



MINISTERUL EDUCAȚIEI
Universitatea Națională de Științe și Tehnologie
Politehnica București

TEZĂ DE DOCTORAT

Autor:

Ing. Elena – Alina CHITICARU

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Mariana IONIȚĂ

BUCUREȘTI

-2024-



MINISTERUL EDUCAȚIEI
Universitatea Națională de Științe și Tehnologie
Politehnica București

NANOMATERIALE PE BAZĂ DE
GRAFENĂ PENTRU APLICAȚII
BIOMEDICALE

Autor:

Ing. Elena – Alina CHITICARU

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Mariana IONIȚĂ

BUCUREȘTI

-2024-

Cuprins

OBIECTIVE GENERALE.....	1
Capitolul 1. CONTEXTUL ACTUAL ȘI MOTIVAȚIA.....	6
1.1. Introducere.....	6
1.2. Biosenzori.....	9
1.2.1. Clasificarea biosenzorilor.....	10
1.2.1.1. Clasificare după bioreceptor.....	10
1.2.1.2. Clasificare după traductor.....	12
1.2.2. Electrozi utilizați în fabricarea biosenzorilor.....	18
1.3. Grafena în fabricarea biosenzorilor.....	21
1.3.1. Proprietăți și aplicații.....	22
1.3.1.1. Spectroscopia Raman în caracterizarea grafenei.....	24
1.3.1.2. XPS în caracterizarea grafenei.....	25
1.3.2. Sinteza grafenei.....	27
1.3.2.1. Tehnici „top-down”.....	28
1.3.2.2. Metode „bottom-up”.....	29
1.3.3. Metode de reducere a GO.....	30
1.3.3.1. Reducere chimică.....	30
1.3.3.2. Reducere termică.....	30
1.3.3.3. Reducere electrochimică.....	31
1.3.3.4. Reducere fotocatalitică și prin microunde.....	31
1.3.3.5. Reducere biologică.....	31
1.3.4. Funcționalizarea RGO.....	31
1.3.4.1. Funcționalizarea RGO functionalization prin chimia diazoniului.....	32
1.3.4.2. Funcționalizarea RGO cu AuNPs.....	34
Capitolul 2. Dezvoltarea aplicațiilor medicale de tip „point-of-care” prin utilizarea biosenzorilor electrochimici.....	36
2.1. Introducere.....	36
2.2. Materiale și metode.....	38
2.3. Rezultate și discuții.....	39

2.3.1.	Caracterizarea oxidului de grafenă.....	39
2.3.2.	Măsurători și caracterizare electrochimice.....	41
2.3.2.1.	Caracterizarea electrochimică a electrozilor modificați cu GO.....	41
2.3.3.	Caracterizare, testare și comparare a platformelor de detecție.....	43
2.3.3.1.	Răspunsul DNAp-GO/GCE la hibridizarea ADN.....	43
2.3.3.2.	Răspunsul DNAp-GO/SPCE la hibridizarea ADN.....	45
2.4.	Concluzii.....	46
Capitolul 3. Platformă de detecție electrochimică bazată pe RGO funcționalizat cu săruri de diazoniu pentru hibridizarea ADN.....		
3.1.	Introducere.....	48
3.2.	Materiale și metode.....	51
3.2.1.	Reactivi și materiale.....	51
3.2.2.	Procedures.....	51
3.2.2.1.	Măsurători electrochimice.....	51
3.2.2.2.	Caracterizare morfologică și structurală.....	52
3.2.2.3.	Procedura de pregătire a electrozilor modificați cu RGO.....	52
3.2.2.4.	Funcționalizarea RGO/SPCE prin chimia diazoniului.....	53
3.2.2.5.	Fabricarea biosenzorului pentru detecția ADN.....	53
3.3.	Rezultate și discuții.....	54
3.3.1.	Caracterizare morfologică.....	54
3.3.2.	Caracterizare structurală.....	55
3.3.3.	Caracterizare electrochimică.....	56
3.3.3.1.	Electrogrefarea grupărilor carboxifenil pe electrozi modificați cu RGO...56	
3.3.3.2.	Imobilizarea sondei de ADN monocatenar modificat cu grupări amino....58	
3.3.3.3.	Răspunsul senzorului față de molecula țintă de ADN.....59	
3.3.3.4.	Evaluarea cineticii transferului de electroni la interfața electrozilor modificați cu RGO.....61	
3.4.	Concluzii.....	63
Capitolul 4. Biosenzor nemarcat pentru detecția ADN, pe bază de oxid de grafenă redus și nanoparticule de aur		
4.1.	Introducere.....	64

4.2.	Materiale și metode.....	67
4.2.1.	Reactivi și materiale.....	67
4.2.2.	Proceduri.....	67
4.2.2.1.	Caracterizare morfologică.....	67
4.2.2.2.	Caracterizare electrochimică.....	67
4.2.2.3.	Procedura de fabricație și testare a biosenzorului pentru ADN.....	68
4.2.2.4.	Teste cronoculometrice.....	68
4.3.	Rezultate și discuții.....	69
4.3.1.	Caracterizare morfologică.....	69
4.3.2.	Caracterizare structurală.....	71
4.3.3.	Caracterizare electrochimică.....	73
4.3.3.1.	SPCE funcționalizați cu AuNPs-RGO.....	73
4.3.3.2.	Caracterizarea și testarea platformei de detecție DNAp/AuNPs-RGO/SPCE	77
4.3.3.3.	Măsurători cronoculometrice.....	78
4.4.	Concluzii.....	80
Capitolul 5. O abordare inovatoare folosind oxid de grafenă redus pentru detectarea biomarkerilor osteogenici ALP și RUNX2.....		81
5.1.	Introducere.....	81
5.2.	Materiale și metode.....	84
5.2.1.	Reactivi și materiale.....	84
5.2.2.	Proceduri.....	85
5.2.2.1.	Măsurători electrochimice.....	85
5.2.2.2.	Caracterizare morfologică și structurală.....	85
5.2.2.3.	Investigații privind umectarea suprafeței.....	86
5.2.2.4.	Modificarea SPCE și testarea detecției.....	86
5.3.	Rezultate și discuții.....	87
5.3.1.	Caracterizare morfologică.....	88
5.3.2.	Caracterizare structurală.....	89
5.3.3.	Investigații privind umectarea suprafeței.....	91
5.3.4.	Caracterizare electrochimică.....	94

