτησης που επιτεύχθηκαν για τη γλυκόζη ήταν ικανοποιητικές καθώς κυμάνθηκαν από 97 έως 102 %. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ακρίβεια του 3D εκτυπωμένου αισθητήρα, που μορφοποιήθηκε με το Fe(III)-σύμπλοκο, για την ευαίσθητη κι εκλεκτική παρακολούθηση της γλυκόζης στον ιδρώτα.



Σχήμα 102. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον προσδιορισμό γλυκόζης, που ελήφθησαν με τον μορφοποιημένο με $[Fe_3O(PhCO_2)_6(H_2O)_3] \cdot PhCO_2$ 3D αισθητήρα σε δείγμα συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με $120 \mu mol L^{-1}$ γλυκόζης. Εσωκλείεται: το αντίστοιχο διάγραμμα σταθερής προσθήκης. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

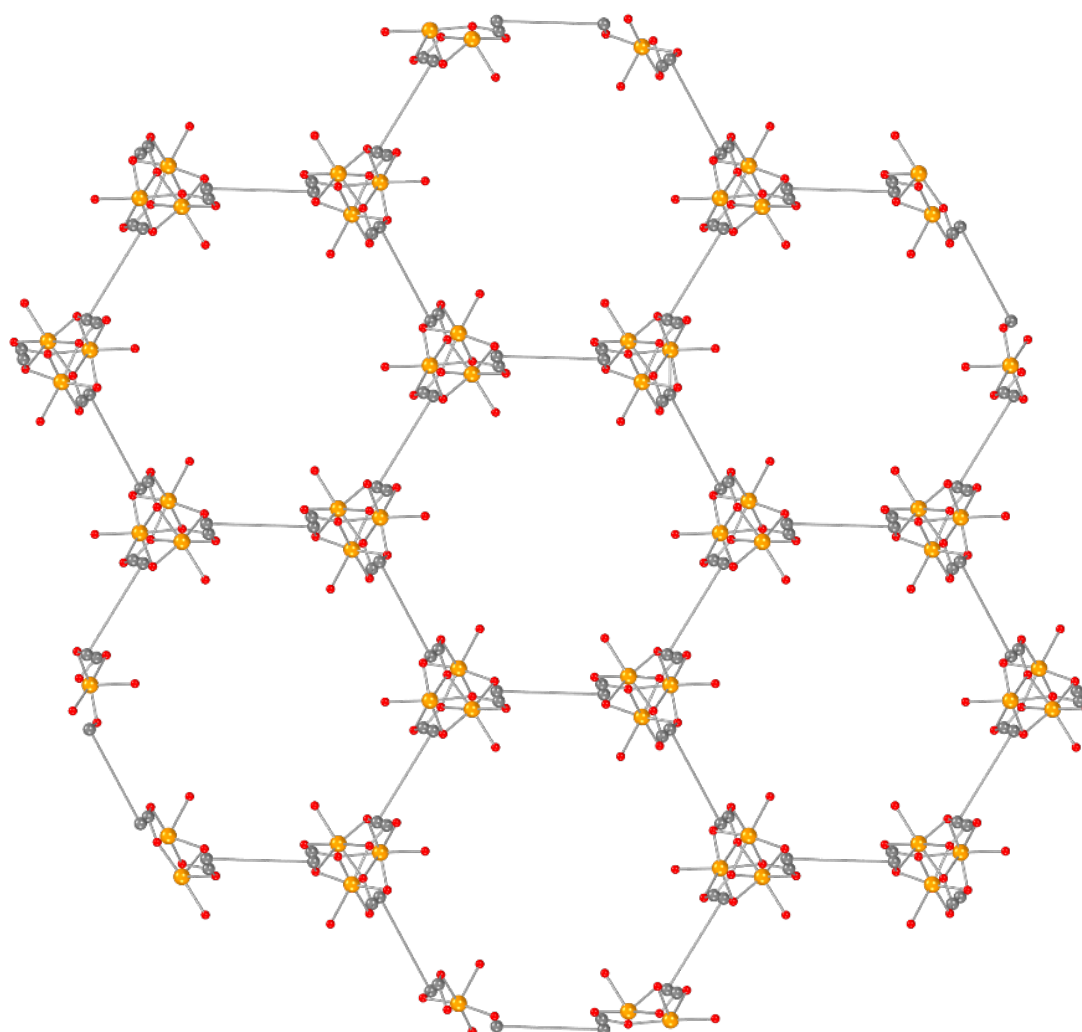
10.2 Προσδιορισμός γλυκόζης με μεταλλο-οργανική κατασκευή σιδήρου (II)

Η 3D διάταξη που εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό γλυκόζης με μεταλλο-οργανική κατασκευή σιδήρου (II) (Fe(II)-MOF), κατασκευάστηκε εξ ολοκλήρου με τρισδιάστατο εκτυπωτή δύο κεφαλών όπως έχει περιγραφεί στο Κεφάλαιο 7, και παρουσιάζεται στην Εικόνα 10:



Εικόνα 10. Φωτογραφία της τρισδιάστατα εκτυπωμένης διάταξης για μη ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης.

Τα βασικά πλεονεκτήματα, όσον αφορά στην κατασκευή και τη λειτουργία της παρουσιαζόμενης συσκευής προσδιορισμού γλυκόζης πηγάζουν από τη συνέργεια του νανοενζύμου Fe(II)-MOF και της εφαρμογής της τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης. Το νανοένζυμο Fe(II)-MOF (Σχήμα 103) μπορεί να λειτουργήσει σε όξινες συνθήκες (σε αντίθεση με άλλους αισθητήρες γλυκόζης με βάση τα MOFs, τα οποία εφαρμόζονται μόνο σε αλκαλικά περιβάλλοντα)^[70,98,125,311]. Η κατασκευή της συσκευής με τρισδιάστατη εκτύπωση περιλαμβάνει τη χρήση ενός εκτυπωτή χαμηλού κόστους, σε μέγεθος επιτραπέζιου υπολογιστή, φτηνά και μη τοξικά νήματα, ευκολία στη λειτουργία, γρήγορη κατασκευή και απουσία αποβλήτων, ξεπερνώντας έτσι τις αδυναμίες των υφιστάμενων τεχνολογιών κατασκευής, που εφαρμόζονται σε συμβατικές ηλεκτροχημικές συσκευές.



Σχήμα 103. Δομή Fe(II)-MOF [Όπου Fe: πορτοκαλί, C: γκρι, O: κόκκινο, τα H παραλείπονται για λόγους καλύτερης απεικόνισης της δομής].

10.2.1 Αρχή ηλεκτροχημικής μεθόδου

Σε 1 mL άνυδρης αιθανόλης διαλύθηκαν 6 mg σκόνης Fe(II)-MOF υπό υπερηχητική ανάδευση για 20 λεπτά για να σχηματιστεί ένα ομοιόμορφο εναιώρημα Fe(II)-MOF που περιείχε 6 mg mL⁻¹ (δηλ. 0,6 % κ.ο.). Στη συνέχεια, 10 μL του αιθανολικού εναιωρήματος Fe(II)-MOF 0,6 % κ.ο. εναποτέθηκαν στην κυκλική επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου εργασίας και αφέθηκαν 5 λεπτά για ακινητοποίηση, ακολουθούμενη από επεξεργασία με ρεύμα αέρα από πιστολάκι μαλλιών για ένα ακόμη λεπτό. Τέλος, 10 μL αιθανολικού διαλύματος Nafion 1% κ.ο. τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια, και το ηλεκτρόδιο αφέθηκε να στεγνώσει.

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτροχημική κυψέλη των 10 mL σε συνθήκες περιβάλλοντος. Για τις βολταμετρικές μετρήσεις διαφορικού παλμού, εφαρμόστηκε δυναμικό $-1,4\text{ V}$ για 120 s και ακολούθησε σάρωση χωρίς ανάδευση για την καταγραφή του βολταμμογραφήματος διαφορικού παλμού, με τις εξής παραμέτρους:

- ✓ Ρυθμός σάρωσης (scan rate): 25 mV s^{-1} .
- ✓ Εύρος παλμού (modulation amplitude): 50 mV .
- ✓ Πλάτος παλμού (pulse width): 75 ms .
- ✓ Ρυθμός εφαρμογής παλμού (pulse repeat time): 50 ms .
- ✓ Αύξηση (increment): 10 mV .

Η βολταμετρική κορυφή της γλυκόζης εμφανίστηκε περίπου στα $\sim 1,2\text{ V}$. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα ελήφθησαν σε $0,1\text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4) που περιείχε γλυκόζη, με ρυθμό σάρωσης 50 mV s^{-1} , μετά από πόλωση του ηλεκτροδίου στα $-1,4\text{ V}$ για 120 s. Η σύνδεση των τριών ηλεκτροδίων της διάταξης με τον ποτενσιοστάτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνδέσμων τύπου κροκόδειλου. Όλα τα δυναμικά αναφέρονται ως προς το τρισδιάστατα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο ψευδο-αναφοράς CB/PLA.

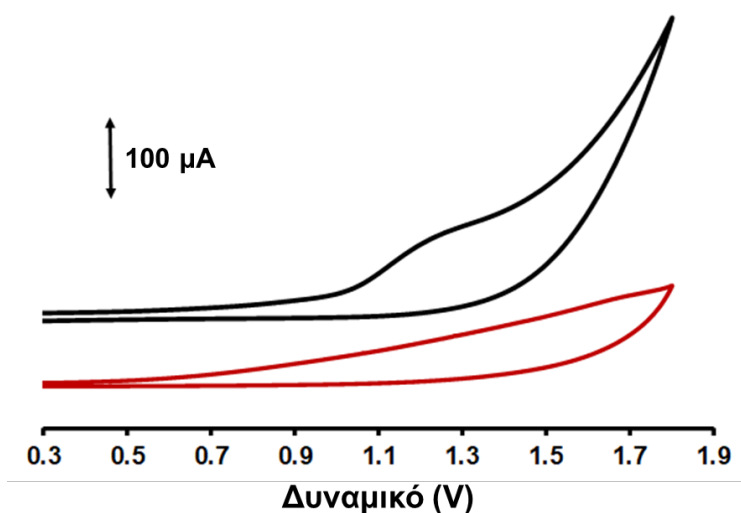
Ο προτεινόμενος μηχανισμός οξειδωσης της γλυκόζης από το νανοένζυμο Fe(II)-MOF στο 3D ηλεκτρόδιο, βασίζεται στην αναγωγή του Fe (II) του Fe(II)-MOF, προς Fe(0), εφαρμόζοντας ένα αρνητικό δυναμικό: $-1,4\text{ V}$ για 120 s. Στη συνέχεια, ο μεταλλικός Fe(0), που σχηματίστηκε από την διαδικασία καθοδικής πόλωσης, οξειδώνεται προς Fe(III), κατά τη διάρκεια σάρωσης του δυναμικού από $-1,4$ έως 2 V . Τελικώς, ο ηλεκτρογενετικά παραγόμενος Fe(III), οξειδώνει τη γλυκόζη, σύμφωνα με την αντίδραση του Σχήματος 94.

10.2.2 Χαρακτηρισμός αισθητήρα

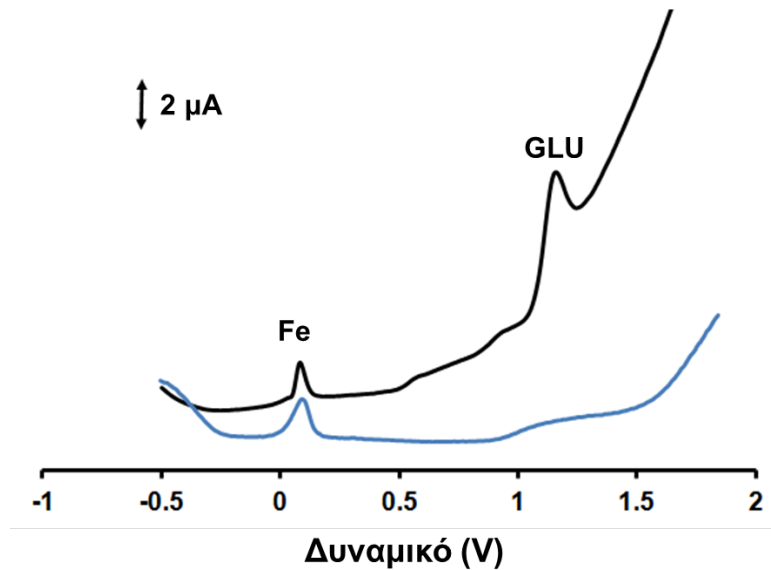
Ο 3D αισθητήρας που μορφοποιήθηκε με το Fe(II)-MOF και ένα μη μορφοποιημένο 3D ηλεκτρόδιο από νήμα CB/PLA, χαρακτηρίστηκαν με κυκλική βολταμετρία (CV) (Σχήμα 104). Σε $0,1\text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών (pH 4), το μη μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο δεν εμφάνισε καμία κορυφή οξειδωσης παρουσία 1 mmol L^{-1} γλυκόζης, υποδεικνύοντας ότι το ηλεκτρόδιο από νήμα CB/PLA, δεν αποκρίνεται στην ηλεκτρο-οξειδωση της γλυκόζης, όπως και αναμενόταν. Από την άλλη πλευρά, το 3D

ηλεκτρόδιο, που μορφοποιήθηκε με το νανοένζυμο Fe(II)-MOF, παρουσίασε κορυφή οξειδωσης περίπου στα 1,2 V παρουσία γλυκόζης (GLU), καθώς η γλυκόζη οξειδώθηκε σε γλυκονολακτόνη, αποδεικνύοντας την ικανότητα του νανοενζύμου Fe(II)-MOF να ανιχνεύει γλυκόζη σε όξινες συνθήκες.

Στο Σχήμα 105, παρουσιάζονται οι βολταμμετρικές αποκρίσεις διαφορικού παλμού (DPV) ενός 3D ηλεκτροδίου από CB/PLA, μορφοποιημένου με Fe(II)-MOF απουσία και παρουσία 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L⁻¹ διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Η 3D εκτυπωμένη διάταξη με το MOF έδωσε μια καλά σχηματισμένη και υψηλή κορυφή οξειδωσης για τη γλυκόζη σε περιβάλλον με ελαφρώς όξινο pH. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι το νανοένζυμο Fe(II)-MOF απορροφά τη γλυκόζη στην επιφάνειά του και την οξειδώνει σε γλυκονολακτόνη μέσω της οξειδοαναγωγικής δραστηριότητας των κέντρων Fe του MOF σε Fe(III), κατά τη διάρκεια της πόλωσης του ηλεκτροδίου εργασίας στα -1,4 V για 120 s και της ακόλουθης ανοδικής σάρωσης δυναμικού.



Σχήμα 104. Κυκλικά βολταμμογραφήματα που ελήφθησαν με το 3D-τυπωμένο ηλεκτρόδιο από CB/PLA (κόκκινο) και το 3D-τυπωμένο ηλεκτρόδιο από CB/PLA, μορφοποιημένο με το νανοένζυμο Fe(II)-MOF (μαύρο) παρουσία 1 mmol L⁻¹ γλυκόζης σε 0,1 mol L⁻¹ διαλύματος φωσφορικών (pH 4).

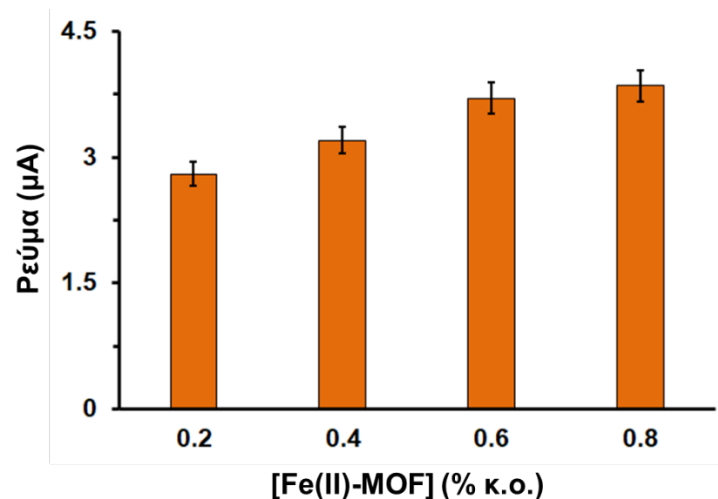


Σχήμα 105. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη, απουσία (μπλε) και παρουσία (μαύρο) 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Ο 3D αισθητήρας CB/PLA μορφοποιήθηκε με 0,6% κ.ο. Fe(II)-MOF και εφαρμόστηκε δυναμικό πόλωσης στα $-1,4$ V για 120 s.

10.2.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης

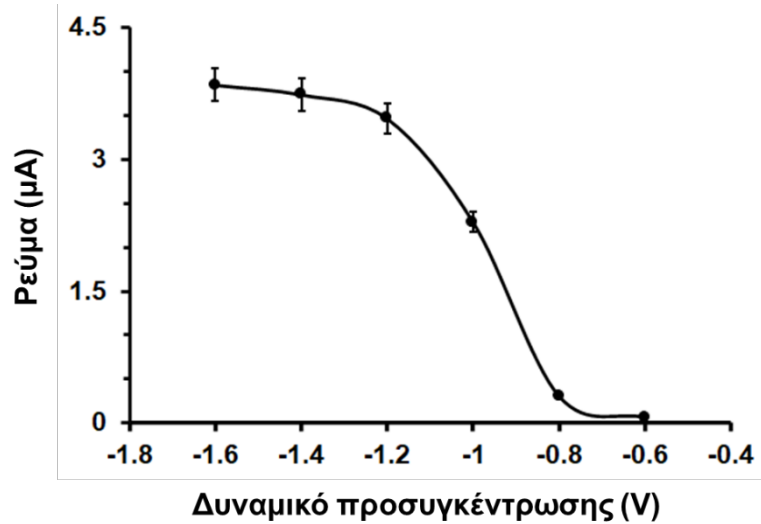
Η επίδραση της συγκέντρωσης του Fe(II)-MOF στην επιφάνεια του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας, το δυναμικό και ο χρόνος προσυγκέντρωσης εξετάστηκαν με την καταγραφή των DP βολταμμογραφημάτων σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} (pH 4) που περιείχε 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζη (Σχήματα 106–108). Η ποσότητα του νανοενζύμου Fe(II)-MOF στο τρισδιάστατα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, επηρεάζει την απορρόφηση της γλυκόζης και τον αριθμό των ενεργών κέντρων Fe, ενώ το δυναμικό και ο χρόνος προσυγκέντρωσης του ηλεκτροδίου, επιδρούν στην οξειδοαναγωγική δραστηριότητα των κέντρων Fe του MOF, από την οποία προκαλείται η οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονολακτόνη.

Αξιολογήθηκαν τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης του νανοενζύμου Fe(II)-MOF στην τρισδιάστατα εκτυπωμένη διάταξη, στο εύρος 0,2 – 0,8 % κ.ο. (ως αιθανολικά εναιωρήματα). Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 106, το επίπεδο Fe(II)-MOF 0,6 % κ.ο. παρουσίασε περίπου 30 % αύξηση του βολταμμετρικού ύψους κορυφής οξείδωσης της γλυκόζης σε σχέση με το 0,2 % κ.ο. και περίπου 16 % αύξηση σε σχέση με το 0,4 % κ.ο. και πρακτικά παρόμοια ευαισθησία με το 0,8 % κ.ο. Έτσι, ως βέλτιστη αναλογία για τα περαιτέρω πειράματα επιλέχθηκε το διάλυμα Fe(II)-MOF 0,6 % κ.ο.

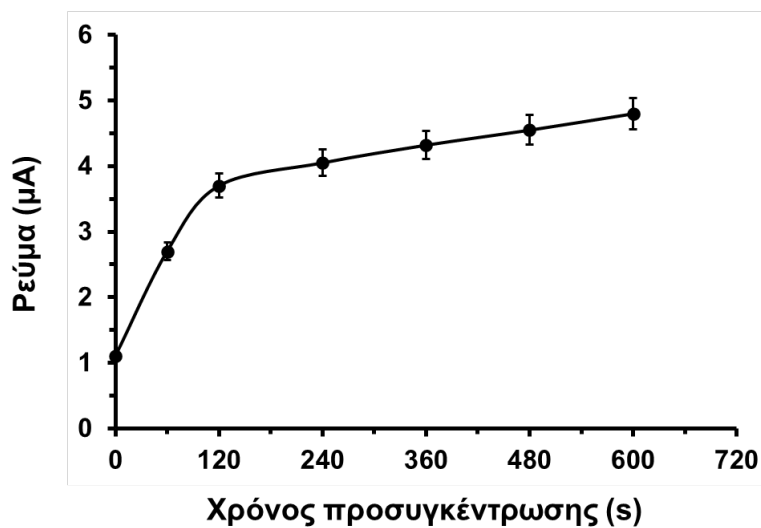


Σχήμα 106. Η επίδραση της συγκέντρωσης του Fe(II)-MOF στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας της 3D διάταξης, στα ύψη των βολταμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L^{-1} διαλύματος φωσφορικών (pH 4). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$). Στάδιο προσυγκέντρωσης: $-1,4$ V για 120 s.

Η επίδραση της εφαρμοζόμενης τιμής και της διάρκειας του δυναμικού προσυγκέντρωσης των MOF/3D-εκτυπωμένων ηλεκτροδίων εργασίας, μελετήθηκε στο εύρος $-1,6$ έως $-0,6$ V και από 60 έως 600 δευτερόλεπτα. Όπως απεικονίζεται στα Σχήματα 107 και 108, τα σήματα οξειδωσης της γλυκόζης ήταν υψηλότερα σε πιο αρνητικά δυναμικά προσυγκέντρωσης και σε χρόνους μεγαλύτερους από 60 s. Για τα επόμενα πειράματα, επιλέχθηκε ως δυναμικό προσυγκέντρωσης τα $-1,4$ V για 120 s, που πρόσφερε ικανοποιητική ευαισθησία σε σύντομο χρόνο ανάλυσης.



