

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Milica N. Sentić

Elektrogenerisana hemiluminiscencija: ispitivanje  
mehanizma i  
njena primena u bioanalitici

**- Doktorska disertacija -**

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Milica N. Sentić

Electrogenerated chemiluminescence:  
from mechanistic insights to bioanalytical  
applications

**- Doctoral Dissertation -**

Belgrade, 2016

Komisija:

---

**dr Dragan Manojlović, vanredni profesor (mentor)**

**Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu**

---

**dr Nešo Šojić, redovni profesor (mentor)**

**Institut za Molekularne nauke,**

**Univerzitet u Bordou, Francuska**

---

**dr Goran Roglić, vanredni profesor**

**Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu**

Datum odbrane:

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je elektrogenerisana hemiluminiscencija (*eng. Electrogenerated chemiluminescence - ECL*) kao i razvoj novih ECL sistema za bioanalitičku primenu. ECL je metoda u kojoj se analitički signal u vidu luminiscentnog zračenja, dobija putem elektrohemijske reakcije indukovane na površini elektorde. ECL omogućava veoma preciznu detekciju u subpikomolarnim opsegu koncentracija sa gotovo nultim pozadinskim signalom. Direktno optičko očitavanje može se izvršiti veoma jednostavno pomoću fotomultiplikatorskih cevi (*eng. photomultiplier tube - PMT*) ili jeftinih CCD (*eng. charge coupled device - CCD*) kamera. Zbog toga se ECL može lako kombinovati sa drugim tehnologijama kao što su mikrofluidni sistemi i kapilarna elektroforeza u cilju dobijanja kompletnog sistema za detekciju. ECL detekcija se široko koristi u komercijalizovanim sistemima. Ova teza ima za cilj proučavanje osnovnih ECL procesa kao i razvoj inovativnih ECL sistema za bioanalitičku primenu.

Prvo poglavlje je posvećeno opštim principima ECL-a. Dva različita mehanizma za generisanje ECL-a (anihilacija i ECL pomoću koreaktanata (*eng. co-reactant*)) su objašnjeni do detalja. Najčešće korišćene ECL luminofore, bazirane na kompleksima rutenijuma, kao i sve vrste korektanata, su takođe opisane. Na kraju, glavne primene elektrohemijske luminiscencije su ukratko prikazane.

U drugom poglavlju, proučavani su ECL mehanizmi zastupljeni u imunotestovima u kojima su platforme za ECL detekciju bazirane na česticama mikrometarskih dimenzija. Ispitan je učinak različitih ECL mehanizama na ukupan intenzitet emitovanog ECL signala. Spektroelektrohemija i ECL snimanje su kombinovani za posmatranje generisanja ECL na nivou jedne mikrosfere, funkcionalizovane kompleksom rutenijuma sa dva koreaktanta, pomoću prostornog mapiranja ECL reaktivnosti. Ovaj novi pristup snimanja ECL signala pruža uvid u ECL mehanističke rute koji omogućavaju izuzetno visoku osetljivost komercijalizovanim biotestovima baziranim na korišćenju mikrosfera/mikroperli.

Treće poglavlje govori o elektrohemijskim osobinama nanoelektroda (*eng. nanoelectrode ensembles - NEEs*), i najnovijem napretku na polju njihove primene u bioelektroanalitičkoj hemiji. Elektrohemijske osobine koje čine NEEs veoma korisnim u razvoju hemijskih

nanosenzora ogledaju se u dramatičnom smanjenju kondenzatorske struje (koje predstavljaju galvnu komponentu pozadinskog signala koje se neminovno javlja pri voltametrijskim merenjima) omogućavajući na taj način visoku osetljivost analitičkog određivanja. Ispitana je primena NEEs od zlata kao platforme za razvijanje nanoimunosenzora uz generisanje ECL signala na niskom oksidacionom potencijalu za dijagnostiku celijakije (*eng. coeliac disease CD*).

U poslednjem poglavlju, opisani su principi bipolarne elektrohemije (*eng. bipolar electrochemistry - BE*). Nedavno je demonstrirana mogućnost korišćenja BE za efikasnu kontrolu kretanja nezavisnih mikročestica, nazvanih „mikro-plivači”, (*eng. ’’micro-swimmers’’*) rušeći simetriju ovih provodnih čestica na bežičan (*eng. wireless manner*) način tj. bez direktnog električnog kontakta sa površinom elektrode. Na taj način omogućeno je da se istovremeno odigraju reakcije oksidacije i redukcije na suprotnim polovima čestica. Strategija za stvaranje pogonske sile za pokretanje „plivača” (za translaciju, rotaciju i levitaciju) oslanja se na proizvodnju i oslobađanje gasa (mehurova vodonika) koji se generiše na katodno polarizovanom delu „mikro-plivača”. Dokazana je mogućnost integracije procesa ECL generisane emisije svetlosti tokom kretanja „plivača”. Ovaj koncept je zatim proširen za razvoj detektujućih „plivača” koristeći ECL kao analitički signal. ECL kuplovana sa BE predstavlja jedinstven analitički pristup koji se bazira na dizajnu „pametnih“ dinamičkih sistema (*eng. smart dinamic systems*) za direktno vizuelno očitavanje.