5.3.4.1. Detecția biomarkerului ALP.....	95
5.3.4.2. Detecția biomarkerului RUNX2.....	98
5.4. Concluzii.....	99
Chapter 6. Concluzii generale.....	101
ANNEX I – Listă de publicații și participări la conferințe științifice.....	104
Bibliografie.....	106

Cuvinte cheie: grafena, biosenzori, biomarkeri, electrochimie, detectie, inginerie tisulara.

Rezumatul tezei de doctorat

Obiective generale și specifice

Progresul diagnosticului medical a înregistrat un avans semnificativ datorită biosenzorilor, care oferă metode rapide, precise și non-invazive pentru detectarea diferiților biomarkeri. Acest lucru este deosebit de important în contextul medicinei personalizate, deoarece biosenzorii permit monitorizarea în timp real, facilitând diagnosticări rapide și planificări eficiente ale tratamentelor. Domeniile importante care pot beneficia semnificativ de îmbunătățirea tehnologiei biosenzorilor sunt reprezentate în domeniul medical de gestionarea afecțiunilor legate de sistemul osos și asistarea terapiilor cu celule stem pentru repararea osoasă.

Osteoporoza, osteoartrita și fracturile osoase, printre altele, sunt probleme semnificative de sănătate la nivel global, care afectează milioane de oameni în întreaga lume. Prin urmare, este important să se efectueze diagnosticarea timpurie și monitorizarea continuă pentru managementul și tratamentul eficient al acestor afecțiuni. Tehnicile de diagnostic tradiționale sunt invazive, consumatoare de timp și nu pot oferi decizii clinice imediate din cauza lipsei de date în timp real. Această problemă poate fi soluționată prin utilizarea biosenzorilor, în special cei electrochimici.

Biosenzorii electrochimici pot ajuta la detectarea biomarkerilor osteogenici specifici care indică sănătatea osoasă sau afecțiunile osoase, oferind astfel soluții promițătoare și timpurii pentru diverse probleme legate de sănătatea oaselor. Biomoleculele precum proteinele, peptidele sau acizii nucleici sunt implicate în procesele de resorbție, formare sau reparare osoasă. Capacitatea de a urmări continuu acești biomarkeri oferă specialiștilor o înțelegere mai bună a fiecărui pacient în parte, ceea ce duce la diagnosticări mai precise. În plus, biosenzorii pot ajuta și clinicienii să monitorizeze cum progresează bolile în timp și să evalueze eficacitatea tratamentului.

Biosenzorii joacă un rol important și în medicina regenerativă, în special în tratamentele cu celule stem pentru repararea osoasă. Terapiile bazate pe celule stem prezintă un potențial enorm în promovarea regenerării osoase și vindecare, însă succesul

lor depinde în mare măsură de monitorizarea activităților celulelor stem în timp real, atât la locul specific din țesuturile lezate, cât și în condițiile mediului local. Prin urmare, informații extrem de importante pot fi obținute prin detectarea prezenței și a nivelurilor de concentrație ale biomarkerilor osteogenici responsabili de diferențierea celulelor stem în celule osteogenice, facilitând optimizarea terapiilor cu celule stem și asigurându-le eficacitatea.

Acidul dezoxiribonucleic (ADN) a devenit o biomoleculă de interes în domeniul biosenzorilor datorită biocompatibilității înalte, stabilității termice și ușurinței de funcționalizare. Este bine cunoscut faptul că ADN-ul și structura sa de asamblare pot fi utilizate pentru detectarea unei varietăți de ținte, inclusiv proteine, enzime, ioni, acizi nucleici și biomolecule mici. Rețelele dinamice bazate pe hibridizarea ADN pot amplifica semnalele biosenzorilor datorită dezvoltării continue a nanotehnologiei ADN. În plus, ADN-ul poate organiza alte elemente funcționale și poate construi structuri nano tridimensionale (3D) complexe. În comparație cu bioprobele folosite în mod obișnuit, ADN-ul prezintă o adresabilitate superioară, rigiditate reglabilă și o activitate biologică mai susținută, ceea ce-l face o opțiune excelentă pentru biosenzori inteligenți. Bioreceptorii pe bază de ADN, cum ar fi aptamerii, au fost raportați că au o stabilitate termică îmbunătățită, afinitate biologică modulară și rezistență crescută la atacul enzimatic al nucleazelor prin selectare și modificare manuală. Pentru a obține un control precis asupra poziției spațiale a modificărilor, ADN-ul poate fi de asemenea utilizat pentru a construi structuri supramoleculare programabile. Acest lucru ar putea îmbunătăți semnificativ performanța biosenzorilor și ar putea servi chiar drept inspirație pentru dezvoltarea altor platforme inovative de detecție.

Având în vedere că tehnologiile moleculare clasice folosite în detectarea ADN-ului și a biomarkerilor, cum ar fi reacția de polimerizare în lanț (PCR) și testul imunisorbant legat de enzimă (ELISA), nu sunt potrivite pentru teste la punctul de îngrijire (POC) deoarece necesită muncă de laborator extinsă, reactivi scumpi și personal calificat, se subliniază necesitatea îmbunătățirii tehnologiei biosenzorilor pentru a permite detectarea biomarkerilor în timp real într-un mod non-invaziv, la un preț convenabil și prietenos pentru pacient.