Σχήμα 107. Η επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών ($\text{pH } 4$), που ελήφθησαν με μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη, εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 120 s . Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

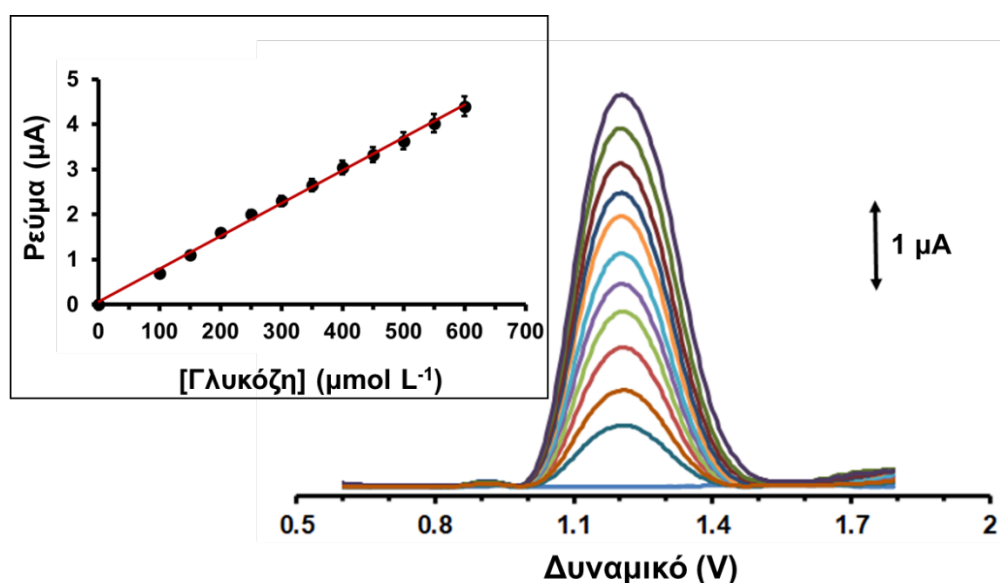


Σχήμα 108. Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στα ύψη των βολταμετρικών κορυφών ρεύματος έναντι $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ διαλύματος φωσφορικών ($\text{pH } 4$), που ελήφθησαν σε μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη, εφαρμόζοντας δυναμικό προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

10.2.4 Καμπύλη αναφοράς

Το Σχήμα 109 απεικονίζει τις βολταμμετρικές αποκρίσεις διαφορικού παλμού και την καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκόζης στη MOF/3D εκτυπωμένη διάταξη. Η καμπύλη ήταν γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων 100–600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης, με συντελεστή συσχέτισης (R^2) ίσο με 0,997. Αυτό το γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων εμπίπτει στα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης που εκκρίνονται στον ανθρώπινο ιδρώτα^[59,93,312]. Το όριο ανίχνευσης (LOD) βρέθηκε 17,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, όπως υπολογίστηκε από την εξίσωση $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$.

Η αισθητήρια ικανότητα της Fe(II)-MOF/3D-εκτυπωμένης διάταξης, συγκριτικά με άλλους αναφερόμενους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες γλυκόζης με βάση τις μεταλλο-οργανικές κατασκευές (MOFs) παρουσιάζεται στον Πίνακα 10. Η πλειονότητα των υφιστάμενων ηλεκτροχημικών αισθητήρων γλυκόζης με βάση τα MOFs, βασίζεται σε συμβατικά ηλεκτρόδια, ενώ ο προσδιορισμός της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω αμπερομετρίας σε ιδιαίτερα αλκαλικά περιβάλλοντα ($\text{pH} \geq 12$) – συνεπώς, είναι ακατάλληλοι για την παρακολούθηση της γλυκόζης στο όξινο περιβάλλον του ιδρώτα.



Σχήμα 109. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τη γλυκόζη, που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε εύρος συγκέντρωσης 0 – 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 και 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω), σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L^{-1} ($\text{pH} 4$) με στάδιο προσυγκέντρωσης $-1,4 \text{ V}$ για 120 s. Εσωκλείεται: η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).

MOF	Ηλεκτρόδιο	Τεχνική	Ηλεκτρολύτης	Δείγμα	Γραμμικότητα	LOD	Αναφορά
Co	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Ουρία	5 – 900	1,6	313
Mn/Co	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	50 – 900 & 1900 – 6900	1,31	314
Co/Ni/Fe	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	2 – 3000	1,13	315
Cu/Co	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Ορός, χυμός	5 – 400	1,6	316
Co	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Ορός, χυμός	10 – 1200	3,2	317
Cu	Πάστας C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	5 – 3910 & 3910 – 10950	0,11	318
Cu	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,01 mol L ⁻¹	Ουρία	0,06 – 5000	0,0105	319
Ni	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	1 – 3000	1,0	320
Ni	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Αναφυκτικά	5 – 10950	3,82	321
Ni/Mn	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	4,9 – 2200	0,87	322
Ni	Υαλώδους C	AMP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Ορός	1 – 500	0,25	323
Fe(II)	3D (CB/PLA)	DPV	PB 0,1 mol L ⁻¹ pH 4	Συνθετικός ιδρώτας	100 – 600	17,6	Παρούσα μελέτη

Πίνακας 10. Σύγκριση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς μη-ενζυμικών αισθητήρων γλυκόζης που βασίζονται σε μεταλλο-οργανικές κατασκευές. Η γραμμικότητα και τα όρια ανίχνευσης εκφράζονται σε $\mu\text{mol L}^{-1}$.

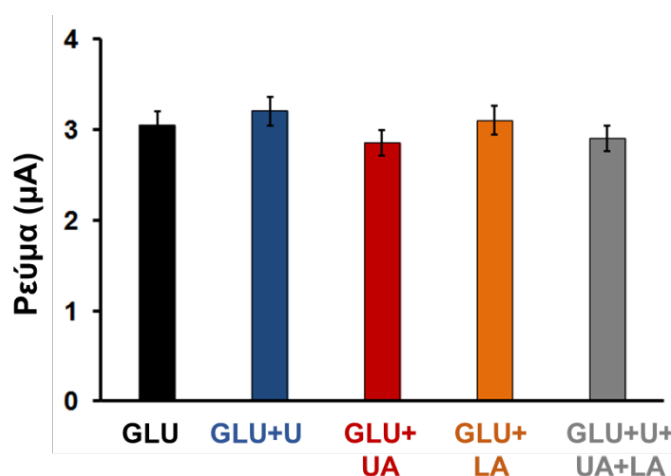
10.2.5 Σταθερότητα αισθητήρα

Η αναπαραγωγιμότητα της ηλεκτροχημικής μεθόδου μελετήθηκε, εξετάζοντας οκτώ επαναληπτικές αποκρίσεις μίας Fe(II)-MOF/3D εκτυπωμένης διάταξης σε διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4), που περιείχε 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD), βρέθηκε 5,2 %. Επιπλέον, εξετάστηκαν οι βολταμετρικές αποκρίσεις σε πέντε διαφορετικές συσκευές, έναντι 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης σε 0,1 mol L⁻¹ διαλύματος φωσφορικών (pH 4) και η τιμή % RSD βρέθηκε 8,8 %, υποδεικνύοντας την καλή ακρίβεια και καταλληλότητα της MOF/ 3D διάταξης για τον προσδιορισμό της γλυκόζης.

10.2.6 Παρεμποδίσσεις

Η εκλεκτικότητα αποτελεί έναν βασικό παράγοντα των ηλεκτροχημικών αισθητήρων για την εφαρμογή τους σε ιδρώτα, καθώς οι συνυπάρχοντες οξειδώσιμοι βιοδείκτες μπορούν να επηρεάσουν την ανίχνευση της γλυκόζης. Τέτοιοι τυπικοί μεταβολίτες του ιδρώτα είναι η ουρία (U), το γαλακτικό οξύ (LA) και το ουρικό οξύ (UA)^[59,93,312]. Για να

διερευνηθεί η εκλεκτικότητα της MOF/3D-εκτυπωμένης συσκευής, προστέθηκαν 220 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρίας, 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γαλακτικού οξέος και 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος ξεχωριστά και σε συνδυασμό σε συνθετικό ιδρώτα που περιείχε 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και εξετάστηκε η επίδρασή τους στην κορυφή οξειδωσης DPV της γλυκόζης (Σχήμα 110). Αυτοί οι μεταβολίτες του ιδρώτα δεν επηρέασαν στατιστικά την DPV απόκριση της οξειδωσης της γλυκόζης, αποκαλύπτοντας την ικανοποιητική εκλεκτικότητα της MOF/3D-εκτυπωμένης διάταξης για την παρακολούθηση της γλυκόζης στον ιδρώτα.

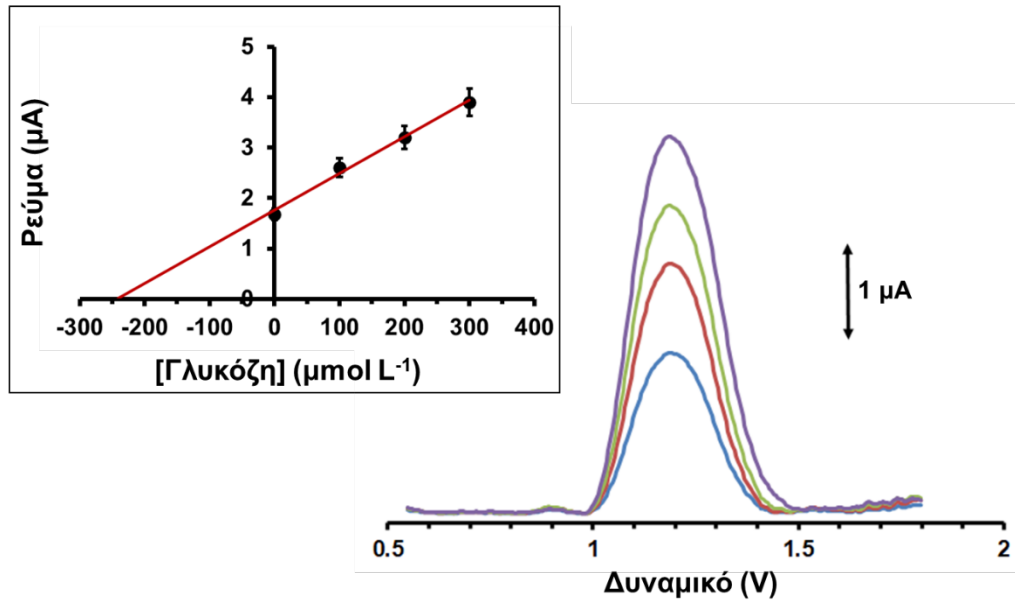


Σχήμα 110. Η επίδραση των διαφόρων βιοδεικτών του ιδρώτα στα ύψη των βολταμμετρικών κορυφών ρεύματος, που ελήφθησαν σε μία Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε συνθετικό ιδρώτα, επιμολυσμένο με 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης (μαύρη μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 220 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρίας (μπλε μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (κόκκινη μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γαλακτικού οξέος (πορτοκαλί μπάρα), 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος + 220 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ουρίας + 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γαλακτικού οξέος (γκρι μπάρα). Κάθε σημείο στις μπάρες είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης \pm SD ($n = 3$).

10.2.7 Εφαρμογή σε συνθετικό ιδρώτα

Η εφαρμοσιμότητα της MOF/3D νανοενζυμικής συσκευής για την παρακολούθηση της γλυκόζης εξετάστηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης. Για το σκοπό αυτό, αναλύθηκαν δύο δείγματα συνθετικού ιδρώτα που περιείχαν 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Σχήμα 111) και 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης. Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα ιδρώτα και των αντίστοιχων τιμών ανάκτησης, εφαρμόστηκε η μέθοδος σταθερής προσθήκης.

Οι τιμές ανάκτησης ήταν 96 και 102%, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την ακρίβεια της μεθοδολογίας, που αξιοποιήθηκε με την MOF/3D-τυπωμένη συσκευή.



Σχήμα 111. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού για τον προσδιορισμό γλυκόζης, που ελήφθησαν με την Fe(II)-MOF/3D διάταξη σε δείγμα συνθετικού ιδρώτα επιμολυσμένου με 250 μmol L⁻¹ γλυκόζης. Εσωκλείεται: το αντίστοιχο διάγραμμα σταθερής προσθήκης. Κάθε σημείο στην καμπύλη είναι η μέση τιμή τυπικής απόκλισης ± SD (n = 3).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο

ΑΓΩΓΙΜΟ ΘΕΡΜΟΠΛΑΣΤΙΚΟ ΝΗΜΑ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Ο τομέας της κατασκευής εντός του εργαστηρίου, ηλεκτροχημικών πολυμερικών αγώγιμων νημάτων, τα οποία ενσωματώνουν λειτουργικά στοιχεία και χρησιμοποιούνται για την τρισδιάστατη εκτύπωση αναλυτικών αισθητήρων έτοιμων προς χρήση, παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητος. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το κενό, στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μίας νέας γενιάς πολυλειτουργικών νημάτων, εμπλουτισμένων με νανοσωματίδια (NPs) βισμούθιου και χαλκού για την τρισδιάστατη εκτύπωση ηλεκτροχημικών αισθητήρων έτοιμων προς χρήση.

Το αγώγιμο νήμα παράγεται με μια απλή διαδικασία, η οποία περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7, και περιλαμβάνει τη διάλυση σφαιριδίων PLA σε διχλωρομεθάνιο (DCM) και την ανάμιξη με αιθάλη (CB), διμεθυλαιθέρα της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και οξείδια βισμούθιου και χαλκού. Η αιθάλη λειτουργεί ως αγώγιμο πληρωτικό υλικό, ο διμεθυλαιθέρας PEG ως πλαστικοποιητής, ενώ τα δύο μεταλλικά οξείδια χρησιμεύουν ως ενσωματωμένα διλειτουργικά πρόδρομα νανοϋλικά.

Ο σχηματισμός νανοσωματιδίων βισμούθιου (BiNPs) και χαλκού (CuNPs) στον παραγόμενο τρισδιάστατα εκτυπωμένο αισθητήρα πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ηλεκτροχημικής μέτρησης. Το καθοδικό δυναμικό πόλωσης που εφαρμόζεται στον αισθητήρα προκαλεί την αναγωγή και των δύο οξειδίων στις αντίστοιχες μεταλλικές νανοδομές βισμούθιου και χαλκού. Το οξείδιο του βισμούθιου επιλέχθηκε ως μία από τις ενσωματωμένες λειτουργικές πρόδρομες ενώσεις, δεδομένου ότι ηλεκτρόδια με βάση το βισμούθιο παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία σε προσδιορισμούς βαρέων μετάλλων, καθώς και ηλεκτροενεργών οργανικών ουσιών, όπως βιταμίνες, φυτοφάρμακα, νιτροφαινόλες, φαρμακευτικές ουσίες κ.ά.^[324,325] Το οξείδιο του χαλκού ενσωματώθηκε ως δεύτερο λειτουργικό υλικό, επειδή τα ηλεκτρόδια με βάση το χαλκό παρουσιάζουν εξαιρετικές ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες για προσδιορισμούς, χωρίς τη χρήση ενζύμων, διαφόρων βιοδεικτών, όπως γλυκόζη, κρεατινίνη, γαλακτικό οξύ κ.ά.^[326,327]

Ως εκ τούτου, οι εκτυπωμένοι ως έχουν αισθητήρες που κατασκευάζονται από το πολυμερικό νήμα Bi/Cu/CB/PLA περιλαμβάνουν διλειτουργικές ιδιότητες στην ίδια οντότητα και είναι κατάλληλοι για άμεσους προσδιορισμούς, καλύπτοντας ένα ευρύ

φάσμα ηλεκτροαναλυτικών εφαρμογών. Στην παρούσα μελέτη, ο μόλυβδος και το κάδμιο, καθώς και η γλυκόζη και το ουρικό οξύ, επιλέχθηκαν ως μοντέλα αναλύτες για να δειχθεί ο πολυλειτουργικός χαρακτήρας του νήματος Bi/Cu/CB/PLA. Ο Pb(II) και το Cd(II) προσδιορίζονται ταυτόχρονα με ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (ASV) μέσω του σχηματισμού κραμάτων με τα επί τόπου ηλεκτροπαραγόμενα BiNPs και CuNPs. Ο ευαίσθητος ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της γλυκόζης και του ουρικού οξέος δεν απαιτεί την παρουσία οποιουδήποτε ενζύμου, καθώς η οξειδωση της γλυκόζης καταλύεται από τα ιόντα Cu, που σχηματίζεται με ηλεκτρόλυση από το ενσωματωμένο CuO, ενώ το ουρικό οξύ υφίσταται άμεση οξειδωση.

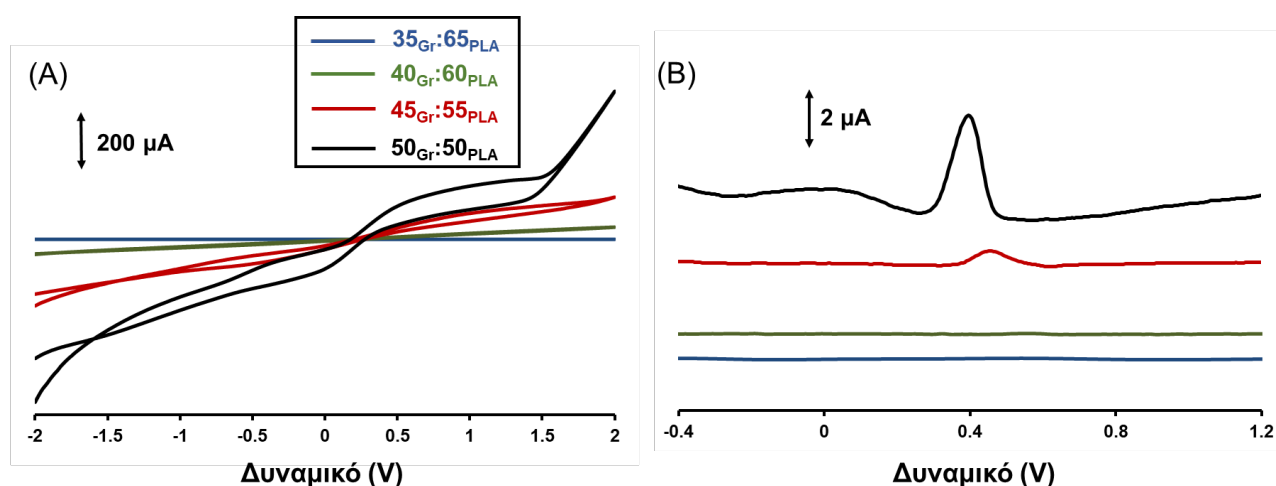
11.1 Επιλογή μορφής άνθρακα

Δοκιμάστηκαν δύο μορφές άνθρακα ως πληρωτικά υλικά του νήματος: **γραφίτης** (*Graphite – Gr*) και **αιθάλη** (*Carbon Black – CB*), ενώ η επιλογή της καταλληλότερης μορφής βασίστηκε στη βέλτιστη ηλεκτροχημική συμπεριφορά του παραγόμενου αισθητήρα. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν νήματα με διάφορες περιεκτικότητες γραφίτη ή αιθάλης ως προς το *PLA*, απουσία Bi_2O_3 και *CuO*. Στην περίπτωση του γραφίτη οι περιεκτικότητες που εξετάστηκαν ήταν 20–25–30–35–40–45–50 % κ.β., ενώ στην περίπτωση της αιθάλης ήταν 22,5–25–27,5–30 % κ.β. ως προς *PLA*. Τα ηλεκτρόδια που παράχθηκαν από τα νήματα, δοκιμάστηκαν ως προς τις βολταμμετρικές αποκρίσεις τους έναντι του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ και του ουρικού οξέος (*UA*). Συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόδια χαρακτηρίστηκαν με κυκλική βολταμμετρία με ταχύτητα σάρωσης 50 mV s^{-1} και συγκρίθηκε η απόκρισή τους ως προς 2:2, 5:5 και 10:10 mmol L^{-1} διαλυμάτων $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ *KCl*. Επιπλέον, συγκρίθηκε η απόκρισή τους έναντι του ουρικού οξέος με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Ο προσδιορισμός του ουρικού οξέος πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ και pH 7. Πριν από κάθε μέτρηση εφαρμοζόταν δυναμικό $-1,0 \text{ V}$ για 120 s, ενώ η εφαρμογή της σάρωσης γινόταν σε στατικό περιβάλλον, με τις ακόλουθες παραμέτρους:

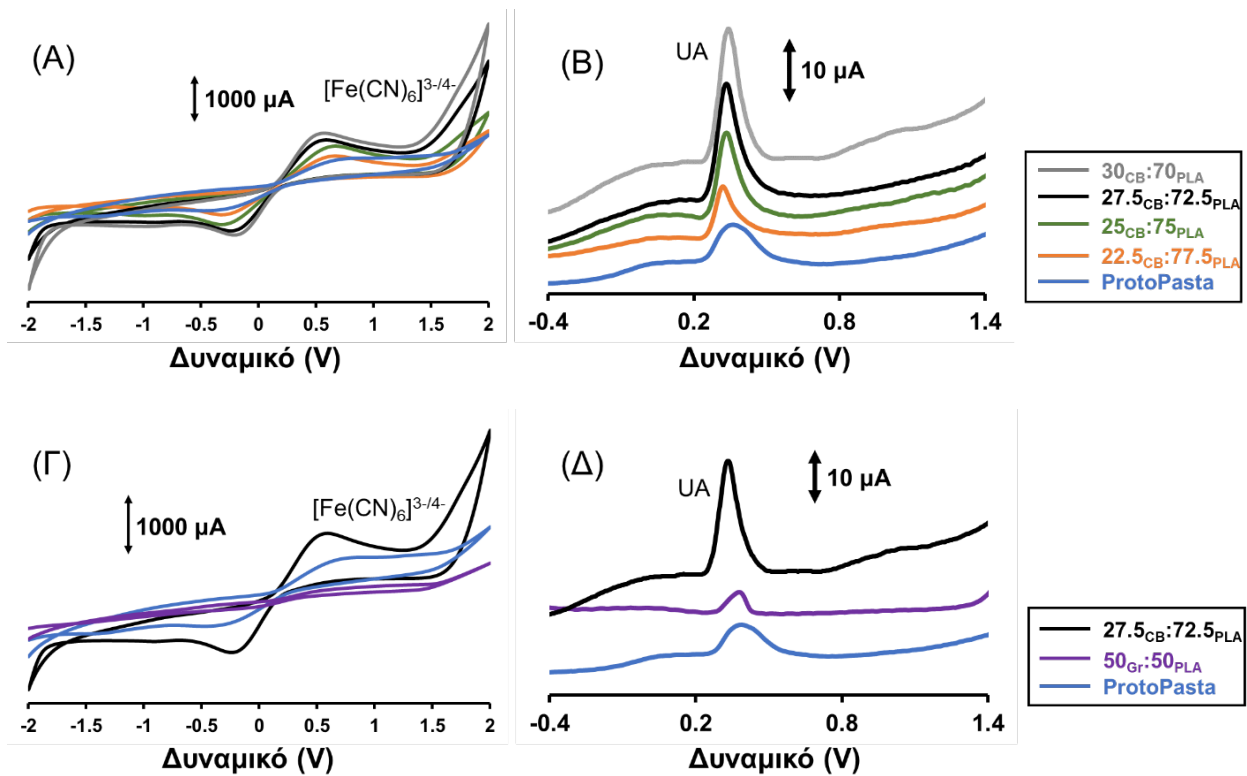
- ✓ Ρυθμός σάρωσης (scan rate): 25 mV s^{-1} .
- ✓ Εύρος παλμού (modulation amplitude): 50 mV.
- ✓ Πλάτος παλμού (pulse width): 75 ms.

- ✓ Ρυθμός εφαρμογής παλμού (pulse repeat time): 50 ms.
- ✓ Αύξηση (increment): 10 mV.