În acest context, având în vedere argumentele discutate mai sus, obiectivul principal al tezei mele de doctorat este de a contribui la domeniul medicinei personalizate prin dezvoltarea unui biosenzor electrochimic inovator capabil să detecteze cu precizie biomarkeri osteogenici în timp real, pentru a satisface nevoia de monitorizare rapidă, simplă și continuă în dezvoltarea dispozitivelor POC. În același timp, îmi propun ca această lucrare să ofere mijloacele necesare pentru proiectarea unei platforme de detecție robuste și versatile, care să poată fi ușor modificată pentru a detecta și cuantifica precis o gamă largă de biomarkeri, nu doar osteogenici, cu perspective ridicate de industrializare.

Obiectivul general al tezei prezente este susținut de mai multe obiective specifice, după cum urmează:

- Compararea electrozilor de carbon vitros (GCE) și a electrozilor de carbon serigrafiați (SPCEs) pentru a determina care tip de electrod furnizează cea mai bună performanță pentru dezvoltarea biosenzorilor;
- Explorarea funcționalizării oxidului de grafenă redus (RGO) cu săruri de diazoniu pentru a permite atașarea covalentă a sondei pe electrozi, cu scopul de a crește sensibilitatea platformei de detecție;
- Investigarea funcționalizării RGO cu nanoparticule de aur (AuNPs) pentru creșterea ratei de transfer de electroni și, implicit, creșterea sensibilității biosenzorului pentru o imobilizare non-covalentă a bioreceptorului;
- Testarea celei mai promițătoare platforme bazată pe RGO pentru detectarea biomarkerilor osteogenici specifici, cum ar fi fosfataza alcalină (ALP) și factorul de transcripție 2 (RUNX2);
- Caracterizarea detaliată și compararea structurală a fiecărei platforme de detecție propuse și dezvoltate în cadrul acestor studii.

Această teză de doctorat este împărțită în două părți: prima parte prezintă stadiul actual al tehnologiei în domeniul biosenzorilor, abordând materialele și metodele utilizate pentru fabricarea acestora, în timp ce a doua parte este axată pe contribuții originale menite să răspundă nevoii actuale de tehnici îmbunătățite pentru detecția biomarkerilor. Cele șase capitole care alcătuiesc această teză sunt rezumate după cum urmează:

Capitolul 1 prezintă aspecte generale despre biosenzori, discutând despre istoria lor, clasificare, principalele avantaje și dezavantaje, precum și aplicațiile lor. Studiul literaturii este completat cu informații teoretice despre grafenă și derivații acesteia, cu accent pe proprietățile acestora, avantajele și limitările în aplicațiile de biosenzori, metodele de sinteză, precum și metodele de reducere a oxidului de grafenă (GO) și importanța sa, cum ar fi creșterea suprafeței specifice și conductivității electrice a materialului. În plus, sunt discutate metodele de funcționalizare a grafenei, în special funcționalizarea cu săruri de diazoniu și nanoparticule de aur, care au fost realizate pentru a crește și mai mult suprafața electrozilor și pentru a furniza funcționalități pentru atașarea covalentă a sondelor.

În capitolul 2 sunt prezentate primele rezultate originale obținute în această lucrare. În cadrul tezei mele de doctorat, m-am concentrat inițial pe compararea electrozilor de carbon vitros cu cei serigrafiați în vederea determinării celui mai potrivit electrod de lucru (WE) pentru a fi utilizat în fabricarea platformei de detecție. În acest scop, am acoperit ambii electrozi cu GO folosind aceeași metodă și i-am testat pentru capacitatea lor de detecție a ADN-ului. S-a constatat că, în timp ce ambele suprafețe au o capacitate bună de adsorbție a ADN-ului, GO/SPCE prezintă o sensibilitate mai mare în detectarea hibridizării ADN-ului, detectând ținta până la 10 nM, în comparație cu GO/GCE care a detectat ținta până la 25 nM. Astfel, aceste constatări joacă un rol important în aplicațiile de tip POC, deoarece SPCE sunt accesibili, portabili și ușor de utilizat, fiind potriviți pentru diagnosticarea în timp real și producția în masă a biosenzorilor.

În capitolul 3 este prezentată o direcție nouă, în care SPCE sunt modificați cu RGO funcționalizat cu sare de diazoniu în încercarea de a crește sensibilitatea platformei de detecție. Noutatea acestui studiu constă în furnizarea unei funcționalizări controlate și stabile a electrozilor pe bază de RGO prin chimia diazoniului pentru ancorarea grupărilor aril carboxilate (Ar-COOH) pe suprafața RGO, pentru a favoriza atașarea covalentă a sondelor de ADN monocatenar modificat cu amino, utilizând agenții de cuplare EDC și NHS, îmbunătățind imobilizarea sondei de ADN monocatenar în comparație cu alte metode. Caracterizările morfologice, structurale și electrochimice confirmă că prin chimia diazoniului se poate obține o platformă de detecție mai stabilă în comparație cu studiile anterioare. Mai mult, nivelul de saturare al sondei de ADN monocatenar modificată cu grupări amino a fost determinat la concentrația de 10 μM și s-a arătat că procesul de

hibridizare a ADN-ului a fost detectat cu succes în intervalul cuprins între 200 nM și 1 nM, prin monitorizarea modificărilor semnalului electrochimic. Rezultatele sunt confirmate prin evaluarea cineticii transferului de electroni la suprafața electrozilor prin studii de variație a vitezei de baliere în voltametrie ciclică (CV), precum și prin modificările rezistenței la transfer de sarcină (R_{ct}) raportate prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS).

Capitolul 4 explorează funcționalizarea RGO cu nanoparticule de aur și ulterioara modificare a SPCE pentru a permite atașarea non-covalentă a sondei pe electrodul de lucru. Fabricarea acestei platforme implică o procedură electrochimică în două etape, prima etapă fiind reducerea oxidului de grafenă, în timp ce a doua etapă implică reducerea electrochimică și electrografarea simultană a AuNPs pe suprafața RGO. Concluzia acestui studiu a fost că introducerea nanoparticulelor de aur în sistem contribuie la creșterea conductivității suprafeței și, prin urmare, la o detectare mai sensibilă a oligonucleotidelor.