Όπως προκύπτει από τα συγκριτικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση του γραφίτη, οι αποκρίσεις των νημάτων με περιεκτικότητες 20 – 40 % κ.β. ως προς PLA, ήταν μηδενικές τόσο για τα ιόντα $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ όσο και για το ουρικό οξύ. Με την αύξηση της περιεκτικότητας του γραφίτη σε 45 και 50 % κ.β. ως προς PLA στο νήμα, παρουσιάστηκε βελτίωση της απόκρισης των αισθητήρων, όπως υποδεικνύεται από την εμφάνιση ασθενών καθοδικών και ανοδικών κορυφών για τα ιόντα $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ και ασθενών βολταμμετρικών σημάτων οξειδωσης του ουρικού οξέος. Μεταξύ αυτών, ο αισθητήρας που παράχθηκε από το νήμα περιεκτικότητας 50 % κ.β. σε γραφίτη, εμφάνισε τις υψηλότερες αποκρίσεις (Σχήμα 112).



Σχήμα 112. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει γραφίτη (Gr) σε διάφορες αναλογίες, σε διάλυμα $10:10 \text{ mMol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. (B) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών, έναντι 80 μmol L^{-1} UA σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). Η σύσταση του κάθε νήματος φαίνεται στο ένθετο του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος.



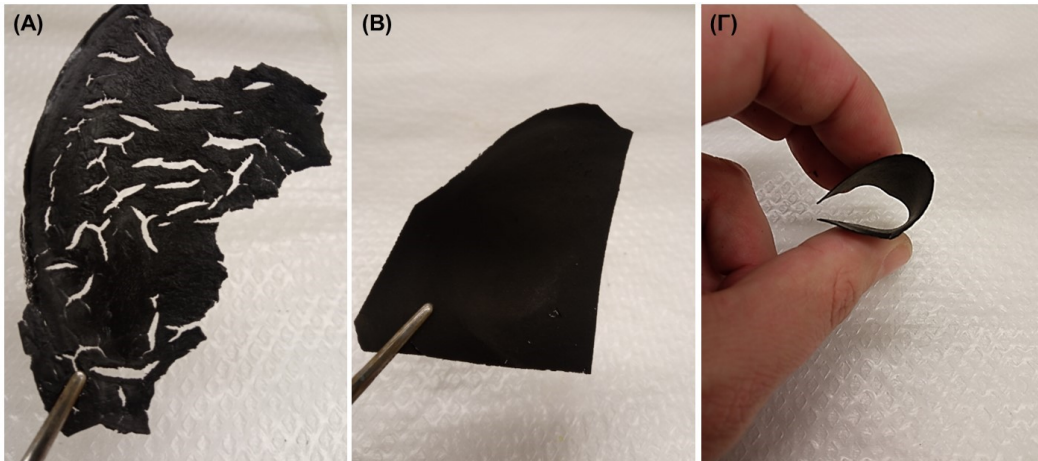
Σχήμα 113. (Α) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει αιθάλη (CB) σε διάφορες αναλογίες και από ένα εμπορικό νήμα (ProtoPasta), σε διάλυμα 10:10 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/ K₄Fe(CN)₆ σε 0,1 mol L⁻¹ KCl. (Β) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών έναντι 80 μmol L⁻¹ UA σε 0,1 mol L⁻¹ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). (Γ) Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων, κατασκευασμένων από αγώγιμο νήμα που περιέχει αιθάλη (CB) 27,5 % κ.β., γραφίτη (Gr) 50 % κ.β. και από ένα εμπορικό νήμα (ProtoPasta), σε διάλυμα 10:10 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/ K₄Fe(CN)₆ σε 0,1 mol L⁻¹ KCl. (Δ) Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού των ηλεκτροδίων αυτών έναντι 80 μmol L⁻¹ UA σε 0,1 mol L⁻¹ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7). Η σύσταση του κάθε νήματος φαίνεται στα δύο ένθετα του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος.

Από την άλλη πλευρά, η αντικατάσταση του γραφίτη με αιθάλη στο νήμα, οδήγησε σε σημαντική ενίσχυση των βολταμμετρικών αποκρίσεων του αισθητήρα. Ακόμη παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο ότι με την αύξηση της περιεκτικότητας του νήματος σε αιθάλη, παρουσιάστηκε αύξηση της απόκρισης των ηλεκτροδίων ως προς το ηλεκτροενεργό ζεύγος K₃Fe(CN)₆/ K₄Fe(CN)₆ αλλά και ως προς το ουρικό οξύ (Σχήμα 113^{A,B}). Συγκεκριμένα, το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα περιεκτικότητας 22,5 % κ.β. ως προς το PLA, πρόσφερε ευαισθησία στο ουρικό οξύ, σχεδόν παρόμοια

με εκείνη ενός ηλεκτροδίου από το εμπορικό νήμα της ProtoPasta. Τα ηλεκτρόδια από νήματα περιεκτικότητας 25–27,5–30 % κ.β., παρουσίασαν υψηλότερες καθοδικές και ανοδικές κορυφές για τα ιόντα $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (Σχήμα 113^A) και ενισχυμένες αποκρίσεις στην οξειδωση του ουρικού οξέος, συγκεκριμένα: ~ 2,1, 3,0 και 3,3 φορές υψηλότερες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με εκείνες των εμπορικών ηλεκτροδίων ProtoPasta (Σχήμα 113^B). Το νήμα με περιεκτικότητα αιθάλης 27,5 % κ.β. ως προς το PLA, παρουσίασε πολύ καλή ηλεκτροχημική συμπεριφορά και σχεδόν συγκρίσιμη με αυτή του νήματος με 30 % κ.β. Όπως προκύπτει από τα συγκριτικά βολταμμογραφήματα, το αγώγιμο νήμα περιεκτικότητας 27,5 % κ.β., παρουσίασε καλύτερη ηλεκτροχημική συμπεριφορά σε σχέση με το εμπορικό, αλλά και με αυτό που περιείχε γραφίτη 50% κ.β. Για το λόγο αυτό, το συγκεκριμένο νήμα επιλέχθηκε ως βέλτιστο (Σχήμα 113^{Γ,Δ}).

11.2 Επιλογή πλαστικοποιητή

Η προσθήκη πλαστικοποιητή κρίθηκε απαραίτητη ώστε το αγώγιμο νήμα να μπορεί να είναι εκτυπώσιμο από τον 3D εκτυπωτή. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11^A, χωρίς την παρουσία πλαστικοποιητή, το υλικό που λήφθηκε ήταν σκληρό, ανομοιογενές και με μεγάλα κενά. Αντίθετα, η προσθήκη πλαστικοποιητή οδήγησε σε ομογενές, λεπτό κι εύκαμπτο πολυμερικό αγώγιμο υλικό, που στη συνέχεια μπορούσε να επεξεργαστεί από τον εξωθητήρα και να προκύψει εκτυπώσιμο αγώγιμο νήμα. Δοκιμάστηκαν σε αναλογία 10 % κ.β. ως προς PLA, οι εξής πλαστικοποιητές: ο διμεθυλαιθέρας πολυαιθυλενογλυκόλης Mn:500 (PEG-500) και η πολυαιθυλενογλυκόλη Mn:2000 (PEG-2000). Από αυτούς, την καλύτερη εκτυπωσιμότητα, την καλύτερη ευκαμπτότητα και τη μικρότερη ευθραυστότητα παρουσίασε ο διμεθυλαιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης (Εικόνα 11^{B,Γ}), ο οποίος και επιλέχθηκε τελικά ως πλαστικοποιητής του αγώγιμου νήματος.



Εικόνα 11. (A) Αγώγιμο πολυμερικό υλικό που αποτελείται από PLA και 27,5 % κ.β. CB. (B),(Γ) Αγώγιμο πολυμερικό υλικό που αποτελείται από PLA, 27,5 % κ.β. CB και 10 % κ.β. PEG-500.

11.3 Μορφοποίηση αγώγιμου νήματος με Bi_2O_3 και CuO

Προκειμένου να παραχθεί ένας προηγμένος πολυλειτουργικός αισθητήρας, κατασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά νήματα CB/PLA με νανოსωματίδια Bi_2O_3 και CuO , μεταβάλλοντας την ποσότητα και των δύο οξειδίων. Υπολογίστηκαν οι αναλογίες μάζας Bi_2O_3 και CuO σε σχέση με το αγώγιμο πληρωτικό υλικό αιθάλης και τα πέντε νήματα CB/PLA εμπλουτίστηκαν με Bi_2O_3 και CuO στις εξής αναλογίες:

- ✓ (10_{Bi} : 0_{Cu} : 100_{CB}),
- ✓ (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu} : 100_{CB}),
- ✓ (5_{Bi} : 5_{Cu} : 100_{CB}),
- ✓ (2,5_{Bi} : 7,5_{Cu} : 100_{CB}) και
- ✓ (0_{Bi} : 10_{Cu} : 100_{CB}).

Ο τελικός λόγος μάζας και η σύνθεση σε % κ.β. των νημάτων Bi/Cu/CB/PLA παρατίθενται στον Πίνακα 11. Η % κ.β. σύσταση κάθε υλικού στο νήμα εκφράστηκε ως το ποσοστό της αναλογίας μάζας του, διαιρούμενο με το άθροισμα των αναλογιών μάζας όλων των συστατικών. Για λόγους ευκολίας, τα νήματα Bi/Cu/CB/PLA συμβολίζονται στο κείμενο ως εξής: (10_{Bi} : 0_{Cu}), (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}), (5_{Bi} : 5_{Cu}), (2,5_{Bi} : 7,5_{Cu}), (0_{Bi} : 10_{Cu}) και (0_{Bi} : 0_{Cu}). Σημειώνεται ότι όλα τα νήματα Bi/Cu/CB/PLA περιείχαν PEG-500 με αναλογία μάζας ως προς προς το PLA, 15,8_{PEG} : 100_{PLA}.

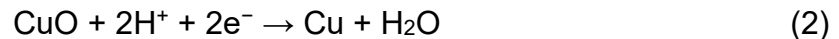
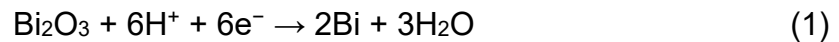
Νήμα	Αναλογία μάζας [Bi/Cu/CB/PLA/PEG]	Σύσταση % κ.β. [Bi/Cu/CB/PLA/PEG]
10 _{Bi} : 0 _{Cu}	3,8/0/38/100/15,8	2,4/0,0/24,1/63,5/10,0
7,5 _{Bi} : 2,5 _{Cu}	2,85/0,95/38/100/15,8	1,8/0,6/24,1/63,5/10,0
5 _{Bi} : 5 _{Cu}	1,9/1,9/38/100/15,8	1,2/1,2/24,1/63,5/10,0
2,5 _{Bi} : 7,5 _{Cu}	0,95/2,85/38/100/15,8	0,6/1,8/24,1/63,5/10,0
0 _{Bi} : 10 _{Cu}	0/3,8/38/100/15,8	0,0/2,4/24,1/63,5/ 10,0
0 _{Bi} : 0 _{Cu}	0/0/38/100/15,8	0,0/0,0/24,7/65,0/10,3

Πίνακας 11. Σύνοψη της σύστασης των Bi/Cu/CB/PLA/PEG νημάτων.

Οι αποκρίσεις της ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας διαφορικού παλμού (DPASV) των πέντε νημάτων Bi/Cu/CB/PLA για την ταυτόχρονη ανίχνευση του Pb(II) και του Cd(II) απεικονίζονται στο Σχήμα 114^{A(i),B}. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε μετά από καθοδική πόλωση των τρισδιάστατα εκτυπωμένων αισθητήρων Bi/Cu στα $-1,6$ V για 360 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,8), ακολουθούμενη από σάρωση του δυναμικού από $-1,6$ έως $2,0$ V.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της καθοδικής πόλωσης, τα νανοσωματίδια Bi₂O₃ και το CuO, ανάχθηκαν σε μεταλλικά BiNPs και CuNPs, ενώ ταυτόχρονα ο Pb(II) και το Cd(II), ανάχθηκαν και προσυγκεντρώθηκαν στην επιφάνεια του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου, σχηματίζοντας κράματα με τα επί τόπου σχηματισμένα μεταλλικά BiNPs και CuNPs. Στη συνέχεια, η εφαρμογή σάρωσης δυναμικού προς θετική κατεύθυνση στο ηλεκτρόδιο, προκάλεσε οξείδωση των προσυγκεντρωμένων μετάλλων, των BiNPs και των CuNPs, παρέχοντας χαρακτηριστικές κορυφές οξείδωσης από την αναδιάλυση (Σχήμα 114^{A(i),B}). Ο μηχανισμός ανίχνευσης DPASV του Pb(II) και του Cd(II) στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, μπορεί να περιγραφεί από τις ακόλουθες αντιδράσεις^[324]:

[Εφαρμογή $-1,6\text{ V}$ για 360 s (αναγωγή)]



[Σάρωση δυναμικού από $-1,6\text{ V}$ έως $2,0\text{ V}$ (οξειδωση)]



Όπως φαίνεται στο Σχήμα 114^B, τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια από άνθρακα της ProtoPasta και από το εργαστηριακό CB/PLA ($0_{\text{Bi}} : 0_{\text{Cu}}$) εμφάνισαν πολύ ασθενείς κορυφές για Pb(II) και Cd(II), κατά την αναδιάλυση. Από την άλλη πλευρά, ο αισθητήρας που εκτυπώθηκε από νήμα που περιείχε μόνο CuO ($0_{\text{Bi}} : 10_{\text{Cu}}$), παρείχε μια μικρή απόκριση στο Cd(II) (παρόμοια με τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια CB/PLA) και μια υψηλότερη βολταμετρική κορυφή για το Pb(II). Η παρουσία Bi₂O₃ στο νήμα, προκάλεσε σημαντική ενίσχυση των αποκρίσεων οξειδωσης τόσο του Pb(II) όσο και του Cd(II), οι οποίες αυξήθηκαν με την αύξηση της περιεκτικότητας του Bi₂O₃ στο νήμα. Επομένως, όσον αφορά στις βολταμετρικές αποκρίσεις έναντι του Pb(II) και του Cd(II), τα πέντε νανο-εμπλουτισμένα νήματα μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: ($10_{\text{Bi}} : 0_{\text{Cu}}$) > ($7,5_{\text{Bi}} : 2,5_{\text{Cu}}$) > ($5_{\text{Bi}} : 5_{\text{Cu}}$) > ($2,5_{\text{Bi}} : 7,5_{\text{Cu}}$) > ($0_{\text{Bi}} : 10_{\text{Cu}}$) > ($0_{\text{Bi}} : 0_{\text{Cu}}$) (Σχήμα 114^B).

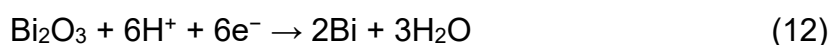
Ο μη-ενζυματικός προσδιορισμός της γλυκόζης (GLU) στα 3D εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, βασίστηκε στην οξειδωση του CuO σε CuO(OH) [Cu(II) → Cu(III)] σε αλκαλικό περιβάλλον, το οποίο κατόπιν, οξειδώνει γρήγορα τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ, σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις^[328]:



Οι αμπερομετρικές αποκρίσεις των ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από τα πέντε νήματα Bi/Cu/CB/PLA έναντι της γλυκόζης σε NaOH (pH 13), παρουσιάζονται στο Σχήμα 114^Γ. Το εφαρμοζόμενο αμπερομετρικό δυναμικό ήταν 0,8 V, το οποίο πρόσφερε αποτελεσματική οξειδωση της γλυκόζης (Σχήματα 114^{A(ii)}). Τα ηλεκτρόδια CB/PLA που περιείχαν μόνο άνθρακα (0_{Bi} : 0_{Cu}) και το ηλεκτρόδιο που εκτυπώθηκε από νήμα που περιείχε μόνο Bi₂O₃ (10_{Bi} : 0_{Cu}), απέτυχαν να ανιχνεύσουν γλυκόζη, καθώς η αιθάλη και το Bi δεν προσφέρουν ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα στην οξειδωση της γλυκόζης. Αντίθετα, η παρουσία CuO στο νήμα διευκόλυνε την οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ και μάλιστα, όσο μεγαλύτερη ήταν η περιεκτικότητα σε CuO στο νήμα, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αντίστοιχη αμπερομετρική απόκριση για τη γλυκόζη. Έτσι, όσον αφορά στην μη-ενζυματική ανίχνευση της γλυκόζης, τα νήματα κατατάχθηκαν ως εξής: (0_{Bi} : 10_{Cu}) > (2,5_{Bi} : 7,5_{Cu}) > (5_{Bi} : 5_{Cu}) > (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) > (10_{Bi} : 0_{Cu}) = (0_{Bi} : 0_{Cu}) (Σχήμα 114^Γ).

Στην περίπτωση της ανίχνευσης ουρικού οξέος (UA) με DPV, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) (0,1 mol L⁻¹, pH 7), όλα τα νήματα Bi/Cu/CB/PLA που εξετάστηκαν, παρουσίασαν σχεδόν παρόμοια ευαισθησία, η οποία ήταν συγκρίσιμη με εκείνη του νήματος CB/PLA (0_{Bi} : 0_{Cu}) που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο (Σχήμα 114^A). Στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7 και έπειτα από ένα στάδιο εφαρμογής -1,0 V για 120 s, το ουρικό οξύ πρόσφερε μια καλά σχηματισμένη κορυφή οξειδωσης, η οποία διαχωριζόταν καλά από τις κορυφές οξειδωσης του Bi και του Cu (Σχήμα 114^{A(iii)}). Ο μηχανισμός ανίχνευσης του ουρικού οξέος στο τρισδιάστατα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, μπορεί να περιγραφεί από τις ακόλουθες αντιδράσεις:

[Εφαρμογή -1,0 V για 120 s (συσσώρευση ουρικού οξέος στο ηλεκτρόδιο)]



[Σάρωση δυναμικού από -1,0 V έως 2,0 V (οξειδωση)]

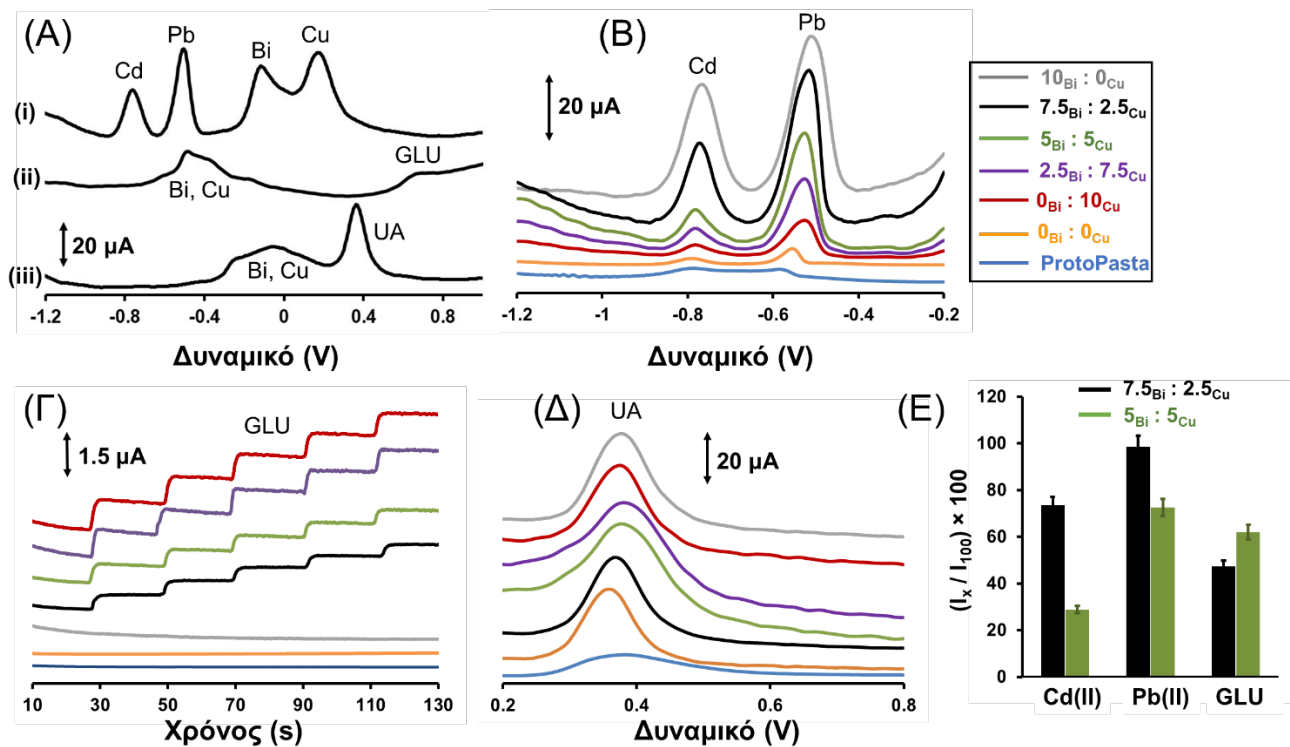


Είναι σαφές ότι η ευαισθησία ανίχνευσης του ουρικού οξέος ήταν σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από την παρουσία Bi₂O₃ και CuO στις εφαρμοζόμενες ποσότητες

πρόδρομων ουσιών στα νήματα Bi/Cu/CB/PLA. Όπως έχει δειχθεί και παραπάνω στον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης (Κεφάλαιο 8), τα ηλεκτρόδια με βάση τον άνθρακα είναι κατάλληλα για τη μη-ενζυματική και άμεση ανίχνευση του ηλεκτροενεργού ουρικού οξέος, που οξειδώνεται σε αλλαντοΐνη^[329-331].

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανίχνευση του Pb(II) και του Cd(II) ενισχύθηκε με υψηλότερη περιεκτικότητα σε Bi₂O₃, η ανίχνευση της γλυκόζης ενισχύθηκε με υψηλότερη περιεκτικότητα σε CuO, ενώ η ανίχνευση του ουρικού οξέος ήταν ανεξάρτητη από το Bi₂O₃ και το CuO. Αυτό σημαίνει ότι τόσο το Bi₂O₃ όσο και το CuO πρέπει να ενσωματωθούν στο νήμα CB/PLA, ώστε οι τρισδιάστατα εκτυπωμένοι αισθητήρες να παρουσιάζουν πολυλειτουργικά χαρακτηριστικά και να είναι σε θέση να ανιχνεύουν Pb(II), Cd(II), ουρικό οξύ και γλυκόζη με υψηλή ευαισθησία. Ως εκ τούτου, η τελική επιλογή της σύστασης των Bi₂O₃ και CuO στο νήμα βασίστηκε στην καλύτερη συνολική απόδοση των αντίστοιχων τρισδιάστατα εκτυπωμένων αισθητήρων έναντι όλων των πρότυπων αναλυτών-στόχων.