Capitolul 5 prezintă o abordare inovatoare pentru detectarea biomarkerilor osteogenici, în special a ALP și RUNX2, bazată pe rezultatele obținute în studiile anterioare. Demonstrarea conceptului se bazează pe utilizarea SPCEs modificate cu RGO ca cel mai simplu, rapid și accesibil protocol pentru fabricarea platformei de detecție. Pentru prima dată este propus un biosenzor electrochimic pentru detectarea RUNX2 și rezultatele obținute din numeroase tehnici de caracterizare arată că platforma pe bază de RGO poate detecta ambii biomarkeri, RUNX2 și ALP, până la 1 nM, cu rezultate mai bune în ceea ce privește sensibilitatea obținută pentru RUNX2.

În capitolul 6 sunt prezentate concluziile generale ale contribuțiilor originale obținute în timpul programului de doctorat, sunt descrise în detaliu în partea a doua a acestei teze.

Teza de doctorat se încheie cu o listă de referințe bibliografice și cu o listă a publicațiilor și conferințelor în care au fost diseminate rezultatele pe parcursul programului meu de doctorat.

Contextul actual și motivația

Dezvoltarea biosenzorilor electrochimici a avansat activ în ultimii ani datorită unei cereri mari pentru dispozitive de detecție performante. În literatura de specialitate, grafena

și derivații săi au atras atenția datorită proprietăților lor remarcabile electrice, mecanice și chimice [1-3]. În această teză de doctorat este prezentată investigarea, optimizarea și caracterizarea mai multor platforme de detecție electrochimică fabricate cu materiale bazate pe grafenă pentru detectarea hibridizării ADN-ului, având ca scop final detectarea biomarkerilor osteogenici.

Detectarea biomarkerilor osteogenici este extrem de importantă în domeniile medicinei regenerative, ortopediei și osteologiei, deoarece aceștia sunt indicatori ai formării osoase și sănătății osoase, oferind informații esențiale despre mecanismele biologice legate de metabolismul, creșterea și repararea oaselor [4, 5]. Prin urmare, detectarea timpurie și precisă a acestor biomarkeri poate ajuta la diagnosticarea rapidă a afecțiunilor scheletice, cum ar fi osteoartrita, osteoporoza și alte tulburări metabolice. În plus, monitorizarea biomarkerilor osteogenici în timp real este utilă pentru a prezice rezultatele terapeutice, în special pentru aplicațiile destinate tratării defectelor osoase folosind grefe osoase, implanturi ortopedice și medicină regenerativă bazată pe celule stem, cu scopul de a îmbunătăți regenerarea osoasă și vindecarea [6]. Identificarea biomarkerilor osteogenici este esențială pentru susținerea dezvoltării unor abordări terapeutice noi în gestionarea sănătății și bolilor osoase, deoarece facilitează evaluarea calității țesutului osos pentru fiecare pacient și eficacitatea planurilor de tratament.

Grafena este un nanomaterial bidimensional (2D) pe bază de carbon cu multe proprietăți remarcabile care îl fac potrivit pentru utilizare în biosenzori. Datorită excelenței sale conductivități electrice, suprafeței specifice mari și stabilității chimice bune [7], grafena a fost explorată într-o varietate de aplicații de biosenzori în care interacțiunea cu biomoleculele este foarte importantă [8-10]. Până în prezent, au fost propuși numeroși biosenzori pe bază de grafenă pentru detectarea ADN-ului [11-13]. În această teză, au fost investigați mai mulți derivați ai grafenei, respectiv GO, RGO, RGO funcționalizat cu grupe aril-carboxilice prin chimia diazoniului (RGO-Ar-COOH) și RGO funcționalizat cu nanoparticule de aur (RGO-AuNPs), pentru a determina avantajele specifice ale fiecăruia în ceea ce privește stabilitatea, ușurința de funcționalizare, conductivitatea electrică și capacitatea de a lega biomolecule. S-a demonstrat că modificarea electrozilor cu GO sau RGO poate îmbunătăți semnificativ performanța biosenzorilor pentru ADN, deoarece funcționalitățile oxigenate prezente pe suprafața materialului ajută la imobilizarea sondei

de ADN [14, 15], în timp ce reducerea GO îmbunătățește conductivitatea și proprietățile electrochimice generale ale platformei de detecție [16, 17].

În plus, proprietățile unei platforme de detecție pot fi îmbunătățite adițional prin încorporarea nanoparticulelor de aur în sistem, ceea ce a demonstrat că poate crește sensibilitatea biosenzorilor electrochimici pentru detectarea ADN-ului [18, 19]. Nanoparticulele de aur au proprietăți electrice superioare și capacitatea de a îmbunătăți suprafața și conductivitatea electrozilor utilizați pentru fabricarea biosenzorilor, așa cum au demonstrat mai multe studii [20-22]. De exemplu, Liu și colab. [23] au fabricat un biosenzor pentru detecția ADN bazat pe RGO și AuNPs pentru detectarea *Mycobacterium tuberculosis*, arătând că nanoparticulele au contribuit la îmbunătățirea capacității de imobilizare a sondei, în timp ce au îmbunătățit transferul de sarcină, conducând la un platformă de detecție foarte sensibilă și stabilă.

Mai mult, chimia diazoniului a fost utilizată ca metodă robustă și reproductibilă pentru imobilizarea covalentă a sondelor ADN pe electrozi pe bază de grafenă. Această tehnică implică reducerea electrochimică a sărurilor de diazoniu pentru a grefa grupări aril pe suprafața electrodului [24, 25], creând situsuri reactive pentru atașarea sondelor ADN modificate cu grupări amino. În particular, această metodă îmbunătățește stabilitatea și eficiența de hibridizare a biosenzorilor ADN, contribuind la aplicații în care detectarea sensibilă și selectivă a ADN este necesară [26, 27]. Având în vedere că sărurile de diazoniu pot fi instabile și chiar explozive [28], nu mulți oameni de știință au explorat proprietățile lor în aplicații pentru biosenzori. Cu toate acestea, au fost efectuate mai multe studii pentru a investiga modul în care chimia diazoniului poate fi utilizată în siguranță în proiectarea biosenzorilor [29-31]. Wang și colab. [32] au propus un imunosenzor pentru detectarea alfa-fetoproteinei, un biomarker de diagnostic pentru cancerul hepatic, utilizând un electrod modificat cu grafenă și chimia diazoniului pentru imobilizarea bioreceptorului. Aceștia arată faptul că utilizarea grafenei a îmbunătățit sensibilitatea și stabilitatea sistemului, în timp ce funcționalizarea cu grupări aminofenil a facilitat imobilizarea sondelor.

Deși s-au înregistrat progrese semnificative în domeniul biosenzorilor electrochimici, există încă multe provocări care trebuie depășite înainte ca biosenzorii ADN să poată fi fabricați în masă și comercializați. Printre aceste limitări se numără necesitatea unei reproducibilități ridicate, cât și a unei specificități și sensibilități ridicate.

În plus, alte caracteristici care necesită investigații suplimentare sunt stabilitatea pe termen lung și rezistența acestor biosenzori în condiții reale. Prin urmare, se preconizează că cercetarea va fi concentrată pe optimizarea protocolului de fabricație a acestor platforme, pe îmbunătățirea performanței biosenzorilor prin creșterea selectivității, sensibilității și specificității, precum și pe adaptarea dispozitivelor conceptuale în sisteme integrate pentru aplicații de tip POC.

În această teză îmi propun să continui progresele menționate anterior prin explorarea unor platforme noi de detecție și prin abordarea provocărilor actuale din domeniu. În acest sens, am testat și comparat două tipuri de electrozi, respectiv GCE și SPCE, aleși pentru proprietățile lor superioare în ceea ce privește versatilitatea, ușurința de funcționalizare, conductivitatea ridicată și stabilitatea chimică. Au fost fabricate două platforme pornind de la acești electrozi, ce au fost modificați cu RGO, și caracterizați pe larg prin microscopie electronică de transmisie (TEM), spectroscopie Raman, spectroscopie cu transformare Fourier în infraroșu (FTIR), difracție cu raze X (XRD), voltametrie ciclică și spectroscopie de impedanță electrochimică. Platforma bazată pe SPCE a demonstrat o sensibilitate sporită pentru detectarea ADN. Având în vedere ușurința sa de caracterizare, caracterul robust și potențialul de miniaturizare, SPCE au fost selectați pentru continuarea studiilor.

Un alt obiectiv a fost de a explora imobilizarea covalentă a bioreceptorului pe SPCE pentru a determina dacă se poate obține o sensibilitate mai mare a biosenzorului. Prin urmare, electrozii au fost modificați cu RGO funcționalizat prin chimia diazoniului, pentru a furniza grupări funcționale aril pe suprafața electrodului, care să servească drept ancore pentru atașarea sondelor ADN modificate cu grupări amino, prin cuplaj carbodiimidic, ca o abordare covalentă. Platforma electrochimică a fost caracterizată prin mai multe tehnici, inclusiv microscopie electronică de baleiaj (SEM), spectroscopie Raman, CV și EIS, arătând că s-a obținut un transfer crescut de electroni la interfața electrodului după hibridizarea ADN, detectând ținta într-un interval de 200 nM - 1 nM, și că platforma propusă poate fi dezvoltată ca un dispozitiv de detecție ADN.

În plus, a fost investigată o altă metodă de funcționalizare RGO pentru a verifica dacă se poate obține o sensibilitate ridicată prin imobilizarea bioreceptorului pe cale non-covalentă. În acest studiu, SPCE modificați cu RGO au fost funcționalizați cu nanoparticule de aur prin reducerea electrochimică a acidului cloroauric și fiecare etapă a modificării a

fost caracterizată prin SEM, spectroscopie fotoelectronică cu raze X (XPS), CV, EIS și studii de cronoculometrie. Rezultatele au arătat că funcționalizarea RGO cu AuNPs electrografate a condus la o conductivitate a suprafeței mai mare și, prin urmare, la o sensibilitate și o specificitate crescute în detectarea ADN țintă. S-a demonstrat că această platformă electrochimică diferențiază între ținta complementară și cea necomplementară și, de asemenea, detectează analitul țintă până la 1 nM.

În cele din urmă, pe baza tuturor studiilor proprii anterioare, este propusă o platformă de detecție simplă, necostisitoare și eficientă ca soluție pentru detectarea și cuantificarea biomarkerilor osteogenici RUNX2 și ALP. SPCE au fost modificați cu RGO și bioreceptorii corespunzători fiecărui biomarker au fost imobilizați pe suprafața electrodului utilizând tehnica adsorbției fizice. Electrozii modificați au fost caracterizați extensiv prin XPS, măsurători ale unghiului de contact, SEM, spectroscopie Raman și prin metode electrochimice, și anume CV și EIS, toate aceste metode confirmând modificarea electrozilor cu GO redus electrochimic, precum și imobilizarea bioreceptorilor. Instrumentele electrochimice demonstrează în acest studiu că aceste platforme pilot detectează ambii biomarkeri osteogenici cu o concentrație de 1 nM, prezentând o sensibilitate mai mare în cazul RUNX2, având potențialul de a fi produse în masă la scară industrială.