Συγκεκριμένα, τα νήματα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) και (5_{Bi} : 5_{Cu}) κρίθηκαν τα πλέον κατάλληλα για την τρισδιάστατη εκτύπωση πολυλειτουργικών αισθητήρων. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το νήμα (10_{Bi} : 0_{Cu}) πρόσφερε τις υψηλότερες αποκρίσεις προς τα βαρέα μέταλλα και το νήμα (0_{Bi} : 10_{Cu}) πρόσφερε την υψηλότερη απόκριση προς τη γλυκόζη, τα νήματα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) και (5_{Bi} : 5_{Cu}) συγκρίθηκαν ως προς τους % λόγους των τιμών ρεύματός τους (I_x) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή ρεύματος (I_{100}) του νήματος (10_{Bi} : 0_{Cu}), στην περίπτωση των μετάλλων, και του νήματος (0_{Bi} : 10_{Cu}), στην περίπτωση της γλυκόζης. Το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) παρείχε % αναλογίες: 73,5 % για το Cd(II), 98,5 % για το Pb(II) και 47,4 % για τη γλυκόζη, ενώ το νήμα (5_{Bi} : 5_{Cu}) παρείχε % αναλογίες: 28,8 % για το Cd(II), 72,5 % για το Pb(II) και 62,1 % για τη γλυκόζη (Σχήμα 114^E). Στην περίπτωση του ουρικού οξέος, και τα δύο νήματα παρείχαν παρόμοιες αποκρίσεις (Σχήμα 114^A). Τελικώς, επιλέχθηκε το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) για την τρισδιάστατη εκτύπωση των ηλεκτροδίων.



Σχήμα 114. A) DP βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) έναντι: (i) 60 μg L⁻¹ Pb(II), Cd(II) μετά την εφαρμογή ενός σταδίου προσυγκέντρωσης στα -1,6 V για 360 s, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0,1 mol L⁻¹, pH 4,8), (ii) 1000 μmol L⁻¹ γλυκόζης χωρίς εφαρμογή προσυγκέντρωσης, σε NaOH (pH 13) και (iii) 80 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος μετά από προσυγκέντρωση στα -1,0 V για 120 s, σε PB (0,1 mol L⁻¹, pH 7).

B) Συγκριτικά DPASV βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από νήματα Bi/Cu/CB/PLA με διαφορετική σύσταση Bi₂O₃ και CuO και από εμπορικό νήμα (ProtoPasta), έναντι 60 μg L⁻¹ Pb(II), Cd(II), μετά την εφαρμογή σταδίου προσυγκέντρωσης στα -1,6 V για 360 s. Γ) Συγκριτικές αμπερομετρικές αποκρίσεις ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από διαφορετικά νήματα Bi/Cu/CB/PLA και από εμπορικό νήμα (ProtoPasta) σε πέντε διαδοχικές προσθήκες 200 μmol L⁻¹ γλυκόζης. Δ) Συγκριτικά DP βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από διαφορετικά νήματα Bi/Cu/CB/PLA έναντι 80 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος. E) Σύγκριση των % σχετικών αποκρίσεων έναντι Pb(II), Cd(II) και γλυκόζης των ηλεκτροδίων που εκτυπώθηκαν από νήματα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) και (5_{Bi} : 5_{Cu}). Η σύσταση κάθε νήματος Bi/Cu/CB/PLA σε Bi₂O₃ και CuO φαίνεται στο ένθετο του σχήματος. Κάθε διαφορετικό νήμα Bi/Cu/CB/PLA απεικονίζεται με το ίδιο χρώμα σε όλα τα πλαίσια του σχήματος.

11.4 Αρχή ηλεκτροχημικών μεθόδων

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτροχημική κυψελίδα 10 mL παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα κορεσμένο ηλεκτρόδιο Ag/AgCl, ως βοηθητικό, έλασμα Pt και ως ηλεκτρόδιο εργασίας ένα 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο. Η σύνδεση των ηλεκτροδίων με τον ποτενσιοστάτη επιτεύχθηκε με συνδέσμους τύπου κροκόδειλου. Η κυκλική περιοχή του τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροδίου βυθιζόταν στο διάλυμα, ενώ ο σύνδεσμος προσαρμοζόταν στην ορθογώνια περιοχή του αισθητήρα. Όλα τα δυναμικά αναφέρονται ως προς το ηλεκτρόδιο Ag/AgCl.

Για τις μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας DPV του Pb(II) και του Cd(II) σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (pH 4,8), εφαρμόστηκε στάδιο προσυγκέντρωσης στα $-1,6 \text{ V}$ για 360 s και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σάρωση δυναμικού και λήφθηκε το βολταμμογράφημα, με τις εξής παραμέτρους:

- ✓ Ρυθμός σάρωσης (scan rate): 25 mV s^{-1} .
- ✓ Εύρος παλμού (modulation amplitude): 50 mV.
- ✓ Πλάτος παλμού (pulse width): 75 ms.
- ✓ Ρυθμός εφαρμογής παλμού (pulse repeat time): 50 ms.
- ✓ Αύξηση (increment): 10 mV.

Στην περίπτωση προσδιορισμού ουρικού οξέος σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7) με DPV, εφαρμόστηκαν $-1,0 \text{ V}$ για 120 s και οι υπόλοιπες παράμετροι ήταν οι ίδιες με των μετρήσεων Pb και Cd.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε αμπερομετρικά σε υπό ανάδευση διάλυμα NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ και το δυναμικό που εφαρμόστηκε στο τρισδιάστατα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας, ρυθμίστηκε στα $+0,8 \text{ V}$.

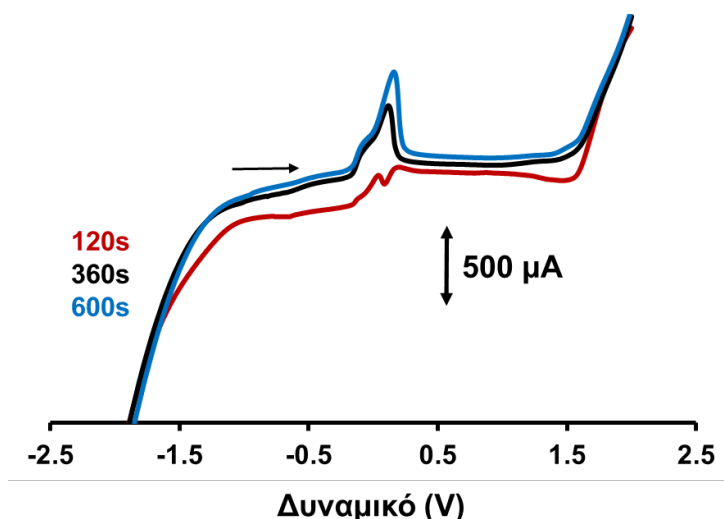
Για την ανάλυση του επιμολυσμένου δείγματος εμφιαλωμένου νερού, 9,0 mL του επιμολυσμένου δείγματος προστέθηκαν στην ηλεκτροχημική κυψελίδα, που περιείχε 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,8) και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 10 μg L^{-1} Pb(II) και Cd(II).

Για την ανάλυση εμπορικών δειγμάτων ανθρώπινου ορού που περιείχαν γλυκόζη, 300 μL από κάθε δείγμα προστέθηκαν στην ηλεκτροχημική κυψελίδα που περιείχε 9,7 mL NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ακολουθούμενα από τρεις διαδοχικές προσθήκες 200 μmol L^{-1} γλυκόζης.

Στην περίπτωση των επιμολυσμένων δειγμάτων ανθρώπινου ορού με ουρικό οξύ, 500 μL από κάθε επιμολυσμένο δείγμα προστέθηκαν στην κυψελίδα που περιείχε 9,5 mL 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 10 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος.

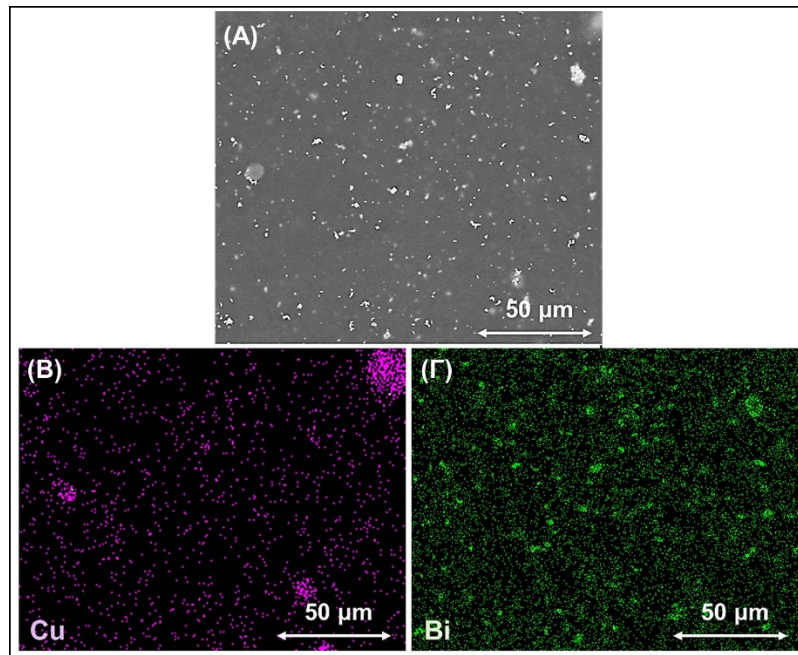
11.5 Χαρακτηρισμός νήματος και αισθητήρα

Ο επιτόπου (in situ) σχηματισμός των BiNPs και CuNPs στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά την καθοδική πόλωση του αισθητήρα με την αναγωγή των δύο πρόδρομων νανοϋλικών (Bi₂O₃ και CuO) σε μεταλλικό Bi και Cu. Ο ηλεκτροσχηματισμός των μεταλλικών BiNPs και CuNPs στον αισθητήρα που εκτυπώθηκε από το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) επιβεβαιώθηκε με την εφαρμογή βολταμμετρίας γραμμικής σάρωσης (LSV), μεταβάλλοντας τη διάρκεια του βήματος πόλωσης στα -1,6 V. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 115, με την αύξηση του χρόνου πόλωσης, αυξανόταν και το ύψος των επικαλυπτόμενων κορυφών οξειδωσης LSV του Bi και του Cu, υποδεικνύοντας ότι μεγαλύτερες ποσότητες Bi₂O₃ και CuO ανάγονταν και δημιουργούνταν περισσότερες μεταλλικές νανοδομημένες περιοχές Bi και Cu.



Σχήμα 115. Βολταμμογραφήματα γραμμικής σάρωσης του τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροδίου που εκτυπώθηκε από το νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) μετά από πόλωση στα -1,6 V για 120 s (κόκκινη γραμμή), 360 s (μαύρη γραμμή) και 600 s (μπλε γραμμή) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,8).

Οι εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM), καθώς και η χαρτογράφηση με ενεργειακή διασπορά ακτίνων Χ (EDX) σε αντιπροσωπευτικές περιοχές του πολωμένου 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας, έδειξαν ότι η επιφάνεια του αισθητήρα καλύπτεται από ηλεκτροπαραγόμενα BiNPs και CuNPs, τα οποία ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένα σε ολόκληρη την εξεταζόμενη περιοχή του αισθητήρα με μικρό μόνο βαθμό συσσωμάτωσης (Εικόνα 12).

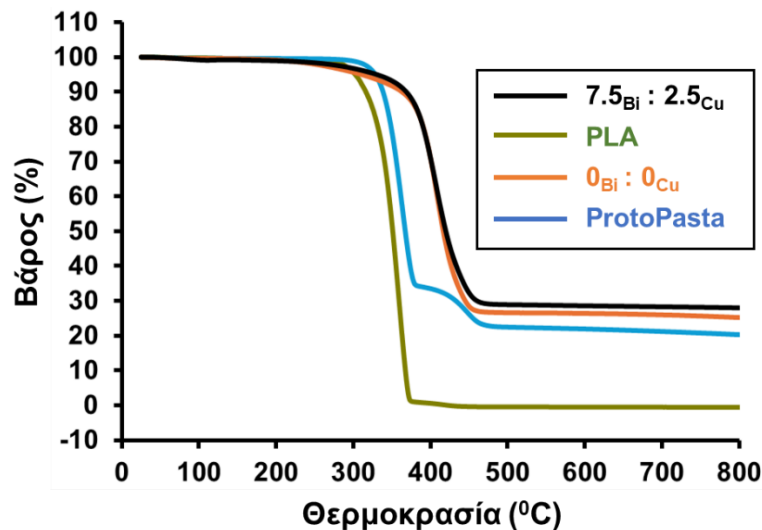


Εικόνα 12. Εικόνες SEM-EDX της επιφάνειας του ηλεκτροδίου που εκτυπώθηκε από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) μετά από πόλωση στα $-1,6$ V για 360 s, (A) εικόνα SEM, (B) χαρτογράφηση EDX που δείχνει τα CuNPs, (C) χαρτογράφηση EDX που δείχνει τα BiNPs.

Η θερμική σταθερότητα όλων των νημάτων που μελετήθηκαν [PLA, εμπορικό CB/PLA (ProtoPasta), εργαστηριακό CB/PLA ($0_{Bi} : 0_{Cu}$) και Bi/Cu/CB/PLA ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$)] εξετάστηκε με θερμοβαρουμετρική ανάλυση (TGA) (Σχήμα 116). Η απώλεια βάρους του νήματος PLA άρχισε στους ~ 280 °C, που αντιστοιχεί στη διάσπαση του πολυμερούς. Η ενσωμάτωση της αιθάλης, ως αγωγίμου πληρωτικού υλικού, είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της θερμικής σταθερότητας, με τη θερμοκρασία διάσπασης να μετατοπίζεται σε υψηλότερες τιμές. Έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι η παρουσία υλικών τύπου άνθρακα στο PLA ενισχύει τη θερμική αγωγιμότητα, βελτιώνοντας έτσι τη θερμική σταθερότητα^[149,151,153]. Το νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) παρουσίασε προφίλ θερμικής

αποικοδόμησης παρόμοιο με εκείνο του ($0_{Bi} : 0_{Cu}$), δείχνοντας ότι η θερμοκρασία εκτύπωσης $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ ήταν κατάλληλη για την τρισδιάστατη εκτύπωση των ηλεκτροδίων.

Εκτός αυτού, η ανάλυση TGA επιβεβαίωσε το ποσοστό μάζας του CB και των λειτουργικών υλικών που ενσωματώθηκαν στα νήματα PLA. Η περιεκτικότητα του αγωγίμου πληρωτικού υλικού και των λειτουργικών υλικών στο PLA, υπολογίστηκε ως το % του βάρους του δείγματος που παρέμεινε μετά τη θέρμανση στους $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, οπότε το PLA είχε ήδη αποικοδομηθεί και το υπόλειμμα αποτελούνταν από CB, Bi_2O_3 και CuO (με σημεία τήξης 3652 , 817 και $1326\text{ }^{\circ}\text{C}$, αντίστοιχα). Στο εμπορικό ProtoPasta, το πληρωτικό CB μετρήθηκε στα $20,3\%$ κ.β., το οποίο ήταν σε συμφωνία με το $21,4\%$ κ.β. που αναγράφεται από τον κατασκευαστή. Στο νήμα ($0_{Bi} : 0_{Cu}$), η περιεκτικότητα σε πληρωτικό CB μετρήθηκε πειραματικά στα $25,2\%$ κ.β. (έναντι της τιμής $24,7\%$ κ.β. που υπολογίστηκε κατά την προετοιμασία, Πίνακας 11) και στο νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) το συνολικό άθροισμα της περιεκτικότητας σε πληρωτικό CB και της περιεκτικότητας σε ενσωματωμένα λειτουργικά υλικά μετρήθηκε στα $27,9\%$ κ.β. Η διαφορά των $2,7\%$ κ.β. μεταξύ των νημάτων ($0_{Bi} : 0_{Cu}$) και ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) οφείλεται στην παρουσία Bi_2O_3 και CuO (ονομαστική τιμή του αθροίσματος Bi_2O_3 και CuO: $2,4\%$ κ.β., Πίνακας 11).

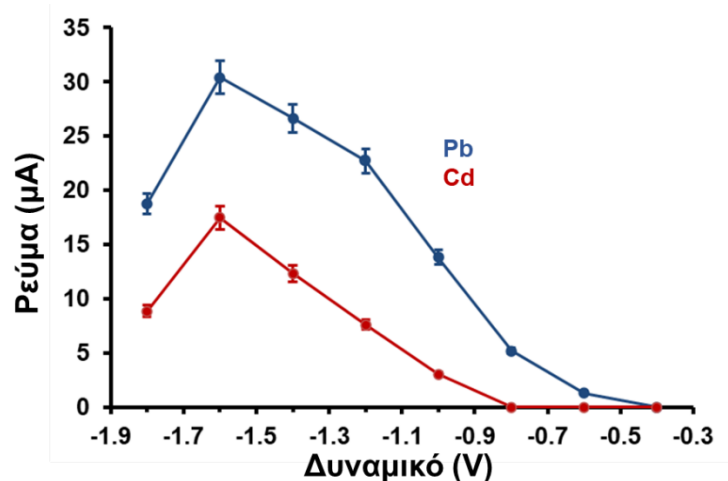


Σχήμα 116. Διαγράμματα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) για PLA, εμπορικό CB/PLA (ProtoPasta) και εργαστηριακό CB/PLA για νήματα ($0_{Bi} : 0_{Cu}$) και ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$).

11.6 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού Pb(II) και Cd(II)

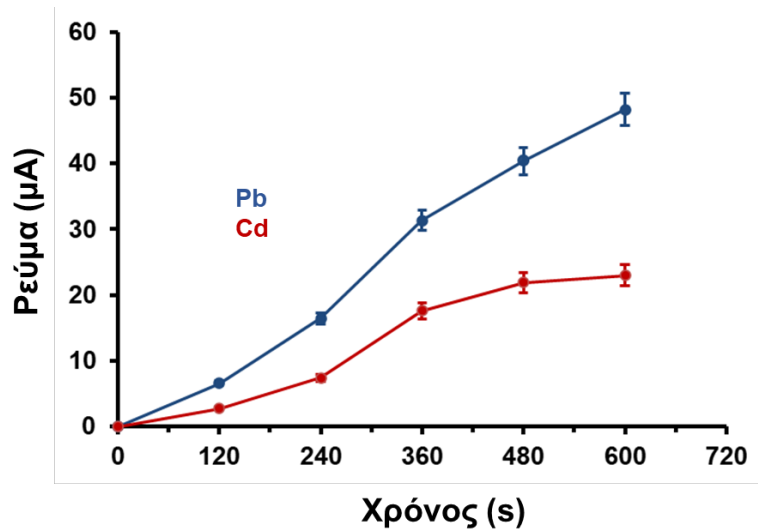
Ο προσδιορισμός του Pb(II) και του Cd(II) πραγματοποιήθηκε με ανοδική διαφορική παλμική βολταμετρία DPVA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,8). Εξετάστηκε η επίδραση του δυναμικού και του χρόνου προσυγκέντρωσης στα ύψη των κορυφών του Pb(II) και του Cd(II), καθώς οι μεταβλητές αυτές επηρέασαν τόσο τον σχηματισμό των μεταλλικών BiNPs και CuNPs όσο και την αποτελεσματικότητα εναπόθεσης του Pb(II) και του Cd(II) στην επιφάνεια του τρισδιάστατα εκτυπωμένου ηλεκτροδίου (Σχήματα 117, 118).

Οι αποκρίσεις τόσο του Pb όσο και του Cd ήταν χαμηλές σε πιο θετικά δυναμικά διότι σε αυτά τα δυναμικά, ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος αισθητήρας δεν ήταν επαρκώς καθοδικά πολωμένος ώστε να ξεκινήσει είτε η αναγωγή του Pb(II) και του Cd(II) στα αντίστοιχα μέταλλα είτε η αναγωγή του Bi_2O_3 και του CuO σε μεταλλικά NPs. Καθώς το δυναμικό γινόταν πιο αρνητικό, τα ύψη των κορυφών του Pb και του Cd αυξήθηκαν ραγδαία μέχρι τα $-1,6 \text{ V}$, οπότε η αναγωγή του Pb(II) και του Cd(II) ελέγχθηκε με τη μεταφορά μάζας και τα BiNPs και CuNPs σχηματίστηκαν αποτελεσματικά στην επιφάνεια του αισθητήρα. Οι αποκρίσεις του Pb και του Cd σε πιο αρνητικά δυναμικά μειώθηκαν, πιθανότατα λόγω της παραγωγής υδρογόνου, το οποίο παρενέβαινε στη διαδικασία εναπόθεσης. Τελικά επιλέχθηκε ως δυναμικό προσυγκέντρωσης τα $-1,6 \text{ V}$ (Σχήμα 117).



Σχήμα 117. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού προσυγκέντρωσης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στα ύψη των κορυφών του $Pb(II)$ και του $Cd(II)$ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH 4,8$) που περιείχε $40 \mu\text{g L}^{-1}$ $Pb(II)$ και $Cd(II)$. Χρόνος προσυγκέντρωσης: 360 s . Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

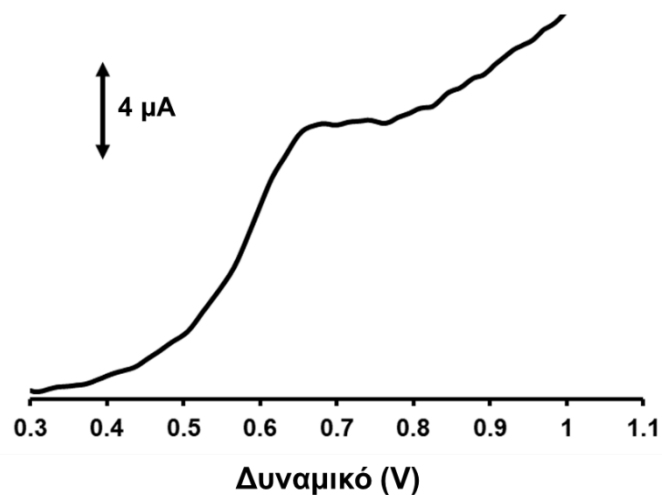
Η επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης δοκιμάστηκε στο εύρος $0-600 \text{ s}$ (Σχήμα 118). Το ύψος των κορυφών οξειδωσης Pb και Cd , κατά την αναδιάλυση, αυξήθηκε με την αύξηση της διάρκειας προσυγκέντρωσης και επιλέχθηκαν τα 360 s , ως ένας ικανοποιητικός συνδυασμός επαρκούς ευαισθησίας και σύντομου χρόνου ανάλυσης.



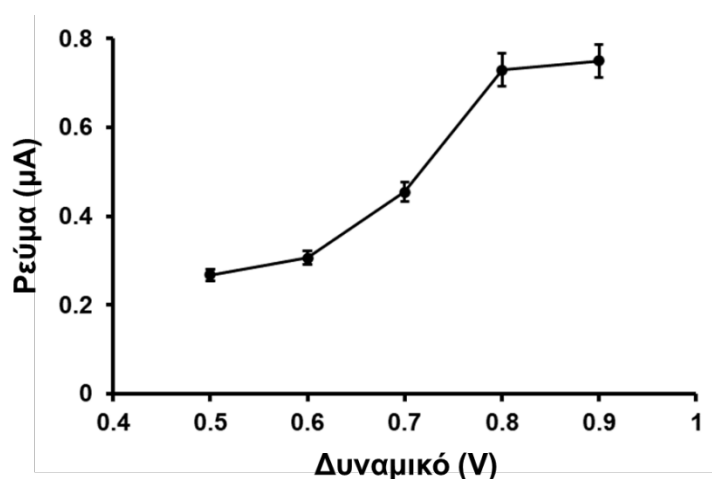
Σχήμα 118. Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στα ύψη των κορυφών του $Pb(II)$ και του $Cd(II)$ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH 4,8$) που περιείχε $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ $Pb(II)$ και $Cd(II)$. Δυναμικό προσυγκέντρωσης: $-1,6 \text{ V}$. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

11.7 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με αμπερομετρία σε ηλεκτρολύτη NaOH ($pH 13$). Μελετήθηκε η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην αμπερομετρική απόκριση της γλυκόζης και επιλέχθηκε το δυναμικό $+0,8 \text{ V}$, καθώς ήταν επαρκώς ανοδικό για την οξείδωση της γλυκόζης (Σχήματα 119, 120).