Concluzii generale și contribuții originale

Principalele contribuții originale prezentate în teza de doctorat:

1. Compararea GCE și SPCE pentru detectarea oligonucleotidelor.

După studierea literaturii de specialitate am observat că nu există niciun alt studiu publicat privind compararea GCE și SPCE modificați cu GO pentru a fi utilizați ca platformă de detecție electrochimică pentru hibridizarea ADN. În această lucrare am arătat că ambele platforme sunt eficiente în adsorbția și hibridizarea ADN. Cu toate acestea, sensibilitatea detecției hibridizării ADN este mai mare în cazul GO/SPCEs, cu o limită de detecție de 10 nM, comparativ cu 25 nM pentru GO/GCEs. Această sensibilitate mai mare, împreună cu costul scăzut, portabilitatea, accesibilitatea și ușurința de miniaturizare a SPCE îi face mai potriviți pentru aplicațiile POC. Caracterizați cu ajutorul unor tehnici precum TEM, spectroscopia Raman, FTIR, XRD, CV și EIS, acest studiu demonstrează că SPCE ar putea fi esențiale în dezvoltarea unor biosenzori eficienți pentru diagnosticarea

în timp real și medicină personalizată.

2. Utilizarea chimiei diazoniului pentru funcționalizarea RGO în vederea imobilizării covalente a sondelor ADN.

Până în prezent nu există niciun alt studiu care să fi utilizat sarea de diazoniu generată in situ în vederea modificării RGO/SPCE cu un strat de carboxifenil pentru a oferi ancore pentru atașarea covalentă a bioreceptorului cu scopul de a proiecta o platformă de detecție electrochimică pentru hibridizarea ADN. Această abordare inovatoare îmbunătățește semnificativ sensibilitatea biosenzorilor electrochimici pentru detectarea ADN. Funcționalizarea suprafeței electrodului modificat cu grafenă prin chimia diazoniului a fost realizată prin electrochimie (CV) și îmbunătățește stabilitatea și eficiența hibridizării prin imobilizarea covalentă a sondelor ADN modificate cu grupări amino. S-a demonstrat că grefarea RGO cu grupări carboxifenil permite imobilizarea controlată și stabilă a sondelor, rezultând o performanță superioară pentru detectarea hibridizării ADN. Această metodă a atins o limită de detecție de până la 1 nM, demonstrând o creștere semnificativă a sensibilității. Aceste rezultate au fost validate prin diverse tehnici de caracterizare, inclusiv SEM, spectroscopie Raman, CV și EIS, subliniind potențialul acestei abordări în crearea de biosenzori extrem de sensibili și fiabili.

3. Modificarea RGO/SPCEs cu nanoparticule de aur pentru fabricarea unui biosenzor electrochimic pentru detecția ADN.

În acest studiu a fost prezentată pentru prima dată modificarea RGO/SPCE cu AuNPs electrogrefate pentru imobilizarea non-covalentă a bioreceptorului în proiectarea unui biosenzor electrochimic pentru detectarea hibridizării ADN. Încorporarea AuNPs în SPCE modificați cu RGO printr-o tehnică electrochimică simplă, îmbunătățește semnificativ proprietățile electrochimice și sensibilitatea platformei, după cum reiese din analizele SEM, XPS, CV, EIS și cronoculometrie. Acest biosenzor demonstrează o sensibilitate crescută, detectând oligonucleotide ADN până la o concentrație de 1 nM, chiar și cu imobilizarea sondei realizată prin adsorbție fizică. Rezultatele subliniază potențialul materialelor pe bază de grafenă modificate cu nanoparticule metalice precum AuNPs pentru a produce biosenzori rezistenți cu performanțe superioare, marcând un progres semnificativ în tehnologia biosenzorilor pentru aplicații biomedicale.

4. Proiectarea unei platforme de detecție electrochimică pentru RUNX2 și ALP

bazată pe SPCE modifi aţi cu RGO

Noutatea acestui studiu constă în detectarea electrochimică inovatoare a biomarkerilor osteogenici ALP  i RUNX2, utilizând o platformă bazată pe grafenă  i SPCE.  n timp ce studii anterioare au propus biosenzori pentru detectarea ALP, niciunul nu a utilizat SPCE modifi aţi cu RGO, ceea ce face ca această abordare să fie una inovatoare. Mai mult, nu s-au găsit studii anterioare privind detectarea electrochimică a RUNX2, eviden iind contribu ia unică a acestei cercetări. Tehnici de caracterizare precum SEM, spectroscopia Raman, XPS  i măsurătorile unghiului de contact au confirmat modificarea cu succes a SPCE cu RGO, în timp ce metodele electrochimice, precum CV  i EIS, au validat imobilizarea eficientă a bioreceptorilor pe RGO prin adsorbție fizică. Studiul a demonstrat o limită de detecție remarcabilă de 1 nM pentru ambii biomarkeri, cu o sensibilitate superioară observată pentru RUNX2 fa a de ALP. Aceste descoperiri subliniază poten ialul SPCE modifi aţi cu RGO ca platformă fiabilă  i scalabilă pentru biosenzori, pregătită să avanseze diagnosticul biomedical  i să faciliteze produc ia în masă la costuri reduse în industrie.

Din toate studiile experimentale, se pot trage mai multe concluzii finale.  n primul r nd, materialele bazate pe grafenă au demonstrat un poten ial ridicat de a cre te sensibilitatea biosenzorilor electrochimici pentru ADN.  n al doilea r nd, acestea pot fi îmbunătăţite prin funcționalizarea RGO folosind chimia diazoniului sau nanoparticule metalice, cum ar fi AuNPs, pentru o detecție îmbunătăţită a  intei.  n al treilea r nd, SPCE oferă avantaje practice fa a de alte electrozi, cum ar fi GCE, în special în aplicațiile de tip POC, datorită accesibilităţii, u ur nei în utilizare, precum  i scalabilit ţii pentru produc ia în masă.

 n plus, activitatea experimentală desfăşurată în cursul acestui program de doctorat vizează abordarea unor limitări ale tehnologiilor actuale de diagnosticare,  i anume nevoia de monitorizare în timp real, non-invazivitaea  i costul redus, care pot fi realizate numai prin integrarea materialelor  i tehnicilor avansate în proiectarea biosenzorilor. Aceste dezvoltări au capacitatea de a îmbunătăţi terapiile actuale pentru afec iunile osoase  i de a oferi pacien ilor acces la solu ii personalizate pentru o recuperare mai rapidă  i mai u oar .

 n final, aceste studii oferă cercetări aprofundate privind tehnologia biosenzorilor,

care este extrem de importantă pentru dezvoltarea instrumentelor de detecție de generație viitoare, oferind perspective asupra modului în care acestea pot fi îmbunătățite pentru rezultate superioare. În contextul clinic, se așteaptă ca implementarea acestor biosenzori să îmbunătățească capacitatea furnizorilor de servicii medicale de a oferi îngrijiri personalizate în mod eficient, contribuind astfel la viitorul medicinei.

Lista publicațiilor și diseminarea rezultatelor

Această teză de doctorat este un compendiu al următoarelor articole științifice, publicate pe parcursul programului meu de doctorat, având un factor de impact cumulat de 13.9:

1. **Chiticaru EA**, Toader GA, Ioniță M. Towards point-of-care medical applications using electrochemical biosensors. U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 86, Iss. 1, 2024. ISSN 1454-2331. IF=0.

2. **Chiticaru EA**, Pilan L, Ioniță M. Electrochemical detection platform based on RGO functionalized with diazonium salt for DNA hybridization. Biosensors. 2022 Jan 13;12(1):39. IF=5.4.

3. **Chiticaru EA**, Damian CM, Pilan L, Ioniță M. Label-Free DNA Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles. Biosensors. 2023 Aug 8;13(8):797. IF=5.4.

4. **Chiticaru EA**, Ioniță M. A Novel Approach Using Reduced Graphene Oxide for the Detection of ALP and RUNX2 Osteogenic Biomarkers. Current Issues in Molecular Biology. 2024 May;46(5):4489-505. IF=3.1.

Studii suplimentare, precum articole tip *review* și capitole de carte, au fost, de asemenea, publicate pe parcursul acestui program de doctorat:

1. Tite T, **Chiticaru EA**, Burns JS, Ioniță M. Impact of nano-morphology, lattice defects and conductivity on the performance of graphene based electrochemical biosensors. Journal of nanobiotechnology. 2019 Dec; 17:1-22; IF=10.2. (articol tip *review*).

2. **Chiticaru EA**, Ionita M. Graphene toxicity and future perspectives in healthcare and biomedicine. FlatChem. 2022 Sep 1; 35:100417; IF=6.2. (articol tip *review*).

3. **Chiticaru EA**, Muraru S, Ioniță M. From unidimensional carbonaceous materials

to multidimensional structures through molecular modeling. In Carbon Related Materials: Commemoration for Nobel Laureate Professor Suzuki Special Symposium at IUMRS-ICAM2017 2021 (pp. 1-21). Springer Singapore (capitol de carte).

Rezultatele obținute în cadrul programului meu de doctorat au fost diseminate la următoarele conferințe naționale și internaționale:

1. 6th International Congress on Biomaterials & Biosensing (BIOMATSEN); Oludeniz, Turcia; 17-23 octombrie 2021; prezentare tip poster: "Label-free DNA biosensor based on reduced graphene oxide functionalized by diazonium chemistry", autori: **Elena A. Chiticaru**, Luisa Pilan, Mariana Ioniță.

2. 12th International Congress on Advances in Applied Physics & Materials Science (APMAS); Oludeniz, Turcia; 13-19 octombrie 2022; prezentare tip poster: "Impedimetric biosensor based on reduced graphene oxide functionalized with gold nanoparticles for DNA detection", autori: **Elena A. Chiticaru**, Mariana Ioniță.

3. RealMe conference (Transnational Multiplier Event); București, România; 18-19 octombrie 2023; prezentare tip poster: "Electrochemical label free biosensor based on reduced graphene and gold nanoparticles for DNA hybridization detection", autori: **Elena A. Chiticaru**, Celina M. Damian, Luisa Pilan, Mariana Ionita.

Bibliografie selectivă

1. W. Ababay Ketema and A. Delele Worku, "Recent advances of graphene-based materials for emerging technologies," Results in Chemistry, vol. 5, 2023.
2. K. Malisz and B. Świczko-Żurek, "Graphene Production and Biomedical Applications: A Review," Crystals, vol. 13, 2023.
3. R. Sveglij, R. Toniolo, C. Bertoni, and A. Fraleoni-Morgera, "Synergistic Applications of Graphene-Based Materials and Deep Eutectic Solvents in Sustainable Sensing: A Comprehensive Review," Sensors (Basel), vol. 24, Apr 9 2024.
4. M. H. Al-Ani and A. O. Mageet, "Extraction Planning in Orthodontics," The Journal of Contemporary Dental Practice, vol. 19, pp. 619-623, 2018.
5. M. T. Valenti, L. Dalle Carbonare, and M. Mottes, "Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions," Int J Mol Sci, vol. 18, Dec 27 2016.
6. N. Xue, X. Ding, R. Huang, R. Jiang, H. Huang, X. Pan, et al., "Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects," Pharmaceuticals (Basel), vol. 15, Jul 17 2022.
7. S. Singh, M. R. Hasan, P. Sharma, and J. Narang, "Graphene nanomaterials: The