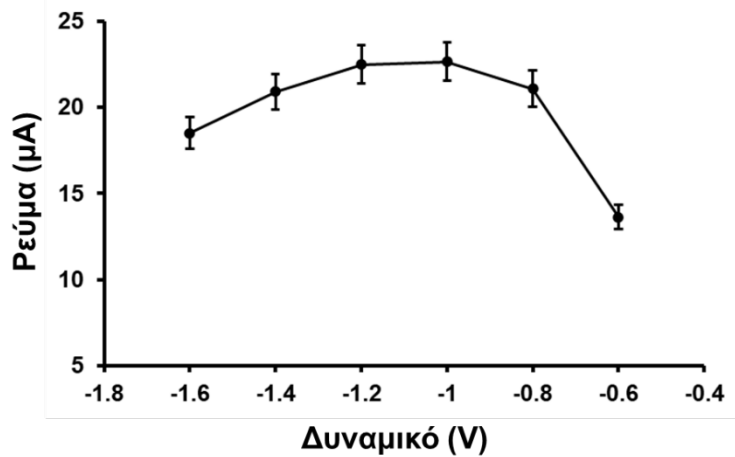
Σχήμα 119. Βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού που λήφθηκε στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) παρουσία 1 mmol L^{-1} γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH.



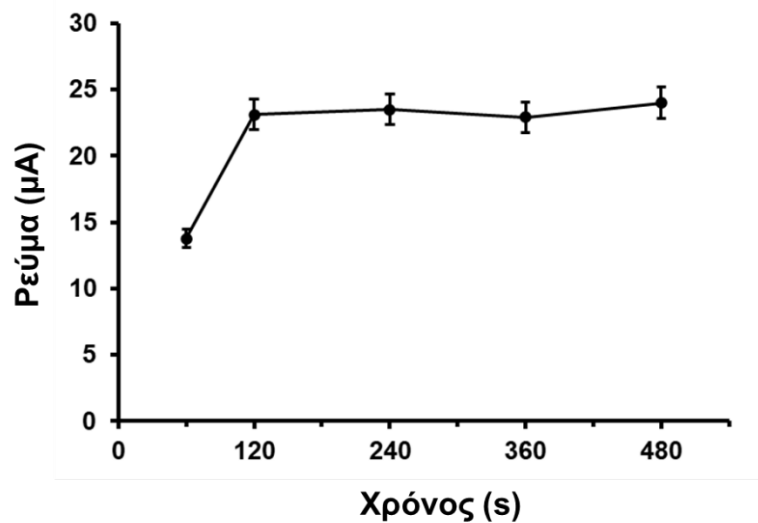
Σχήμα 120. Η επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην αμπερομετρική απόκριση έναντι 200 μmol L^{-1} γλυκόζης σε $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$).

11.8 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού ουρικού οξέος

Ο προσδιορισμός ουρικού οξέος πραγματοποιήθηκε με DPV σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7). Μελετήθηκε η επίδραση του δυναμικού και χρόνου εφαρμογής και οι επιλεγμένες τιμές ήταν $-1,0 \text{ V}$ για 120 s (Σχήματα 121, 122).



Σχήμα 121. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στο ύψος της κορυφής του ουρικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) που περιείχε 50 μmol L^{-1} ουρικού οξέος. Χρόνος εφαρμογής: 120 s. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

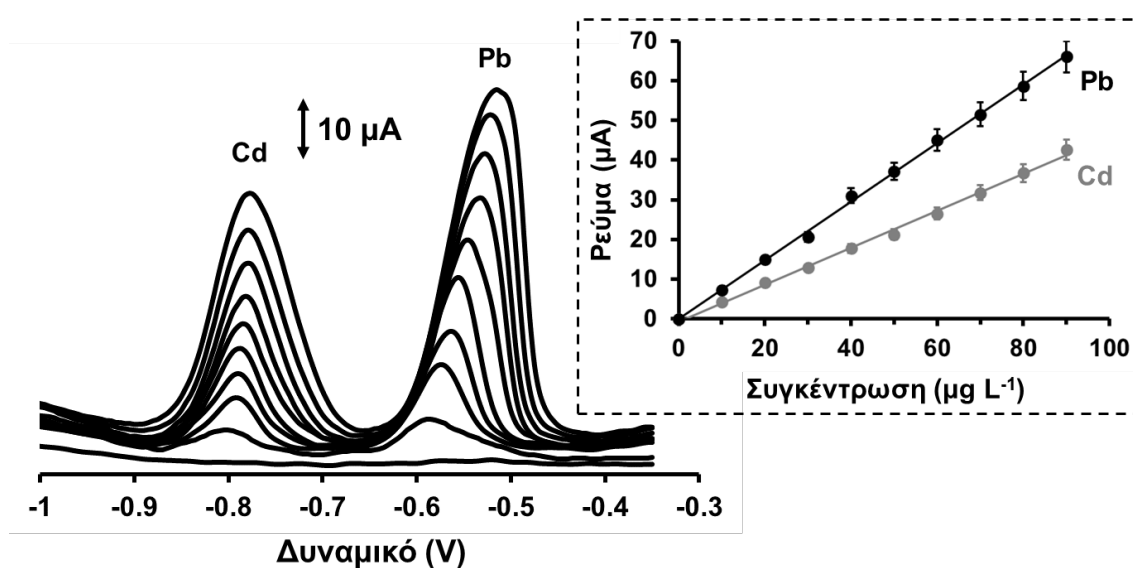


Σχήμα 122. Επίδραση του χρόνου εφαρμογής δυναμικού στο 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$), στο ύψος της κορυφής του ουρικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) που περιείχε 50 μmol L^{-1} ουρικού οξέος. Δυναμικό εφαρμογής: $-1,0 \text{ V}$. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

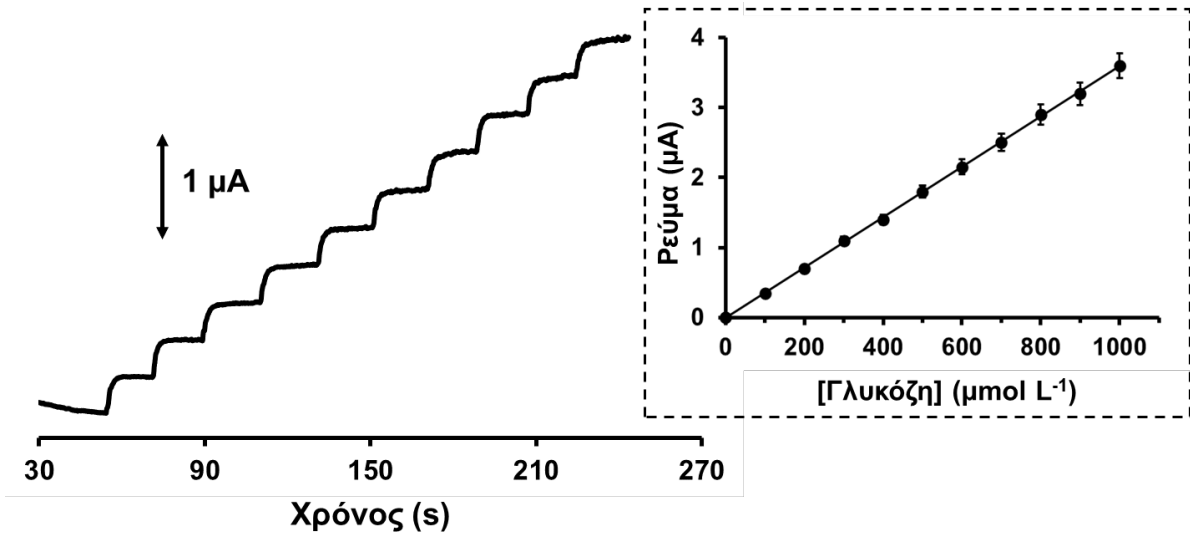
11.9 Καμπύλες αναφοράς

Η καμπύλη αναφοράς για Pb(II) και Cd(II), λήφθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων 0–90 $\mu\text{g L}^{-1}$ (με βήματα ανά 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) και για τα δύο μεταλλικά κατιόντα. Το διάγραμμα και τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 123. Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) ήταν 0,998 για το Pb(II) και 0,997 για το Cd(II). Τα LODs που υπολογίστηκαν από την εξίσωση $\text{LOD} = 3\text{SD}/\alpha$, βρέθηκαν 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τον Pb(II) και 0,68 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το Cd(II), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες με τυπικά ηλεκτρόδια με βάση το βισμούθιο^[332-334].

Όσον αφορά στη γλυκόζη, ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος αισθητήρας έδωσε αμπερομετρικές αποκρίσεις που αυξάνονταν γραμμικά καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της γλυκόζης (Σχήμα 124), με R^2 : 0,999 και LOD: 10,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (δηλαδή 0,182 mg dL^{-1}). Αυτό το LOD ήταν σε παρόμοιο επίπεδο συγκέντρωσης με άλλους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες με βάση τον χαλκό και πολύ χαμηλότερο από τα φυσιολογικά επίπεδα στο αίμα, επιτρέποντας την εκτεταμένη αραίωση των κλινικών δειγμάτων για την ελαχιστοποίηση των μητρικών επιδράσεων^[328,335,336].

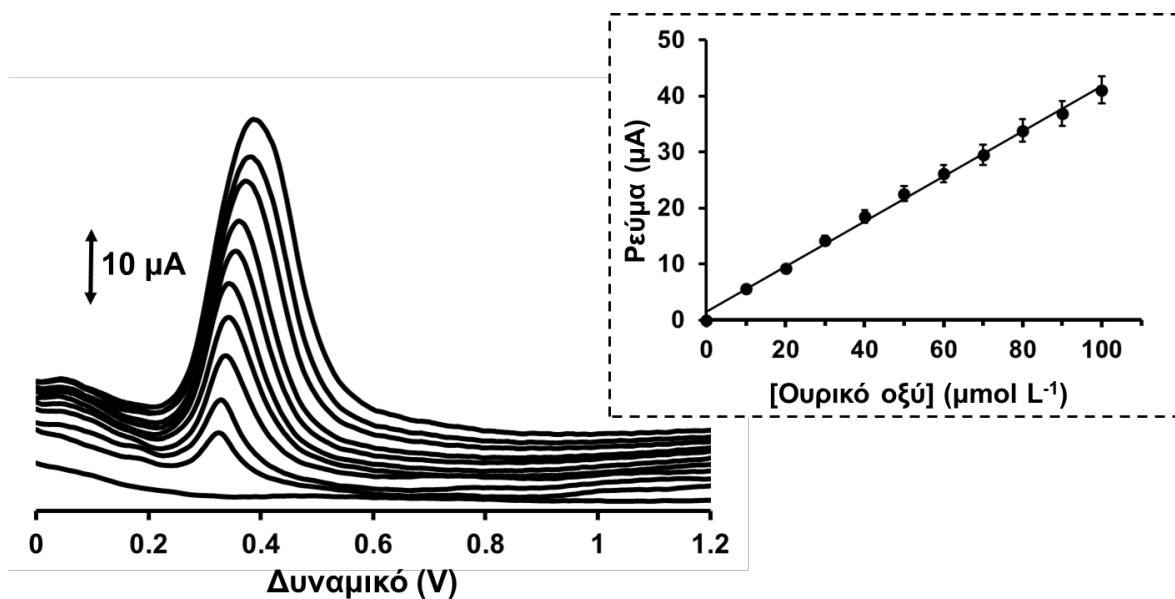


Σχήμα 123. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού που λήφθηκαν σε ένα 3D εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο από νήμα ($7,5_{\text{Bi}} : 2,5_{\text{Cu}}$) σε εύρος συγκεντρώσεων Pb(II) και Cd(II): 0–90 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ανά 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ από κάτω προς τα πάνω). Οι καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στο ένθετο. Κάθε σημείο στις καμπύλες αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm \text{SD}$ ($n = 3$).



Σχήμα 124. Αμπερομετρικές αποκρίσεις του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου από νήμα ($7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}$) σε δέκα διαδοχικές προσθήκες $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ γλυκόζης και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης $\pm SD$ ($n = 3$).

Το Σχήμα 125 απεικονίζει τα βολταμμογραφήματα και την αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων από 0 έως $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (βήμα ανά $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική με $R^2: 0,996$ και $LOD: 1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, το οποίο ήταν συγκρίσιμο με άλλα ηλεκτρόδια με βάση τον άνθρακα^[329-331].



Σχήμα 125. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του 3D εκτυπωμένου ηλεκτροδίου από νήμα (7,5_{Bi} : 2,5_{Cu}) για εύρος συγκέντρωσης ουρικού οξέος 0–100 μmol L⁻¹ (ανά 10 μg L⁻¹ από κάτω προς τα πάνω). Η καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται στο ένθετο. Κάθε σημείο στην καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τυπικής απόκλισης ± SD (n = 3).

11.10 Αναπαραγωγιμότητα

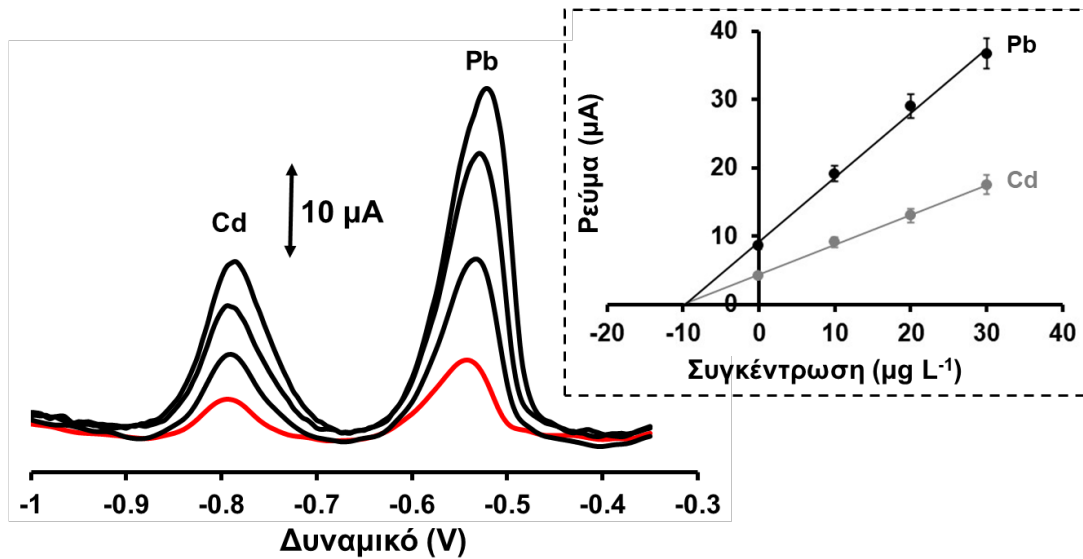
Για τον προσδιορισμό Pb(II) και Cd(II), η αναπαραγωγιμότητα της ηλεκτροχημικής μεθόδου μελετήθηκε, εξετάζοντας οκτώ επαναληπτικές αποκρίσεις ενός αισθητήρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,8), που περιείχε 40 μg L⁻¹ Pb(II) και Cd(II) και η %RSD ήταν 3,7 % για τον Pb(II) και 4,6 % για το Cd(II). Επιπλέον, εξετάστηκαν οι βολταμμετρικές αποκρίσεις σε πέντε διαφορετικούς αισθητήρες, έναντι 40 μg L⁻¹ Pb(II) και Cd(II) σε 0,1 mol L⁻¹ ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (pH 4,8), και η τιμή της % RSD βρέθηκε 7,4 % για τον Pb(II) και 8,6 % για το Cd(II). Για τη γλυκόζη, η % RSD ενός αισθητήρα ήταν 3,1 % (n = 8) και η % RSD μεταξύ των αισθητήρων ήταν 5,2 % (n = 5) (και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 400 μmol L⁻¹ σε NaOH 0,1 mol L⁻¹). Όσον αφορά στο ουρικό οξύ, η % RSD ενός αισθητήρα ήταν 2,8 % (n = 8) και η % RSD μεταξύ των αισθητήρων ήταν 4,9 % (n = 5) (και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση του ουρικού οξέος ήταν 40 μmol L⁻¹ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 mol L⁻¹ με pH 7).

10.11 Εφαρμογή σε δείγματα

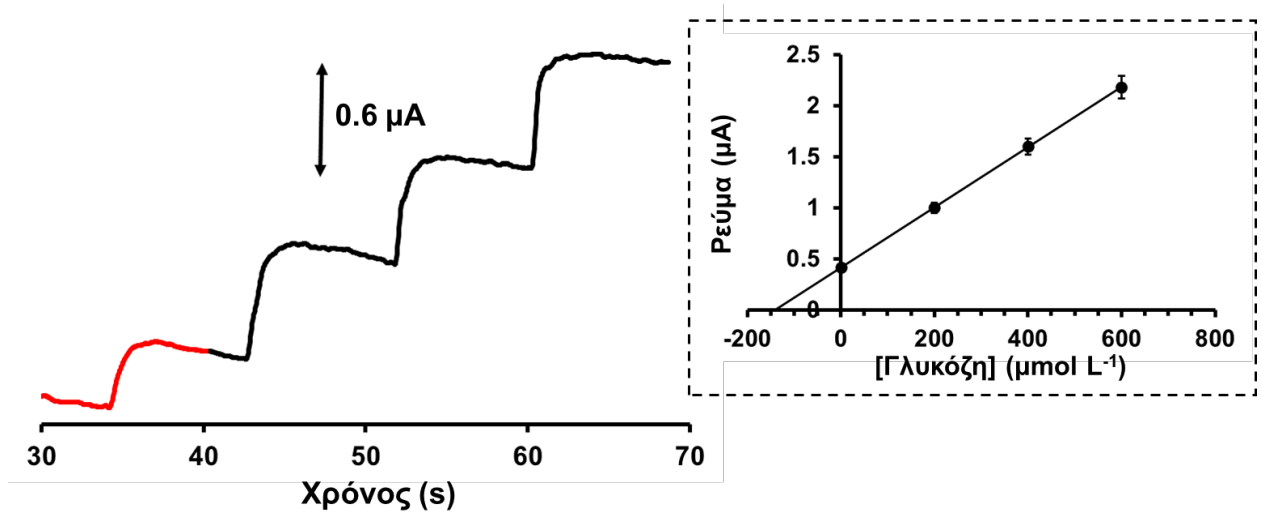
Ο τρισδιάστατα εκτυπωμένος αισθητήρας από νήμα ($7,5_{\text{Bi}} : 2,5_{\text{Cu}}$), εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του Pb(II) και του Cd(II) σε δείγμα εμφιαλωμένου νερού. Η ακρίβεια της μεθόδου εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της ανάκτησης μετά την επιμόλυνση του δείγματος με Pb(II) και Cd(II) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης. Τα βολταμμογραφήματα του επιμολυσμένου δείγματος, και το διάγραμμα σταθερής προσθήκης παρουσιάζονται στο Σχήμα 126. Η μέση ανάκτηση ήταν 98 % για τον Pb και 101 % για το Cd, υποδεικνύοντας ικανοποιητική ακρίβεια.

Επιπλέον, εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού περιεκτικότητας σε γλυκόζη 90 mg/dL = 5 mmol L⁻¹ αναλύθηκε με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης και η μέση τιμή ανάκτησης υπολογίστηκε 96 % (Σχήμα 127). Για το σκοπό αυτό 300μL από το δείγμα μεταφέρθηκαν στην κυψελίδα που περιείχε 9,7 mL NaOH 0.1 mol L⁻¹ και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 200 μmol L⁻¹ γλυκόζης.

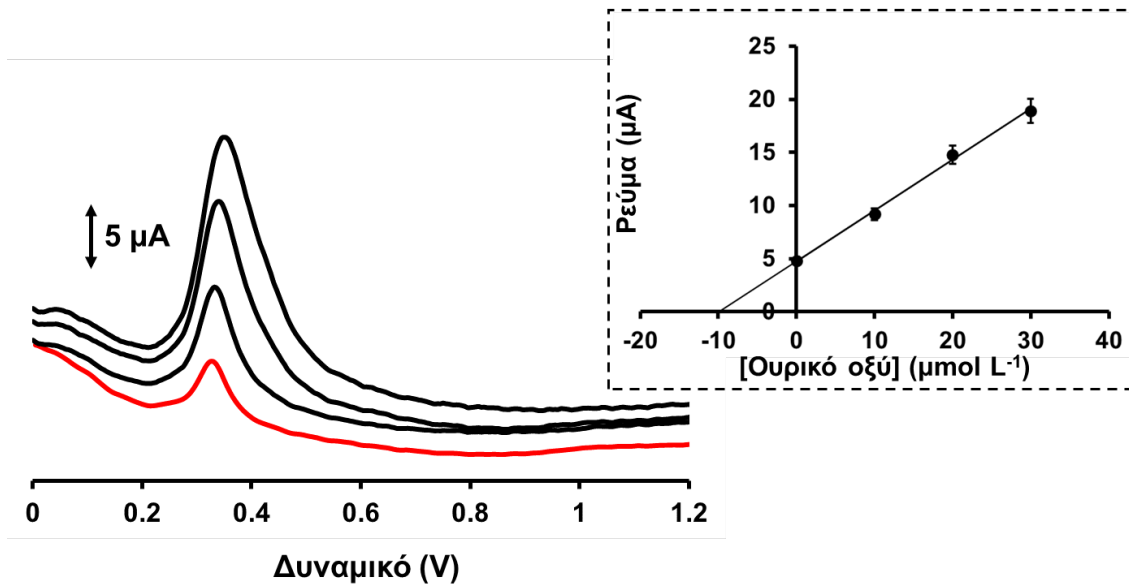
Τέλος, ο αισθητήρας εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ουρικού οξέος σε εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού. Το δείγμα ήταν ελεύθερο ουρικού οξέος και επιμολύνθηκε με 0,2 mmol L⁻¹ ουρικού οξέος. Η ανάκτηση υπολογίστηκε με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης και η μέση τιμή ανάκτησης ήταν 99 % (Σχήμα 128). Σε αυτή την περίπτωση 500μL από το επιμολυσμένο δείγμα μεταφέρθηκαν στην κυψελίδα που περιείχε 9,5 mL ηλεκτρολύτη και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές προσθήκες 100 μmol L⁻¹ ουρικού οξέος.



Σχήμα 126. Βολταμμογραφήματα αναδιαλυτικής βολταμμετρίας διαφορικού παλμού και καμπύλη σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό του Pb και του Cd σε επιμολυσμένο δείγμα εμφιαλωμένου νερού. Δείγμα επιμολυσμένο με Pb(II), Cd(II) (κόκκινη γραμμή) και τρεις σταθερές προσθήκες 10 µg L⁻¹ Pb(II), Cd(II) (μαύρες γραμμές).



Σχήμα 127. Αμπερομετρικές αποκρίσεις και καμπύλη σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό γλυκόζης σε εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού. Δείγμα (κόκκινη γραμμή) και τρεις διαδοχικές προσθήκες 200 µmol L⁻¹ γλυκόζης (μαύρη γραμμή).



Σχήμα 128. Βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού και διάγραμμα σταθερής προσθήκης (ένθετο) για τον προσδιορισμό ουρικού οξέος σε επιμολυσμένο εμπορικό δείγμα ανθρώπινου ορού. Δείγμα (κόκκινη γραμμή) και τρεις σταθερές προσθήκες $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ουρικού οξέος (μαύρες γραμμές).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή πραγματεύεται την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών (βιο)αισθητήρων, κατασκευασμένων εξ ολοκλήρου με τρισδιάστατη εκτύπωση. Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι προσδιορισμού διαφόρων βιοδεικτών (π.χ. χολίνη, χοληστερόλη, γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, ουρικό οξύ), που αναπτύχθηκαν, παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, σύντομους χρόνους ανάλυσης και αποτελούν εναλλακτική λύση για αναλύσεις τόσο στο πεδίο ανάγκης (on-site) όσο και στα σημεία φροντίδας των ασθενών (points-of-care – POC).

Αρχικά, κατασκευάστηκαν 3D εκτυπωμένοι ενζυμικοί βιοαισθητήρες και αναπτύχθηκαν ηλεκτροχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό βιοδεικτών (γλυκόζης, αιθανόλης, γαλακτικού οξέος) καθώς και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουρικού οξέος και καφεΐνης σε ιδρώτα. Αυτοί οι βιοδείκτες σχετίζονται με τη σωματική άσκηση, την κατανάλωση τροφής και επηρεάζουν τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης, οπότε ο ποσοτικός τους έλεγχος με αναίμακτες διαδικασίες θεωρείται πολύ σημαντικός, ειδικά σε ηλικιωμένα άτομα, σε υπέρβαρα άτομα, σε καρδιοπαθείς, διαβητικούς κ.λπ. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία στον προσδιορισμό γλυκόζης, το 3D ηλεκτρόδιο εργασίας μορφοποιήθηκε με διαμεσολαβητή Πρωσσικό Μπλε, ενώ για να αυξηθεί η ευαισθησία των βολταμμετρικών αποκρίσεων στο ουρικό οξύ και στην καφεΐνη, προηγήθηκε στάδιο ηλεκτροχημικής ενεργοποίησης του ηλεκτροδίου. Ο σχεδιασμός των παραπάνω πέντε (βιο)αισθητήρων αποσκοπεί στην μελλοντική ενσωμάτωσή τους σε ένα ενιαίο 3D εκτυπωμένο περικάρπιο έξυπνων ρολογιών (smart watches).

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν 3D εκτυπωμένες βιοδιατάξεις 4-ηλεκτροδίων για ταυτόχρονους προσδιορισμούς 2 αναλυτών. Μια μικρή POC-συσσκευή, εφαρμόστηκε στον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο καρδιακών βιοδεικτών (της χοληστερόλης και της χολίνης) στην ίδια σταγόνα αίματος. Η συγκεκριμένη βιοδιάταξη ανοίγει ένα νέο κεφάλαιο στην ηλεκτροχημική βιοανίχνευση πολλαπλών αναλυτών σε συνθήκες POC, καθώς ξεπερνά σημαντικές προκλήσεις κατασκευής, λειτουργίας και ανίχνευσης. Ειδικότερα, η βιοδιάταξη: α) μπορεί να εκτυπωθεί εύκολα σε κλινικό περιβάλλον, προσφέροντας εξειδικευμένες και χαμηλού κόστους συσκευές τη στιγμή της ανάγκης, β) επιτυγχάνει ευαίσθητες βιοδοκιμές χρησιμοποιώντας απλές εργασιακές διαδικασίες και σύντομες αναλύσεις και γ) είναι απαλλαγμένη από φαινόμενα παρεμβολής και διασταυρούμενης δραστηριότητας.

Ακόμη, αναπτύχθηκε μία τρισδιάστατα εκτυπωμένη βιοδιάταξη 4-ηλεκτροδίων για ταυτόχρονες μετρήσεις δύο δεικτών ποιότητας οίνου, όπως της γλυκόζης και της αιθανόλης. Η εφαρμογή της βιοσυσκευής αυτής σε δείγματα οίνων αποδείχθηκε απλή στο χειρισμό και τη λειτουργία και επιπλέον, πρόσφερε ευαισθησία και εκλεκτικότητα στις μετρήσεις. Τέλος, η όλη κατασκευαστική διαδικασία, καθώς και η ανάπτυξη των βιοδοκιμών ήταν απλές και οικονομικές, επιτρέποντας τη χρήση της στο πεδίο ανάγκης.

Επίσης, αναπτύχθηκαν νέου τύπου τρισδιάστατα εκτυπωμένοι αισθητήρες που χρησιμοποιούν συνθετικά βιομιμητικά υλικά για τον μη-ενζυματικό προσδιορισμό γλυκόζης σε ιδρώτα. Δοκιμάστηκαν δύο βιομιμητικά υλικά του σιδήρου, το υδρόφοβο σύμπλοκο $\text{Fe}_3\text{O}(\text{PhCO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3 \cdot \text{PhCO}_2$ καθώς και μία μεταλλο-οργανική κατασκευή $\text{Fe}(\text{II})\text{-MOF}$. Τα σταθερά και υδρόφοβα αυτά υλικά λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις του $\text{Fe}(\text{III})$, που ηλεκτροκαταλύει την οξειδωση της γλυκόζης. Τα υλικά αυτά επιστρώνονται και ακινητοποιούνται στην επιφάνεια των 3D εκτυπωμένων ηλεκτροδίων και με εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού μετατρέπονται ηλεκτροχημικά σε $\text{Fe}(\text{III})$, ηλεκτροκαταλύοντας έτσι την οξειδωση της γλυκόζης σε όξινο περιβάλλον, που είναι και το περιβάλλον του ιδρώτα. Οι 3D εκτυπωμένοι αισθητήρες επέδειξαν έντονη ηλεκτροαναλυτική δράση στον εκλεκτικό προσδιορισμό της γλυκόζης με βολταμμετρία διαφορικού παλμού, προσφέροντας ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα και πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την τεχνολογία τρισδιάστατης εκτύπωσης, καθιστούν τους αισθητήρες αυτούς ως καινοτόμες προσθήκες στον τομέα των μη-ενζυμικών βιοαισθητήρων για μη επεμβατικές βιοεφαρμογές.

Τέλος, παρασκευάστηκε ένα βιοδιασπώμενο αγώγιμο νήμα PLA με ενσωματωμένα τα οξειδία Bi_2O_3 και CuO , που χρησιμοποιήθηκε για την τρισδιάστατη εκτύπωση πολυλειτουργικών αισθητήρων. Χάρη στην προσεκτική επιλογή και βελτιστοποίηση της σύστασης των δύο ενσωματωμένων λειτουργικών υλικών, κατέστη εφικτή η παρακολούθηση πολλών αναλυτών με διαφορετικές οξειδοαναγωγικές ιδιότητες. Το Bi_2O_3 μετασχηματίζεται *in situ* σε BiNPs , επιτρέποντας τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του $\text{Pb}(\text{II})$ και του $\text{Cd}(\text{II})$ μέσω ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Το CuO ηλεκτροκαταλύει την οξειδωση της γλυκόζης, επιτρέποντας τη μη-ενζυματική αμπερομετρική ανίχνευσή της με εξαιρετική ευαισθησία. Ακόμη, ο αισθητήρας ανίχνευσε άμεσα ουρικό οξύ μέσω

βολταμμετρίας διαφορικού παλμού με χαμηλότατο όριο ανίχνευσης. Τα όρια ανίχνευσης όλων των ουσιών ήταν συγκρίσιμα με εκείνα άλλων ηλεκτροδίων, που είχαν βελτιστοποιηθεί μόνο για τις συγκεκριμένες εφαρμογές. Οι 3D εκτυπωμένοι αισθητήρες από αυτό το πολυμερικό αγώγιμο νήμα Bi/Cu/CB/PLA χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση δειγμάτων (νερό, αίμα) με ικανοποιητικές ανακτήσεις, που κυμάνθηκαν από 96 έως 103 %. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά δείχνουν ότι το νέο πολυλειτουργικό νήμα αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο τρισδιάστατα εκτυπώσιμο ηλεκτροχημικό νανοϋλικό και αποτελεί μία σημαντική πρόοδο προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης χαμηλού κόστους, βιώσιμων και πολυπλεξικών αισθητήρων που εκτυπώνονται στα σημεία ανάγκης, τη στιγμή της ανάγκης.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι (βιο)αισθητήρες που αναπτύχθηκαν στη διάρκεια της πειραματικής πορείας της παρούσας διδακτορικής έρευνας, αξιοποιούν επαρκώς τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Επίσης, η διαδικασία σχεδιασμού τους αποδείχθηκε απλή, ενώ η κατασκευή τους είναι γρήγορη, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα για την κατασκευή αισθητήρων. Οι μεθοδολογίες ηλεκτροχημικής ανάλυσης που αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν και εφαρμόστηκαν σε βιολογικά δείγματα, έδωσαν εξαιρετικά αναλυτικά χαρακτηριστικά, που περιλαμβάνουν τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης, την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα και την αναπαραγωγιμότητα, ενώ οι μετρήσεις ήταν σύντομες και ακριβείς. Τέλος, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός δύο ή περισσότερων αναλυτών, σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος των (βιο)διατάξεων, δύναται να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο, που θα επιτρέψει την πραγματοποίηση φορητών και πολυπλεξικών απλών αναλύσεων σε πραγματικό χρόνο, ακόμη και στο σπίτι, λειτουργώντας ως μέτρο πρόληψης μίας πληθώρας ασθενειών, καθώς και στον ποιοτικό έλεγχο τροφίμων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Acrylonitrile Butadiene Styrene, ABS	Συμπολυμερές ακρυλονιτριλίου βουταδιενίου στυρενίου
Additive manufacturing	Προσθετική κατασκευή
Adsorptive Stripping Voltammetry, ADSV	Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία
Anodic Stripping Voltammetry, ASV	Ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία
Binder jetting	Ψεκασμός συνδετικού υλικού
Bulk	Φέρων ηλεκτρολύτης
Carbon nanomaterials, CNMs	Νανοϋλικά άνθρακα
Carbon Paste Electrode, CPE	Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα
Cathodic Stripping Voltammetry, CSV	Καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία
Computer – Aided Design, CAD	Λογισμικό σχεδίασης
Counter electrode	Βοηθητικό ηλεκτρόδιο
Cyclic Voltammetry, CV	Κυκλική βολταμμετρία
Depletion layer	Κορεσμένη στιβάδα
Differential Pulse Voltammetry, DPV	Διαφορική παλμική βολταμμετρία
Dropping Mercury Electrode, DME	Ηλεκτρόδιο κρεμαστής σταγόνας υδραργύρου
Electric double layer	Ηλεκτρική διπλοστιβάδα
Electron Beam Melting, EBM	Τήξη με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων
Filament	Νήμα
Forward scan	Κανονική σάρωση
Fused Deposition Modeling, FDM	Μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης
Glassy Carbon, GC	Υαλώδης άνθρακας
Junction Potential	Δυναμικό συνδέσμου
Laminated Object Manufacturing, LOM	Συγκόλληση επαλλήλων φύλλων
Linear Sweep Voltammetry, LSV	Βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης
Liquid junctions	Υγροί σύνδεσμοι
Material jetting	Ψεκασμός υλικού
Mediator	Διαμεσολαβητής
Metal-Organic Frameworks, MOFs	Μεταλλο-οργανικές κατασκευές

Microfluidic systems	Συστήματα μικρορρευστονικής
Model material	Κύριο υλικό
Nernst layer	Στιβάδα Nernst
Normal Pulse Voltammetry, NPV	Βολταμμετρία κανονικού παλμού
Ohmic Potential	Ωμικό δυναμικό
Overvoltage	Υπέρταση
Overpotential	Υπερδυναμικό
Polyamide, PA	Πολυαμίδια
Polycarbonates, PC	Πολυκαρβονικά υλικά
Polyethylene Terephthalate Glycol	Συμπολυμερές πολυ(τερεφθαλικού εστέρα αιθυλενογλυκόλης)
Polylactic acid, PLA	Πολυγαλακτικό οξύ
Prussian Blue	Πρωσσικό Μπλε
Reference electrode, RE	Ηλεκτρόδιο αναφοράς
Reverse scan	Αντίστροφη σάρωση
Rise time	Χρόνος αύξησης
Salt bridge	Γέφυρα άλατος
Saturated Calomel Electrode, SCE	Κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος
Selective Laser Melting, SLM	Επιλεκτική σύντηξη λέιζερ
Selective Laser Sintering, SLS	Επιλεκτική συσσωμάτωση λέιζερ
Silver-silver chloride electrode	Ηλεκτρόδιο αργύρου-χλωριούχου αργύρου
Stereolithography, SLA	Στερεολιθογραφία
Spectrochemical cell	Φασματοηλεκτροχημικές κυψελίδες
Square Wave Voltammetry, SWV	Βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού
Stripping Voltammetry	Αναδιαλυτική βολταμμετρία
Support material	Υποστηρικτικό υλικό
Working electrode, WE	Ηλεκτρόδιο εργασίας

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AA	Ascorbic Acid
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene
AdSV	Adsorptive Stripping Voltammetry
AMP	Amperometry
AOx	Alcohol Oxidase Enzyme
ASV	Anodic Stripping Voltammetry
BiNPs	Bismuth Nanoparticles
CAD	Computer - Aided Design
CAF	Caffeine
CB	Carbon Black
CDs	Carbon Dots
CE	Counter Electrode
ChlOx	Cholesterol Oxidase Enzyme
ChOx	Choline Oxidase Enzyme
CNFs	Carbon Nanofibers
CNTs	Carbon Nanotubes
CPE	Carbon Paste Electrode
CSV	Cathodic Stripping Voltammetry
CuNPs	Copper Nanoparticles
CV	Cyclic Voltammetry
DCM	Dichloromethane
DIW	Direct Ink Writing
DME	Dimethylether
DP	Differential Pulse
DPV	Differential Pulse Voltammetry
DPASV	Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry
EBM	Electron Beam Melting
EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
FAD	Flavine Adenine Dinucleotide
FDM	Fused Deposition Modeling
GLU	Glucose
GO	Graphene Oxide
GOx	Glucose Oxidase Enzyme

HRP	Horseradish Peroxidase
Gr	Graphene
IHP	Inner Helmholtz Plane
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Lactic Acid
LOD	Limit of Detection
LOM	Laminated Object Manufacturing
LOx	L-Lactate Oxidase Enzyme
LSV	Linear Sweep Voltammetry
MOF	Metal-Organic Framework
NAD	Nicotinamide Adenine Nucleotide
NPV	Normal Pulse Voltammetry
NPs	Nanoparticles
OHP	Outer Helmholtz Plane
PAR	Paracetamol
PB	Phosphate Buffer
PEG	Polyethylene Glycol
PLA	Polylactic Acid
POC	Point Of Care
PVA	Polyvinyl Alcohol
RSD	Relative Standard Deviation
RE	Reference Electrode
SCE	Saturated Calomel Electrode
SD	Standard Deviation
SEM	Scanning Electron Microscopy
SLM	Selective Laser Melting
SLS	Selective Laser Sintering
STL	Standard Triangle Language
SWV	Square Wave Voltammetry
TGA	Thermogravimetric Analysis
U	Urea
UA	Uric Acid
WE	Working Electrode

Δημοσιεύσεις στα πλαίσια της παρούσας διατριβής

1. “3D printed enzymatic microchip for multiplexed electrochemical biosensing”, **Eleni Koukouviti**, Christos Kokkinos, *Analytica Chimica Acta*, 1186, 339114, **2021**, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339114>.
2. “3D Printed Voltammetric Sensor Modified with an Fe(III)-Cluster for the Enzyme-Free Determination of Glucose in Sweat”, **Eleni Koukouviti**, Alexios K. Plessas, Anastasios Economou, Nikolaos Thomaidis, Giannis S. Papaefstathiou, Christos Kokkinos, *Biosensors*, 12, 1156, **2022**, <https://doi.org/10.3390/bios12121156>.
3. “3D-printed electrochemical glucose device with integrated Fe(II)-MOF nanozyme”, **Eleni Koukouviti**, Alexios K. Plessas, Varvara Pagkali, Anastasios Economou, Giannis S. Papaefstathiou, Christos Kokkinos, *Microchimica Acta*, 190, 274, **2023**, <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05860-6>.
4. “Wooden Tongue Depressor Multiplex Saliva Biosensor Fabricated via Diode Laser Engraving”, **Eleni Koukouviti**, Dionysios Soulis, Anastasios Economou, Christos Kokkinos, *Analytical Chemistry*, 95, 6765–6768, **2023**, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01211>.
5. “3D Printable Multifunctional Electrochemical Nano-Doped Biofilament”, **Eleni Koukouviti**, Anastasios Economou, Christos Kokkinos, *Advanced Functional Materials*, 2402094, **2024**, <https://doi.org/10.1002/adfm.202402094>.

Ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια

1. “*3D Printed Voltammetric Sensor Modified with an Fe(III) Cluster for Nonenzymatic Determination of Glucose in Sweat*”, **Eleni Koukouviti**, Foteini Vasileiou, Alexios K. Plessas, Anastasios Economou, Nikolaos Thomaidis, Giannis S. Papaefstathiou, Christos Kokkinos, 12th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA 2021), September 20-23, Greece, **2021**.
2. “*3D-Printed Electrochemical Device modified with Fe(II)-MOF for Glucose Monitoring in Sweat*”, **Eleni Koukouviti**, Alexios K. Plessas, Anastasios Economou, Nikolaos Thomaidis, Giannis S. Papaefstathiou, Christos Kokkinos, 18th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2022), June 5-9, Vilnius, Lithuania, **2022**.
3. “*All-3D Printed Enzymatic Microchip for the Simultaneous Determination of Cholesterol and Choline in Blood*”, **Eleni Koukouviti**, Christos Kokkinos, Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC 2022), June 26-July 1, Athens, Greece, **2022**.
4. “*3D Printed 4-Electrode Biodevice for the Simultaneous Determination of Glucose and Ethanol in Wines*”, **Eleni Koukouviti**, Christos Kokkinos, 2nd Symposium of Postgraduate Students: Chemistry and its Applications, June 8-9, Athens, Greece, **2023**.
5. “*3D Printable Conductive Filaments for Electrochemical Sensing*”, Leonidas Papagiannakopoulos, **Eleni Koukouviti**, Vasiliki Polyzopoulou, Maria Kartsakli, Maria Marakomichelaki, Eleni Sorkou, Anastasios Economou, Christos Kokkinos, 23rd Panhellenic Chemistry Conference, September 25-28, Athens, Greece, **2024**.
6. “*Electrochemical sensors 3D printed from nano-doped filaments*”, Leonidas Papagiannakopoulos, **Eleni Koukouviti**, Vasiliki Polyzopoulou, Eleni Sorkoy, Maria Kartsakli, Maria Marakomichelaki, Anastasios Economou, Christos Kokkinos, 11th International Conference on Micro-Nanoelectronics, Micro-Nanosciences & Nanotechnologies (Micro Nano 2024), October 11-13, Myrina Lemnos, Greece, **2024**.

7. “*Lab-made conductive filament for the 3D printing of ready-to-use multiplexed electrochemical sensors*”, **Eleni Koukouviti**, Anastasios Economou, Christos Kokkinos, Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC 2024), November 6-8, Athens, Greece, **2024**.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] A. Liu, K. Wang, S. Weng, Y. Lei, L. Lin, W. Chen, X. Lin, Y. Chen, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, 37, 101–111.
- [2] Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C., *Fan, Biosens. Bioelectron.* **2013**, 47, 1–11.
- [3] C.I.L. Justino, A.C. Freitas, R. Pereira, A.C. Duarte, T.A.P. Roshia-Santos, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, 68, 2–17.
- [4] M.A. Arugula, A. Simonian, *Meas. Sci. Technol.* **2014**, 25, 032001.
- [5] <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/immunoassay-market-436.html> (Επίσκεψη στις 13/10/23).
- [6] C. Kokkinos, A. Economou, M.I. Prodromidis, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 79, 88–105.
- [7] C. Kokkinos, A. Economou, *Anal. Chim. Acta* **2017**, 961, 12–32.
- [8] E. Valera, A.H. Albors, M.P. Marco, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 79, 9–22.
- [9] L. Wu, E. Xiong, X. Zhang, X. Zhang, J. Chen, *Nano Today* **2014**, 9, 197–211.
- [10] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd edition, *Wiley-VCH* **2000**.
- [11] Ι.Α. Μουμτζής, Δ.Π. Σαζού, Ηλεκτροχημεία, Γ', *ZHTH*, **1997**.
- [12] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, *Εκδόσεις Κωσταράκη*, **2010**.
- [13] Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Μ.Α. Κουππάρη, Ενόργανη Ανάλυση, *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών*, **2014**.
- [14] J.T. Maloy, *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 285.
- [15] W. Gibbs, *Z. Anal. Chem.* **1864**, 3, 327 – 336.
- [16] W. Gibbs, 2nd Series, *Amer. J. Set. Arts* **1865**, 89, 58–65.
- [17] M. Faraday, "Faraday." A History of Chemistry. *Palgrave*, London, **1964**, 99–141.
- [18] M. Heyrovsky, L. Novotny, I. Smaller, *Electrochemistry, Past and Present* (Eds. J. T. Stock, M.V. Orna)", *ACS Symposium Series*, No. 390, *American Chemical Society*, Washington **1989**, 370–379.
- [19] J.E.B. Randles, *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44, 327.
- [20] M. Cremer, *Z. Biol.* **1906**, 47, 562–608.
- [21] F. Haber, Z. Klemensiewicz, *Z. Phys. Chem.* **1909**, 67, 385.
- [22] L. Gorton, *Electroanalysis* **1995**, 7 (1), 23.
- [23] K.H. Lubert, K. Kalcher, *Electroanalysis* **2010**, 22 (17-18), 1937–1946.
- [24] Γ.Ι. Κοκκινίδης, Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων, *Γιαχούδη- Γιαπούλη*, **1992**.
- [25] <https://www.quora.com/What-is-the-function-of-a-salt-bridge-and-how-are-they-built> (Επίσκεψη στις 16/11/2023).
- [26] Μ. Προδρομίδης, Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες, *Εκδόσεις Κωσταράκη*, **2012**.
- [27] A. Amine, H. Mohammadi, *Amperometry. Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* **2018**.
- [28] Κ.Η. Ευσταθίου. Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Ενόργανες Τεχνικές Αναλύσεως Α', *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών*, **1998**.
- [29] C. Hui, C. Kan, C. Mak, K. Chau, *Process.* **2019**, 7, 922, 16.
- [30] K. Peeters, K. De Wael, Thesis, **2006-2007**, 26.
- [31] Ι.Α. Στράτης, Δ.Γ. Θεμελής, Γ.Α. Ζαχαριάδης, Α.Ν. Ανθεμίδης, Α.Σ. Οικονόμου, Ενόργανη Χημική Ανάλυση ΙΙ, *ZHTH*, **2004**, 453.