- wondering material from synthesis to applications," *Sensors International*, vol. 3, 2022.
8. S. Goenka, V. Sant, and S. Sant, "Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering," *J Control Release*, vol. 173, pp. 75-88, Jan 10 2014.
 9. J. Pena-Bahamonde, H. N. Nguyen, S. K. Fanourakis, and D. F. Rodrigues, "Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences," *J Nanobiotechnology*, vol. 16, p. 75, Sep 22 2018.
 10. R. Saharan, S. K. Paliwal, A. Tiwari, V. Tiwari, R. Singh, S. K. Beniwal, et al., "Exploring graphene and its potential in delivery of drugs and biomolecules," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 84, 2023.
 11. B. Mikaeeli Kangarshahi, S. M. Naghib, and N. Rabiee, "DNA/RNA-based electrochemical nanobiosensors for early detection of cancers," *Crit Rev Clin Lab Sci*, pp. 1-23, Mar 7 2024.
 12. N. Naghshgar, S. Hosseinzadeh, A. Derakhshandeh, R. Shaali, and M. M. Doroodmand, "Introducing a portable electrochemical biosensor for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis detection using graphene oxide and chitosan," *Sci Rep*, vol. 14, p. 34, Jan 2 2024.
 13. S. Nazir, "Recent Advances and Applications of Graphene-Based Biosensors for Blood-Based Biomarkers in Neurodegenerative Diseases," *Biomedical Materials & Devices*, 2024.
 14. D. Ozkan-Ariksoysal, "Current Perspectives in Graphene Oxide-Based Electrochemical Biosensors for Cancer Diagnostics," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, Aug 6 2022.
 15. S. Shahriari, M. Sastry, S. Panjikar, and R. K. Singh Raman, "Graphene and Graphene Oxide as a Support for Biomolecules in the Development of Biosensors," *Nanotechnol Sci Appl*, vol. 14, pp. 197-220, 2021.
 16. B. Anegebe, I. H. Ifijen, M. Maliki, I. E. Uwidia, and A. I. Aigbodion, "Graphene oxide synthesis and applications in emerging contaminant removal: a comprehensive review," *Environmental Sciences Europe*, vol. 36, 2024.
 17. A. Moyseowicz, D. Minta, and G. Gryglewicz, "Conductive Polymer/Graphene-based Composites for Next Generation Energy Storage and Sensing Applications," *ChemElectroChem*, vol. 10, 2023.
 18. M. R. Kumalasari, R. Alfanaar, and A. S. Andreani, "Gold nanoparticles (AuNPs): A versatile material for biosensor application," *Talanta Open*, vol. 9, 2024.
 19. J. Wang, A. J. Drelich, C. M. Hopkins, S. Mecozzi, L. Li, G. Kwon, et al., "Gold nanoparticles in virus detection: Recent advances and potential considerations for SARS-CoV-2 testing development," *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 14, p. e1754, Jan 2022.
 20. A. S. Elewi, S. A. W. Al-Shammaree, and A. K. M. A. Al Sammarraie, "Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin-modified gold nanoparticles–screen printed carbon electrode," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 28, 2020.

21. A. L. Soares, B. M. Hryniewicz, A. E. Deller, J. Volpe, L. F. Marchesi, D. E. P. Souto, et al., "Electrodes Based on PEDOT Nanotubes Decorated with Gold Nanoparticles for Biosensing and Energy Storage," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 4, pp. 9945- 9956, 2021.
22. O. O. Soldatkin, O. V. Soldatkina, I. I. Piliponskiy, L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. M. Dybkova, et al., "Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors," *Applied Nanoscience*, vol. 12, pp. 995-1003, 2021.
23. C. Liu, D. Jiang, G. Xiang, L. Liu, F. Liu, and X. Pu, "An electrochemical DNA biosensor for the detection of Mycobacterium tuberculosis, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle-polyaniline nanocomposite," *Analyst*, vol. 139, pp. 5460-5, Nov 7 2014.
24. C. Gautier, I. López, and T. Breton, "A post-functionalization toolbox for diazonium (electro)-grafted surfaces: review of the coupling methods," *Materials Advances*, vol. 2, pp. 2773-2810, 2021.
25. D. Hetemi, V. Noel, and J. Pinson, "Grafting of Diazonium Salts on Surfaces: Application to Biosensors," *Biosensors (Basel)*, vol. 10, Jan 15 2020.
26. H. Chai, W. Cheng, D. Jin, and P. Miao, "Recent Progress in DNA Hybridization Chain Reaction Strategies for Amplified Biosensing," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, pp. 38931-38946, Aug 25 2021.
27. C. Zhang, J. Chen, R. Sun, Z. Huang, Z. Luo, C. Zhou, et al., "The Recent Development of Hybridization Chain Reaction Strategies in Biosensors," *ACS Sens*, vol. 5, pp. 2977-3000, Oct 23 2020.
28. Y. Du, J. Zhang, P. Peng, H. Su, S. Li, and S. Pang, "Synthesis and characterization of three pyrazolate inner diazonium salts: green, powerful and stable primary explosives," *New Journal of Chemistry*, vol. 41, pp. 9244-9249, 2017.
29. A. Bensghaïer, F. Mousli, A. Lamouri, P. S. Postnikov, and M. M. Chehimi, "The Molecular and Macromolecular Level of Carbon Nanotube Modification Via Diazonium Chemistry: Emphasis on the 2010s Years," *Chemistry Africa*, vol. 3, pp. 535-569, 2020.
30. A. Diarisso, M. Fall, and N. Raouafi, "Elaboration of a chemical sensor based on polyaniline and sulfanilic acid diazonium salt for highly sensitive detection nitrite ions in acidified aqueous media," *Environmental Science: Water Research & Technology*, vol. 4, pp. 1024-1034, 2018.
31. M. Raicopol and L. Pilan, "The Role of Aryldiazonium Chemistry in Designing Electrochemical Aptasensors for the Detection of Food Contaminants," *Materials (Basel)*, vol. 14, Jul 10 2021.
32. H. Yang, W. Xu, X. Liang, Y. Yang, and Y. Zhou, "Carbon nanotubes in electrochemical, colorimetric, and fluorimetric immunosensors and immunoassays: a review," *Mikrochim Acta*, vol. 187, p. 206, Mar 9 2020.