- [32] P. Vanýsek, *Chemical Analysis: Modern Techniques in Electroanalysis*, Vol. 139, *John Wiley and Sons Inc.* New York, **1996**.
- [33] S. Takaloo, M. Moghimi Zand, *Sens. Bio-Sens. Res.* **2021**, 32, 100403.
- [34] M.G. Paneli, A. Voulgaropoulos, *Electroanalysis* **1993**, 5, 355–373.
- [35] J. Wang, *Stripping Analysis*, *VCH Publishers, Inc.* **1985**.
- [36] J. Wang, *Electroanalytical techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *VCH Publishers, Inc.* **1988**.
- [37] N.A. Bohari, S. Siddiquee, S. Saallah, M. Misson, S.E. Arshad, *Sensors* **2020**, 20, 6502.
- [38] <https://chem.libretexts.org> (Επίσκεψη στις 30/10/23).
- [39] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, *John Wiley & Sons, Inc.* New York, **2001**.
- [40] M. Glanc-Gostkiewicz, M. Sophocleous, J.K. Atkinson, E. García-Breijo, *Sens. Actuator A Phys.* **2013**, 202, 101016.
- [41] Κ.Η. Ευσταθίου, *Χημική Οργανολογία – Μικροϋπολογιστές*, **2002**.
- [42] Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Σ.Α. Ζώτου, Β. Σαμανίδου, *Βιοαναλυτική Χημεία, Καλλιπος*, **2015**.
- [43] W. Goepel, Πρακτικά σεμιναρίου: «Modern Characterization Techniques for Thin Molecular Films and Immobilized Biomolecules», *Artificial Biosensing Interfaces Summer School*, Uppsala, Sweden, **1995**.
- [44] C.L. Morgan, D.J. Newman, C.P. Price, *Clin. Chem.* **1996**, 42, 193.
- [45] A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, *Biosensor – Fundamentals and Applications*, 1st edition, *OUP*, Oxford, **1987**.
- [46] L.J. Blum, P.R. Coulet, *Biosensor Principles and Applications*, 1st edition, *Marcel Dekker, Inc.* New York, **1991**.
- [47] <https://www.watelectronics.com/biosensor/> (Επίσκεψη στις 31/1/2024).
- [48] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 2333.
- [49] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1747– 1763.
- [50] A.E.G. Cass, *Biosensors – A practical approach*, *OUP*, Oxford, **1990**.
- [51] B. Eggins, *Biosensors: An introduction*, *John Wiley & Sons, Inc.* **1996**.
- [52] D.N. Gray, M.H. Keyes, B. Watson, *Anal. Chem.* **1977**, 49, 1067A.
- [53] D. Diamond, *Chemical and Biological Sensors*, *John Wiley & Sons, Inc.* **1998**.
- [54] A. Chaubey, B.D Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 441.
- [55] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th edition, **2004**.
- [56] D.T. Harvey, *Modern analytical chemistry*, 1st edition, *McGraw-Hill*, **1999**.
- [57] A.M. Santos, A. Wong, F.C. Vicentini, O. Fatibello-Filho, *Microchim. Acta* **2019**, 186, 174.
- [58] Y. Chang, Q. Cao, B.J. Venton, *Curr. Opin. Electrochem.* **2023**, 38, 101228.
- [59] E. Koukouviti, A.K. Plessas, A. Economou, N. Thomaidis, G.S. Papaefstathiou C. Kokkinos, *Biosensors* **2022**, 12, 1156.
- [60] A. Sinha, Dhanjai, R. Jain, H. Zhao, P. Karolia, N. Jadon, *Microchim. Acta* **2018**, 185, 89.

- [61] A. Saha, C. Jiang, A.A. Martí, *Carbon* **2014**, 79, 1–18.
- [62] K.Z. Milowska, J.A. Majewski, *J Phys Chem C* **2014**, 118, 17395–17401.
- [63] Z. Wang, Z. Dai, *Nanoscale* **2015**, 7, 6420–6431.
- [64] F.R. Baptista, S.A. Belhout, S. Giordani, S.J. Quinn, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4433–4453.
- [65] V. Georgakilas, J.N. Tiwari, K.C. Kemp, J.A. Perman, A.B. Bourlinos, K.S. Kim, R. Zboril, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 5464–5519.
- [66] M.V. Kharlamova, *Progress in Mater. Sci.* **2016**, 77, 125–211.
- [67] S.A. Abrori, N.L.W. Septiani, Nugraha, I. Anshori, Suyatman, V. Suendo, B. Yulianto, *Sensors* **2020**, 20, 4891.
- [68] M. Adeel, K. Asif, M.M. Rahman, S. Daniele, V. Canzonieri, F. Rizzolio, *Adv. Funct. Mater.* **2021**, 2106023.
- [69] A. Ambrosi, M. Pumera, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 2740–2755.
- [70] R.M. Cardoso, C. Kalinke, R.G. Rocha, P.L. dos Santos, D.P. Rocha, P.R. Oliveira, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1118, 73–91.
- [71] S.S. Crump, *US Patent* **1992**, 5, 121, 329A.
- [72] Ι. Γιαννατσής, Β. Δεδούσης, Β. Κανελλίδης, “Σύγχρονες Τεχνολογίες Κατασκευής με τη βοήθεια Η/Υ, κεφ. 3: Τεχνολογίες προσθετικής κατασκευής και τρισδιάστατης εκτύπωσης”, *Εκδόσεις Κάλλιπος*, **2015**.
- [73] L.E. Murr, S.M. Gaytan, D.A. Ramirez, E. Martinez, J. Hernandez, K.N. Amato, P.W. Shindo, F.R. Medina, R.B. Wicker, *J. Mater. Sci. Technol.* **2012**, 28 (1), 1–14.
- [74] L.E. Murr, E. Martinez, K.N. Amato, S.M. Gaytan, J. Hernandez, D.A. Ramirez, P.W. Shindo, F.R. Medina, R.B. Wicker, *J. Mater. Sci. Technol.* **2012**, 1 (1), 42–54.
- [75] M. Feygin, A. Shkolnik, M.N. Diamond, E. Dvorskiy, *US Patent* **1998**, 5730817 A.
- [76] A. Ainla, M.P.S. Mousavi, M.N. Tsaloglou, J. Redston, J.G. Bell, T. Fernandez-Abedul, G.M. Whiteside, *Anal. Chem.* **2018**, 90 (10), 6240–6246.
- [77] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voros, E. Reimhult, *Sensors* **2008**, 8 (3), 1400–1458.
- [78] S. Dul, L. Fambri, A. Pegoretti, *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* **2016**, 85, 181–191.
- [79] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, D. Hui, *Compos. B Eng.* **2017**, 110, 442–458.
- [80] T.D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K.T.Q. Nguyen, D. Hui, *Compos. B Eng.* **2018**, 143, 172–196.
- [81] H.H. Hamzah, S.A. Shafiee, A. Abdalla, B.A. Patel, *Electrochem. Commun.* **2018**, 96, 27–31.
- [82] J.J. Tully, G.N. Meloni, *Anal. Chem.* **2020**, 92 (22), 14853–14860.
- [83] A.L. Silva, G. Maia, S.V.F. Castro, N.M.F. Carvalho, R.A.A. Muñoz, *Front. Chem.* **2021**, 9, 684256.
- [84] V. Katseli, A. Economou, C. Kokkinos, *Talanta* **2020**, 208, 120388.
- [85] R.M. Cardoso, D.M.H. Mendonça, W.P. Silva, M.N.T. Silva, E. Nossol, R.A.B. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Anal. Chim. Acta* **2018** 1033, 49–57.
- [86] F. Novotný, V. Urbanova, J. Plutnar, M. Pumera, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, 11, 35371–35375.
- [87] D.P. Rocha, C. Foster, E. Keefe, R.A.A. Muñoz, G. Buller, C.E. Banks, *Analyst* **2020**, 145, 3424.
- [88] D.P. Rocha, V.N. Ataide, A. De Siervo, J.M. Gonçalves, R.A.A. Muñoz, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, *Chem. Eng. J.* **2021**, 425, 130594.

- [89] J. Muñoz, M. Pumera, *TrAC* **2020**, 128, 115933.
- [90] J. Junpha, A. Wisitsoraat, R. Prathumwan, W. Chaengsawang, K. Khomungkhun, K. Subannajui, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, 117, 111319.
- [91] V. Katseli, N. Thomaidis, A. Economou, C. Kokkinos, *Sens. Actuators B* **2020**, 308, 127715.
- [92] J.G. Walters, S. Ahmed, I.M.T. Rodríguez, G.D. O’Neil, *Electroanalysis* **2020**, 32, 859–866.
- [93] V. Katseli, A. Economou, C. Kokkinos, *Anal. Chem.* **2021**, 93, 7, 3331–3336.
- [94] V. Katseli, A. Economou, C. Kokkinos, *Electrochem. Commun.* **2019**, 103, 100.
- [95] Z. Rymansaib, P. Iravani, E. Emslie, M. Medvidović-Kosanović, M. Sak-Bosnar, R. Verdejo, F. Marken, *Electroanalysis* **2016**, 28, 7, 1517–1523.
- [96] R.M. Cardoso, S.V.F. Castro, M.N.T. Silva, A.P. Lima, M.H.P. Santana, E. Nossol, R.A.B. Silva, E.M. Richter, T.R.L.C. Paixao, R.A.A. Muñoz, *Sensor. Actuator. B Chem.* **2019**, 292, 302–313.
- [97] M.J. Glowacki, M. Cieslik, M. Sawczak, A. Koterwa, I. Kaczmarzyk, R. Jendrzewski, L. Szykiewicz, T. Ossowski, R. Bogdanowicz, P. Niedzialkowski, *Appl. Surf. Sci.* **2021**, 556, 149788.
- [98] V.A.O.P. Silva, W.S. Fernandes-Junior, D.P. Rocha, J.S. Stefano, R.A.A. Muñoz, J.A. Bonacin, B.C. Janegitz, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 170, 112684.
- [99] C.L. Manzanares Palenzuela, F. Novotný, P. Krupicka, Z. Sofer, M. Pumera, *Anal. Chem.* **2018**, 90, 5753–5757.
- [100] V. Katic, P.L. Dos Santos, M.F. Dos Santos, B.M. Pires, H.C. Loureiro, A.P. Lima, J.C.M. Queiroz, R. Landers, R.A.A. Muñoz, J.A. Bonacin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, 11, 38, 35068–35078.
- [101] P.L. dos Santos, V. Katic, H.C. Loureiro, M.F. dos Santos, D.P. dos Santos, A.L.B. Formiga, J.A. Bonacin, *Sensor. Actuator. B Chem.* **2019**, 281, 837–848.
- [102] F.M. de Oliveira, E.I. de Melo, R.A.B da Silva, *Sens. Actuators B* **2020**, 321, 128528.
- [103] A.F. João, S.V.F. Castro, R.M. Cardoso, R.R. Gamela, D.P. Rocha, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *J. Electroanal. Chem.* **2020**, 876, 114701.
- [104] R.M. Cardoso, D.P. Rocha, R.G. Rocha, J.S. Stefano, R.A.B. Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1132, 10–19.
- [105] A.F. João, A.L. Squissato, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, 412, 12, 2755–2762.
- [106] A.F. João, R.G. Rocha, T.A. Matias, E.M. Richter, J. Flávio S. Petrucí, R.A.A. Muñoz, *Microchem. J.* **2021**, 167, 106324.
- [107] E.M. Richter, D.P. Rocha, R.M. Cardoso, E.M. Keefe, C.W. Foster et al., *Anal. Chem.* **2019**, 91, 12844–12851.
- [108] D.P. Rocha, A.L. Squissato, S.M. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Electrochim. Acta* **2020**, 335, 135688.
- [109] R.G. Rocha, J.R. Santos, M.H. Santana, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Anal. Methods* **2021**, 13, 15, 1788–1794.
- [110] R.G. Rocha, J.S. Stefano, R.M. Cardoso, P.J. Zambiasi, J.A. Bonacin, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, *Talanta* **2020**, 219, 121289.
- [111] S.V.F. Castro, A.P. Lima, R.G. Rocha, R.M. Cardoso, R.H.O. Montes, et al., *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1130, 126–136.

- [112] R.M. Cardoso, P.R.L. Silva, A.P. Lima, D.P. Rocha, T.C. Oliveira et al. *Sens. Actuators B* **2020**, 307, 127621.
- [113] C. Kalinke, N.V. Neumsteir, P.R. de Oliveira, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1142, 135–142.
- [114] M.Z.M. Nasir, F. Novotný, O. Alduhaish, M. Pumera, *Electrochem. Commun.* **2020**, 115, 106735.
- [115] D.P. Rocha, C.W. Foster, R.A.A. Muñoz, G.A. Buller, E.M. Keefe, C.E. Banks, *Analyst* **2020**, 145, 3424–3430.
- [116] A.F. João, R.G. Rocha, T.A. Matias, E.M. Richter, J. Flávio S. Petrucic, R.A.A. Muñoz, *Microchem. J.* **2021**, 167, 106324.
- [117] E. Koukouviti, C. Kokkinos, *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1186, 339114.
- [118] J. Muñoz, E. Redondo, M. Pumera, *Adv. Funct. Mater.* **2021**, 1, 2010608.
- [119] A. Fontana-Escartin, A. Puiggali-Jou, S. Lanzalaco, O. Bertran, C. Alemán, *Adv. Eng. Mater.* **2021**, 23, 6, 2100002.
- [120] A.M.L. Marzo, C.C. Mayorga-Martinez, M. Pumera, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 151, 111980.
- [121] G. Martins, J.L. Gogola, L.H. Budni, B.C. Janegitz, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1147, 30–37.
- [122] J. Muñoz, M. Pumera, *Chem. Eng. J.* **2021**, 425, 131433.
- [123] F. de M. Morawski, G. Martins, M.K. Ramos, A.J.G. Zarbin, L. Blanes, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, *Anal. Chim. Acta* **2023**, 1258, 341169.
- [124] L. Wang, M. Pumera, *Microchim. Acta* **2021**, 188, 374.
- [125] L.R.G. Silva, J.S. Stefano, L.O. Orzari, L.C. Brazaca, E. Carrilho, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, R.A.A. Muñoz, B.C. Janegitz, *Biosensors* **2022**, 12, 622.
- [126] M. Angelopoulou, D. Kourti, M. Mertiri, P. Petrou, S. Kakabakos, C. Kokkinos, *Chemosensors* **2023**, 11, 475.
- [127] M.F. Jyoti, M. Hermanova, H. Pivonkova, O. Alduhaish, M. Pumera, *Electrochem. Commun.* **2023**, 151, 107508.
- [128] J. Muñoz, J.O. De La Cruz, G. Forte, M. Pumera, *Biosens. Bioelectron.* **2023**, 226, 115113.
- [129] C. Kalinke, P.R. De Oliveira, C.E. Banks, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, *Sens. Actuators B* **2023**, 381, 133353.
- [130] J. Lee, S. Maji, H. Lee, *Biotechnol. J.* **2023**, 18, 2300154.
- [131] R.D. Crapnell, C. Kalinke, L.R.G. Silva, J.S. Stefano, R.J. Williams, R.A.A. Muñoz, J.A. Bonacin, B.C. Janegitz, C.E. Banks, *Mater. Today* **2023**, 71, 73–90.
- [132] J.S. Stefano, L.R.G. e Silva, B.C. Janegitz, *Microchim. Acta* **2022**, 189, 414.
- [133] Proto-pasta, Composite Conductive Fiber PLA, Plant, P., (ed.) *Proto Plant* (2018), vol. **2022**, p. Safety Data Sheet.
- [134] J.A. Brydson, *Plastics Materials*, Elsevier **1999**.
- [135] K.S. Erokhin et al., *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1, 20177.
- [136] A.D. Godwin, *Applied Plastics Engineering Handbook*, Elsevier **2017**, p. 533.
- [137] M.P. Down et al., *Adv. Energy Mater.* **2019**, 9, 11, 1803019.

- [138] P. Wuamprakhon, R.D. Crapnell, E. Sigley, N.J. Hurst, R.J. Williams, M. Sawangphruk, E.M. Keefe, C.E. Banks, *Adv. Sustain. Syst.* **2023**, 7, 2, 2200407.
- [139] R.D. Crapnell, V.S. Arantes, M.J. Whittingham, E. Sigley, C. Kalinke, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, T.R. Paixao, C.E. Banks, *Green Chem* **2023**, 25, 5591.
- [140] B.A. Alshammari, et al., *Polymers* **2022**, 14, 16, 3427.
- [141] B. Krause et al., *Polymers* **2019**, 11, 6, 1073.
- [142] A. Hirsch, *Nat. Mater.* **2010**, 9, 11, 868.
- [143] K.M.F. Shahil, A.A. Balandin, *Nano Lett.* **2012**, 12, 2, 861.
- [144] S.J. Leigh, R.J. Bradley, C.P. Purssell, D.R. Billson, D.A. Hutchins, *PLOS ONE* **2012**, 7, 49365.
- [145] H.H.B. Hamzah, O. Keattch, D. Covill, B.A. Patel, *Sci. Rep.* **2018**, 8, 9135.
- [146] E. Sigley, C. Kalinke, R.D. Crapnell, M.J. Whittingham, R.J. Williams, E.M. Keefe, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, C.E. Banks, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2023**, 11, 7, 2978.
- [147] C.W. Foster et al., *Chem. Eng. J.* **2020**, 381, 122343.
- [148] R.G. Rocha, R.M. Cardoso, P.J. Zambiasi, S.V.F. Castro, T.V.B. Ferraz, G. de O. Aparecido, J.A. Bonacin, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1132, 1–9.
- [149] J.S. Stefano, L.R.G. e Silva, R.G. Rocha, L.C. Brazaca, E.M. Richter, R.A. Abarza Muñoz, B.C. Janegitz, *Anal. Chim. Acta* **2022**, 1191, 339372.
- [150] R.D. Crapnell, E. Sigley, R.J. Williams, T. Brine, A.G.M. Ferrari, C. Kalinke, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, C.E. Banks, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2023**, 11, 24, 9183–9193.
- [151] C. Kalinke, R.D. Crapnell, E. Sigley, M.J. Whittingham, P.R. de Oliveira, L.C. Brazaca, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, C.E. Banks, *Chem. Eng. J.* **2023**, 467, 143513.
- [152] L.R.G. Silva, J.S. Stefano, R.D. Crapnell, C.E. Banks, B.C. Janegitz, *Talanta Open* **2023**, 8, 100250.
- [153] I.V.S. Arantes, R.D. Crapnell, E. Bernalte, M.J. Whittingham, T.R. Paixao, C.E. Banks, *Anal. Chem.* **2023**, 95, 15086–15093.
- [154] E. Koukouviti, A. Economou, C. Kokkinos, *Adv. Funct. Mater.* **2024**, 2402094.
- [155] <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/15692-glykozi> (Επίσκεψη στις 15/5/2024).
- [156] T.A.M.D. Tirone, F.M.D. Charles Brunicardi, *World J. Surg.* **2001**, 25, 461–467.
- [157] A. Cerami, V.J. Stevens, V.M. Monnier, *Metabolism* **1979**, 28(Suppl. 1), 4.
- [158] D.J. Pettitt, W.C. Knowler, J.R. Lisse, P.H. Bennett, *Lancet* **1980**, 2, 1050.
- [159] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 489–501.
- [160] P. Rahimi, Y. Joseph, *TrAC* **2019**, 110, 367–374.
- [161] S.H. Zeisel, K.-A. da Costa, *Nutr. Rev.* **2009**, 67, 615–623.
- [162] T.V. Barkhimer, J.R. Kirchhoff, R.A. Hudson, W.S. Messer, L.M.V. Tillekeratne, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392, 651–662.
- [163] M.S.-P. Lopez, J.P.H. Perez, E. Lopez-Cabarcos, B. Lopez-Ruiz, *Electroanalysis* **2007**, 19, 370–378.
- [164] V. Thiagarajan, S. Madhurantakam, S. Sethuraman, J.B. Balaguru Rayappan, U.M. Krishnan, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, 462, 334–340.

- [165] F.S. Apple, A.H.B. Wu, J. Mair, J. Ravkilde, M. Panteghini, J. Tate, F. Pagani, R.H. Christenson, M. Mockel, O. Danne, A.S. Jaffe, *Clin. Chem.* **2005**, 51, 810–824.
- [166] O. Danne, M. Mockel, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2010**, 10, 159–171.
- [167] K. Glunde, M.-F. Penet, L. Jiang, M.A. Jacobs, Z.M. Bhujwala, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, 15, 735–747.
- [168] Y. Ikarashi, *J. Chromatogr. B* **1993**, 616, 323–326.
- [169] P. Andrieux, T. Kilinc, C. Perrin, E. Campos-Gimenez, *J. AOAC Int.* **2008**, 91, 777–785.
- [170] M. Laikhtman, J.S. Rohrer, *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 1156–1162.
- [171] N. Carter, V.C. Trenerry, *Electrophoresis* **1996**, 17, 1622–1626.
- [172] J.R. Saucerman, C.E. Winstead, T.M. Jones, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1984**, 67, 982–985.
- [173] Z. Zhang, J. Wang, X. Wang, Y. Wang, X. Yang, *Talanta* **2010**, 82, 483–487.
- [174] G. Gadda, Choline Oxidases, *The enzymes* **2020**, 47, 138–139.
- [175] M. Ozdemir, H. Arslan, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2014**, 42, 27–31.
- [176] S. Yabuki, *Sensor. Actuator. B Chem.* **1994**, 20, 159–162.
- [177] M. Yang, Y. Yang, Y. Yang, G. Shen, R. Yu, *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 127–134.
- [178] J. Wang, G. Liu, Y. Lin, *Analyst* **2006**, 131, 477–483.
- [179] M.A. Rahman, D.-S. Park, Y.-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 1565–1571.
- [180] V. Narwala, R. Deswalb, B. Batrac, V. Kalrad, R. Hoodae, M. Sharmae, J.S. Rana, *Steroids* **2019**, 143, 6–17.
- [181] Y. Levitan, A. Fang, Rosenhouse-Dantsker, V. Romanenko, *Subcell. Biochem.* **2010**, 509–549.
- [182] S. Sulimovici, G. Boyd, *Vitam. Horm.* **1970**, 199–234.
- [183] Y. Marcel, C. Vezina, B. Teng, A. Sniderman, *Atherosclerosis* **1980**, 35, 127–133.
- [184] G.D. Calvert, *Low Density Lipoproteins* **1976**, 281–319.
- [185] W.P. Castelli, *Atherosclerosis V* **1980**, 478–483.
- [186] C. Pundir, V. Narwal, *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 100, 214–227.
- [187] A. Menotti, M. Lanti, A. Zanchetti, G. Botta, M. Laurenzi, O. Terradura-Vagnarelli, et al., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2011**, 21, 315–322.
- [188] N.S.H.D.S. Setty, K.S. Sadananda, M.C. Nanjappa, S. Patra, H. Basappa, S. Krishnappa, *J. Am. College Cardiol.* **2014**, 63, 1451.
- [189] C.J. Olbricht, K.-M. Koch, *Nephron* **1994**, 66, 358–359.
- [190] S.W. Shiu, H. Zhou, Y. Wong, K.C. Tan, *J. Diabetes Invest.* **2010**, 1, 111–116.
- [191] N. Myant, *Biol. Cholesterol Related Steroids* **1981**, 853–887.
- [192] C. Lutton, *Biochimie* **1991**, 73, 1327–1334.
- [193] R. Searcy, R. Craig, L. Bergquist, *Clin. Chim. Acta* **1961**, 6, 475–480.
- [194] R.R. Bhandaru, S.R. Srinivasan, P.S. Pargaonkar, G.S. Berenson, *Lipids* **1977**, 12, 1078–1080.
- [195] K. Mizuno, M. Toyosato, S. Yabumoto, I. Tanimizu, H. Hirakawa, *Anal. Biochem.* **1980**, 108, 6–10.
- [196] A. Manasterski, B. Zak, *Microchem. J.* **1973**, 18, 18–28.
- [197] E. Obermer, R. Milton, *Biochem. J.* **1933**, 27, 345–350.
- [198] S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1083–1100.

- [199] L. Kumari, S.S. Kanwar, *Adv. Microbiol.* **2012**, 2, 49–65.
- [200] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 235–247.
- [201] N.G. Patel, S. Meier, K. Cammann, G.C. Chemnitz, *Sensor Actuat. B: Chem.* **2001**, 75 (1–2), 101–110.
- [202] C.S. Pundir, V. Narwal, B. Batra, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 86, 777–790.
- [203] L.B. Gladden, *J. Physiol.* **2004**, 558, 5–30.
- [204] M. Kristensen, J. Albertsen, M. Rentsch, et al., *J. Physiol.* **2005**, 562, 521–526.
- [205] T.G. Cori, C.F. Cori, *J. Biol. Chem.* **1933**, 99, 493–505.
- [206] X.M. Leverage, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **1999**, 2, 165–169.
- [207] J. Bakker, M.W.N. Nijsten, T.C. Jansen, *Ann. Intensive Care* **2013**, 3, 12.
- [208] E.J.O. Kompanje, T.C. Jansen, B. van der Hoven, J. Bakker, *Intensive Care Med.* **2007**, 33, 1967–1971.
- [209] W.E. Huckabee, *Am. J. Med.* **1961**, 30, 840–848.
- [210] Y. Liu, Z. Matharu, C.M. Howland, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 4, 404–416.
- [211] K. Rathee, V. Dhull, R. Dhull, S. Singh, *Biochemistry and Biophysics Reports* **2016**, 5, 35–54.
- [212] N. Nikolaus, B. Strehlitz, *Microchim. Acta* **2008**, 160, 15–55.
- [213] C. Meyerhoff, F. Bischof, F.J. Mennel, F. Sternberg, J. Bican, E.F. Pfeiffer, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 409–414.
- [214] D. Pfeiffer, B. Moller, N. Klimes, J. Szeponik, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 539–550.
- [215] F. Alama, S. RoyChoudhury, A.H. Jalala, Y. Umasankarb, S. Forouzanfara, N. Aktera, S. Bhansalia, N. Pala, *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 117, 818–829.
- [216] A.M. Gue, H. Tap, P. Gros, F. Maury, *Sens. Actuators B* **2002**, 82, 227–232.
- [217] M.M. Rahman, M.J. Shiddiky, M.A. Rahman, Y.B. Shim, *Anal. Biochem.* **2009**, 384, 159–165.
- [218] C. Arnaldo, R. Marina, K. Alexandre, V. Denise, T. Lauro, *Sens. Actuators B* **2006**, 124, 269–276.
- [219] Q. Wang, X. Wen, J. Kong, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, 50 (4), 359–375.
- [220] D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, P.S. Sharma, B.B. Prasad, *Electroanalysis* **2011**, 23, 305–320.
- [221] J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, V. Mollace, *Int. J. Cardiol.* **2016**, 213, 8–14.
- [222] F. Perez-Ruiz, N. Dalbeth, T. Bardin, *Adv. Ther.* **2015**, 32, 31–41.
- [223] C.-F. Kuo, M.J. Grainge, W. Zhang, M. Doherty, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, 11, 649–662.
- [224] L. Švorc, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8, 5755 – 5773.
- [225] M.J.M. Bueno, S. Uclés, M.D. Hernando, E. Dávoli, A.R. Fernández-Alba, *Water Res.* **2011**, 45, 2331.
- [226] M. Shechter, G. Shalmon, M. Scheinowitz, N. Koren-Morag, M.S. Feinberg, D. Harats, B.A. Sela, Y. Sharabi, P. Chouraqui, *Am. J. Cardiol.* **2011**, 107, 1255–1261.
- [227] S.P. Gaytan, R. Pasaro, *Exp. Neurol.* **2012**, 237, 247–259.
- [228] R. Barrès, J. Yan, B. Egan, J.T. Trebak, M. Rasmussen, T. Fritz, K. Caidahl, A. Krook, D.J. O’Gorman, J.R. Zierath, *Cell Metab.* **2012**, 15, 405–411.
- [229] M.C. Wardle, M.T. Treadway, H. de Wit, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2012**, 102, 526–531.

- [230] V. Fernandez-Duenas, S. Sanchez, E. Planas, R. Poveda, *Eur. J. Pain* **2008**, 12, 157–163.
- [231] A.G.-M. Ferrari, P. Carrington, S.J. Rowley-Neale, C.E. Banks, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* **2020**, 6, 2676–2690.
- [232] R.I. McDonald, K. Weber, J. Padowski, M. Flörke, C. Schneider, P.A. Green, et al., *Glob. Environ. Change* **2014**, 27, 96–105.
- [233] H. Kim, G. Jang, Y. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, 104 (3), 907–914.
- [234] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, *Exper. Suppl.* **2012**, 101, 133–164.
- [235] Commission E., Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption, *Environment D-Gf* **2018**, p. 134.
- [236] D. Wu, Y. Hu, H. Cheng, X. Ye, *Molecules* **2023**, 28, 3601.
- [237] M.E. Youssfi, A. Sifou, P.B. Aakame, N. Mahnine, S. Arsalane, M. Halim, A. Laghzizil, A. Zinedine, *Biol. Trace Elem. Res.* **2022**, 27, 2597–2626.
- [238] M. Balali-Mood, K. Naseri, Z. Tahergorabi, M.R. Khazdair, M. Sadeghi, *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 643972.
- [239] S. Kumar, *Indian J. Occup. Environ. Med.* **2018**, 22, 128–137.
- [240] M.S. Salman, H. Znad, M.N. Hasan, M.M. Hasan, *Microchem. J.* **2021**, 160, 105765.
- [241] Y. Yi, Y. Zhao, Z. Zhang, Y. Wu, G. Zhu, *Trends Environ. Anal. Chem.* **2022**, 33, 00152.
- [242] R.M. El-Shishtawy, H.A. Al-Ghamdi, M. Alam, Z.M. Al-amshany, A.M. Asiri, M.M. Rahman, *Chem. Eng. J.* **2018**, 352 225–231.
- [243] H. Sohrabi, A. Khataee, S. Ghasemzadeh, M.R. Majidi, Y. Orooji, *Trends Environ. Anal. Chem.* **2021**, 00139.
- [244] X. Liu, Y. Yao, Y. Ying, J. Ping, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, 115 187–202.
- [245] X. Wang, W. Gao, W. Yan, P. Li, H. Zou, Z. Wei, W. Guan, Y. Ma, S. Wu, Y. Yu, K. Ding, *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, 1, 2341–2346.
- [246] C.A. Rusinek, A. Bange, I. Papautsky, W.R. Heineman, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 6133–6140.
- [247] M. Khairy, S.A. El-Safty, M.A. Shenashen, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, 62, 56–68.
- [248] D. Martín-Yerga, I. Alvarez-Martos, M.C. Blanco-Lopez, C.S. Henry, M.T. Fernandez-Abedul, *Anal. Chim. Acta* **2017**, 981 24–33.
- [249] J. Zhou, G. Sun, J. Pan, Y. Pan, S. Wang, H. Zhai, *Microchim. Ichnoanal. Acta* **2019**, 186, 1–7.
- [250] Y. Ding, F. Wei, C. Dong, J. Li, C. Zhang, X. Han, *Inorg. Chem. Commun.* **2021**, 131, 108785.
- [251] X. Chai, L. Zhang, Y. Tian, *Anal. Chem.* **2014**, 86, 10668–10673.
- [252] K. Ndungu, S. Hibdon, A.R. Flegal, *Talanta* **2004**, 64, 258–263.
- [253] D. Citak, M. Tuzen, *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 1399–1404.
- [254] A.M. Ghaedi, M. Panahimehr, A.R.S. Nejad, S.J. Hosseini, A. Vafaei, M.M. Baneshi, *J. Mol. Liq.* **2018**, 272, 15–26.
- [255] K. Yang, Z. Lou, R. Fu, J. Zhou, J. Xu, S.A. Baig, X. Xu, *J. Mol. Liq.* **2018**, 260, 149–158.
- [256] M.R. Awual, M. Khraisheh, N.H. Alharthi, M. Luqman, A. Islam, M.R. Karim, M.M. Rahman, M.A. Khaleque, *Chem. Eng. J.* **2018**, 343, 118–127.
- [257] M.R. Awual, I.M.M. Rahman, T. Yaita, M.A. Khaleque, M. Ferdows, *Chem. Eng. J.* **2014**, 236, 100–109.

- [258] M.R. Awual, *Chem. Eng. J.* **2017**, 307, 85–94.
- [259] M.R. Awual, *Compos. Part B-Eng.* **2019**, 172, 387–396.
- [260] M. Naushad, Z.A. AlOthman, T. Ahamad, M.R. Awual, *Desalin. Water Treat.* **2016**, 57, 13527–13533.
- [261] <https://3dprintersuperstore.com.au/products/flashforge-creator-pro> (Επίσκεψη στις 15/06/2024).
- [262] G. Palla, K. Malecka, W. Dehaen, J. Radecki, H. Radecka, *Bioelectrochemistry* **2021**, 137, 107643.
- [263] A.M.V. Mohan, V. Rajendran, R.K. Mishra, M. Jayaraman, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, 131, 116024.
- [264] J.R. Sempionatto, J.-M. Moon, J. Wang, *ACS Sens.* **2021**, 6, 5, 1875–1883.
- [265] J.R. Sempionatto, M. Lin, L. Yin, E. De la paz, K. Pei, T. Sonsa-ard, A.N. de Loyola Silva, A.A. Khorshed, F. Zhang, N. Tostado, S. Xu, J. Wang, *Nat. Biomed. Eng.* **2021**, 5, 737–748.
- [266] Y. Yang, Y. Song, X. Bo, J. Min, O.S. Pak, L. Zhu, M. Wang, J. Tu, A. Kogan, H. Zhang, T.K. Hsiai, Z. Li, W. Gao, *Nat. Biotechnol.* **2020**, 38, 217–224.
- [267] B. Li, X. Wu, C. Shi, Y. Dai, J. Zhang, W. Liu, C. Wu, Y. Zhang, X. Huang, W. Zeng, *Surfaces and Interfaces* **2023**, 36, 102525.
- [268] A.M.V. Mohan, K.K. Aswini, A.M. Starvin, V.M. Biju, *Anal. Methods* **2013**, 5, 1764.
- [269] W. Gao, S. Emaminejad, H.Y.Y. Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, H.M. Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, D.-H. Lien, G.A. Brooks, R.W. Davis, A. Javey, *Nature* **2016**, 529, 509–514.
- [270] A. Wioerek, M. Parrilla, M. Cuartero, G.A. Crespo, *Anal. Chem.* **2020**, 92, 14, 10153–10161.
- [271] S. Cinti, R. Cusenza, D. Moscone, F. Arduini, *Talanta* **2018**, 187, 59–64.
- [272] J. Moyer, D. Wilson, I. Finkelshtein, B. Wong, R. Potts, *Diabetes Technol. Ther.* **2012**, 14, 398–402.
- [273] M. Bariya, H. Nyein, A. Javey, *Nat. Electron.* **2018**, 1, 160–171.
- [274] C. Wang, S. Chen, Y. Xiang, W. Li, X. Zhong, X. Che, J. Li, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, 69, 1–7.
- [275] A.M.V. Mohan, K.K. Aswini, A.M. Starvin, V.M. Biju, *Anal. Methods* **2013**, 5, 1764–1770.
- [276] N. Gao, Z. Cai, G. Chang, Y. He, *J. Mater. Sci.* **2023**, 58, 890–901.
- [277] H.X. Sun, S. Song, G. Zhao, X. Wang, G. Liu, *Adv. Mater. Interfaces* **2023**, 10, 2300281.
- [278] M. Xu, Y. Zhu, S. Gao, Z. Zhang, Y. Gu, X. Liu, *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, 4, 12442–12452.
- [279] B. Li, X. Wu, C. Shi, Y. Dai, J. Zhang, W. Liu, C. Wu, Y. Zhang, X. Huang, W. Zeng, *Surfaces and Interfaces* **2023**, 36, 102525.
- [280] Y. Gao, Y. Huang, J. Ge, L. Sun, A. Zhou, S. Feng, Y. Xu, X. Ning, *Talanta* **2021**, 235, 122799.
- [281] Y.-C. Lin, M. Rinawati, L.-Y. Chang, Y.-X. Wang, Y.-T. Wu, Y.-H. Yen, K.-J. Chen, K.-C. Ho, M.-H. Yeh, *Sens. Actuators B: Chem.* **2023**, 383, 133617.
- [282] Q. Chen, Y. Liu, K. Gu, J. Yao, Z. Shao, X. Chen, *Biomacromolecules* **2022**, 23, 3928–3935.
- [283] C.D. Foucher, R.E. Tubben, *Lactic Acidosis, Treasure Island (FL): StatPearls*, **2024**.
- [284] P.J. Derbyshire, H. Barr, F. Davis, S.P. Higson, *J. Physiol. Sci.* **2012**, 62, 429–440.
- [285] M. Yang, J. Wang, H. Li, J.-G. Zheng, N.N. Wu, *Nanotechnology* **2008**, 19, 075502.
- [286] R. Wang, Q. Zhai, T. An, S. Gong, W. Cheng, *Talanta* **2021**, 222, 121484.

- [287] C. Zhu, Y. Xu, Q. Chen, H. Zhao, B. Gao, T. Zhang, *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, 617, 454–462.
- [288] M. Filopoulou, G. Michail, V. Katseli, A. Economou, C. Kokkinos, *Molecules* **2023**, 28, 24, 5539.
- [289] F.S. da Cruz, F. de S. Paula, D.L. Franco, W.T.P. dos Santos, L.F. Ferreira, *JEAC* **2017**, 806, 172–179.
- [290] F. Mazzara, B. Patella, G. Aiello, A. O’Riordan, C. Torino, A. Vilasi, R. Inguanta, *Electrochim. Acta* **2021**, 388, 138652.
- [291] M. Choukairi, D. Bouchta, L. Bounab, M. Benatyah, R. Elkhmalichi, F. Chaouket, I. Raissouni, I.N. Rodriguez, *JEAC* **2015**, 758, 117–124.
- [292] M.N. Omar, A.B. Salleh, H.N. Lim, A.A. Tajudin, *Anal. Biochem.* **2016**, 509, 135–141.
- [293] S. Qi, B. Zhao, H. Tang, X. Jiang, *Electrochim. Acta* **2015**, 161, 395–402.
- [294] J. Wang, B. Yang, J. Zhong, B. Yan, K. Zhang, C. Zhai, Y. Shiraiishi, Y. Du, P. Yang, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 497, 172–180.
- [295] Z. Xu, J. Song, B. Liu, S. Lv, F. Gao, X. Luo, P. Wang, *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, 348, 130674.
- [296] Z. Li, Y. Wang, Z. Fan, Y. Sun, Y. Sun, Y. Yang, Y. Zhang, J. Ma, Z. Wang, Z. Zhu, *Biosensors* **2023**, 13, 105.
- [297] T.I. Sebokolodi, D.S. Sipuka, T.R. Tsekeli, D. Nkosi, O.A. Arotiba, *J. Food Meas. Charact.* **2022**, 16, 2536–2544.
- [298] M.K.S. Monteiro, S.S.M. Paiva, D.R. da Silva, V.J.P. Vilar, C.A. Martínez-Huitle, E.V. dos Santos, *JEAC* **2019**, 839, 283–289.
- [299] L.-C. Tai, W. Gao, M. Chao, M. Bariya, Q.P. Ngo, Z. Shahpar, H.Y.Y. Nyein, H. Park, J. Sun, Y. Jung, E. Wu, H.M. Fahad, D.-H. Lien, H. Ota, G. Cho, A. Javey, *Adv. Mater.* **2018**, 30, 1707442.
- [300] J.J. Arroyo-Gómez, D. Villarroel-Rochaa, K.C. de Freitas-Araújo, C.A. Martínez-Huitle, K. Sapag, *JEAC* **2018**, 822, 171–176.
- [301] H. Li, D. Wei, *J. Food Meas. Charact.* **2024**, 18, 3577–3583.
- [302] O. Danne, C. Lueders, C. Storm, U. Frei, M. Mockel, *Clin. Chim. Acta* **2007**, 383, 103–109.
- [303] E. Roh, H.S. Chung, J.S. Lee, J.A. Kim, Y.B. Lee, H. Sohyeon, N.H. Kim, H.J. Yoo, J.A. Seo, S.G. Kim, S.H. Baik, K.M. Choi, *PLoS One* **2019**, 14 (4), 1–13.
- [304] L.V. Shkotova, N.Y. Piechniakova, O.L. Kukla, S.V. Dzyadevych, *Food Chem.* **2016**, 197, 972–978.
- [305] T.B. Goriushkina, A.P. Soldatkin, S.V. Dzyadevych, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 15, 6528–6535.
- [306] Y. Chen, H. Zhang, H. Xue, X. Hu, G. Wang, C. Wang, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, 35, 420–425.
- [307] X. Cao, N. Wang, *Analyst* **2011**, 136, 4241–4246.
- [308] S. Masoomi-Godarzi, A.A. Khodadadi, M. Vesali-Naseh, Y. Mortazavi, *J. Electrochem. Soc.* **2014**, 161, B19–B25.
- [309] C. Zhang, H. Ni, R. Chen, W. Zhan, B. Zhang, R. Lei, T. Xiao, Y. Zha, *Microchim. Acta* **2015**, 182, 1811–1818.
- [310] C. Xia, W. Ning, *Electrochem. Commun.* **2010**, 12, 1581–1584.

- [311] E. Koukouviti, A.K. Plessas, V. Pagkali, A. Economou, G.S. Papaefstathiou, C. Kokkinos, *Microchim. Acta* **2023**, 190, 274.
- [312] F. Vasiliou, A.K. Plessas, A. Economou, N. Thomaidis, G.S. Papaefstathiou, C. Kokkinos, *J. Electroanal. Chem.* **2022**, 917, 116393.
- [313] L. Zhang, N. Wang, P. Cao, M. Lin, L. Xu, H. Ma, *Microchem. J.* **2020**, 159, 105343.
- [314] Y. Zhang, Y. Huang, P. Gao, W. Yin, M. Yin, H. Pu, Q. Sun, X. Liang, H. Fa, *Microchem. J.* **2022**, 175, 107097.
- [315] S. Chen, D. Liu, N. Song, C. Wang, X. Lu, *Compos. Commun.* **2022**, 30, 101074.
- [316] Z-Z. Ma, Y-S. Wang, B. Liu, H. Jiao, L. Xu, *Chemosensors* **2022**, 10, 416.
- [317] Z-Z. Ma, Y. Ma, B. Liu, L. Xu, H. Jiao, *New J. Chem.* **2021**, 45, 21350.
- [318] W.U. Lan, L.U. Zhi-Wei, M.A. Ying, Z. Jun-Jun, M.O. Guang-Quan, D.U. Hai-Jun, Y.E. Jian-Shan, *Chinese J. Anal. Chem.* **2020**, 48, (3), 20038–20046.
- [319] Y. Sun, Y. Li, N. Wang, Q. Qing, Q.Q. Xu, L. Xu, M. Lin, *Electroanalysis* **2018**, 30, 474–478.
- [320] L. Xiao, K. Yang, J. Duan, S.Y. Zheng, J. Jiang, *Talanta* **2022**, 247, 123587.
- [321] A.D. Daud, H.N. Lim, I. Ibrahim, N.A. Endot, N.S.K. Gowthaman, Z.T. Jiang, K.E. Cordova, *J. Electroanal. Chem.* **2022**, 921, 116676.
- [322] Y. Wei, Y. Hui, X. Lu, C. Liu, Y. Zhang, Y. Fan, W. Chen, *J. Electroanal. Chem.* **2023**, 933, 117276.
- [323] X. Xiao, S. Zheng, X. Li, G. Zhang, X. Guo, H. Xue, H. Pang, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 5234–5239.
- [324] C. Kokkinos, A. Economou, *Curr. Anal. Chem.* **2008**, 4, 183.
- [325] V. Jovanovski, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, 3, 114.
- [326] P. Kannan, G. Maduraiveeran, *Biosensors* **2023**, 13, 542.
- [327] J.M. George, A. Antony, B. Mathew, *Microchim. Acta* **2018**, 185, 358.
- [328] P. Chakraborty, S. Dhar, N. Deka, K. Debnath, S.P. Mondal, *Sens. Actuators B* **2020**, 302, 127134.
- [329] Z. Xu, M. Zhang, H. Zou, J. Liu, D. Wang, J. Wang, L. Wang, *J. Electroanal. Chem.* **2019**, 841, 129.
- [330] W.T. Wahyuni, B.R. Putra, R. Heryanto, E. Rohaeti, D.H.Y. Yanto, A. Fauzil, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2021**, 16, 210221.
- [331] V.N. Ataide, D.P. Rocha, A. Siervo, T.R.L.C. Paixao, R.A.A. Muñoz, L. Angnes, *Microchim. Acta* **2021**, 188, 388.
- [332] I. Albalawi, A. Hogan, H. Alatawi, E. Moore, *Sens. Bio-Sens. Res.* **2021**, 34, 100454.
- [333] L. Fernandez, P. Espinoza-Montero, M. Sanchez-Sarango, D. Bolanos-Mendez, J. Alvarez-Paguay, L. Dominguez-Granda, A. Rodriguez, H. Romero, A. Debut, V. Ortiz, *Sci. Rep.* **2023**, 13, 20232.
- [334] C. de Oliveira, J.V. Maciel, A. Christ-Ribeiro, A. Guarda, D. Dias, *J. Anal. Chem.* **2022**, 77, 369.
- [335] M. Geetha, M.R. Maurya, S. Al-maadeed, A.A. Muthalif, K.K. Sadasivuni, *J. Electron. Mater.* **2022**, 51, 4905.
- [336] M. Ali, S. Mir, S. Ahmed, *RSC Adv.* **2023**, 13, 26275.