***Ključne reči:*** elektrogenerisana hemiluminiscencija, 3D ECL prikaz, imunotestovi, skupune nano-elektroda, bipolarna elektrohemija, analitički plivači

Electrogenerated chemiluminescence (ECL) is a process which emits luminiscent signals by converting electrochemical energy into radiative energy. It offers very sensitive detection of sub-picomolar concentrations with an extremely large dynamic range, greater than six orders of magnitude and almost zero background signal. The direct optical readout can be performed just with a photomultiplier tube (PMT) or inexpensive CCD cameras and therefore, easily combined with other technologies such as microfluidics and capillary electrophoresis to obtain complete detection systems. ECL detection is widely used in commercialized systems with an increasing trend. The present thesis is aimed at studying the fundamental ECL process and at developing new ECL systems for original bioanalytical applications.

Chapter one is dedicated to the general principles of ECL. Two different pathways to generate ECL, annihilation and co-reactant ECL, are explained in details. The most used ECL luminophores, based on ruthenium complexes, and co-reactants are also presented. In the last part of this chapter, the principal applications of ECL are briefly described.

In the second chapter, the study of ECL mechanisms used in bead-based immunoassays and their influence on ECL emission were investigated. Spectroelectrochemistry and ECL imaging was combined to observe the ECL generation from a single micro-bead, functionalized with ruthenium complex with two efficient co-reactants, by mapping the ECL reactivity in space. This new imaging approach provides insights into the ECL mechanistic route operating in such a commercialized bead-based bioassays and its extremely high sensitivity.

Chapter 3 addresses the electrochemical properties of nanoelectrode ensembles and arrays (NEEs) with recent advances in bioelectroanalytical applications. The electrochemical characteristic that makes the NEEs very useful in the development of chemical nanosensors is the dramatic lowering of capacitive currents (that are the largest component of the noise, or more properly the background signal of voltammetric measurements) allowing very sensitive detection of analytes of interest. Exploiting both gold NEEs as a sensor platform and generation of ECL at low oxidation potentials, a new sensitive and specific ECL immunosensor for diagnosis of celiac disease (CD) will be presented.

In the last chapter, principles of bipolar electrochemistry (BE) will be presented. This concept has been recently used to control the motion of autonomous microswimmers, breaking the symmetry on the surface of this conductive objects in a wireless manner. The strategy to trigger the motion relies on the generation and release of bubbles and was used for translation, rotation and levitation and it will be described in details. We will present the integration of ECL light

emission process into this mechanism. Furthermore, we expanded this concept to develop sensing swimmers using ECL as an analytical signal. This approach, in which ECL is coupled to BE, offers a unique analytical approach based on the design of smart dynamic systems for a straightforward visual readout.

***Key-words:*** *electrogenerated chemiluminescence, 3D ECL imaging, immunoassays, nanoelectrode ensembles, bipolar electrochemistry, analytical swimmers*

## Lista skraćenica

Skraćenica	Značenje
<b>AFP</b>	alpha-fetoprotein
<b>AgCl</b>	srebro-hlorid
<b>AP</b>	asimetrična čestica
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BDD</b>	dijamant dopovan borom
<b>BE</b>	bipolarna elektrohemija
<b>BPE</b>	bipolarna elektroda
<b>BSA</b>	albumin iz goveđeg seruma
<b>CCD</b>	uređaji sa kuplovanim naelektrisanjem
<b>CE</b>	kapilarna elektroforeza
<b>CL</b>	hemilumescencija
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>CV</b>	ciklična voltometrija
<b>DBAE</b>	2-(dibutilamino)ethanol
<b>DC</b>	gednosmerna struja
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DNA</b>	dezoksiribonukleinska kiselina
<b>DPA</b>	9,10-difenilantracen
<b>EBL</b>	litografija elektronskim snopom
<b>ECL</b>	elektrogenerisana hemilumescencija
<b>EF</b>	električno polje
<b>EM</b>	elektromagnetni



---

<b>EM-CCD</b>	electron-multiplikatorski uređaj sa kuplovanim naelektrisanjem
<b>ET</b>	transfer elektrona
<b>FIA</b>	protočna metoda analize
<b>GC</b>	staklasti ugljenik
<b>GDH</b>	glukoza dehidrogenaza
<b>GLC</b>	gukoza
<b>HER2</b>	recepton za humani epidermalni factor rasta
<b>HOMO</b>	najviša popunjena molekulska orbitala
<b>HPLC</b>	tečna hromatografija visokih performansi
<b>HQ</b>	hidrokinon
<b>HRP</b>	peroksidaza iz korena rena
<b>ICP</b>	indukovano spregnuta plazma
<b>ITO</b>	indijum kalaj oksid
<b>JP</b>	janusova čestica
<b>LECs</b>	elektrohemijska ćelija koja emituje svetlost
<b>LED</b>	diode koja emituje svetlost
<b>MNEAP</b>	platforma za višestruke uređene skupine elektroda
<b>MWCNT</b>	višezidne ugljenične nanotube
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamid adenin dinukleotid
<b>NEA</b>	uređena skupina nanoelektroda
<b>NEE</b>	neuređena skupina nanoelektroda
<b>NP</b>	nanočestica
<b>ox</b>	oksidant
<b>PBS</b>	slani fosfatni pufer
<b>PC</b>	polikarbonat

---

---

<b>PDMS</b>	polidimethylsiloksan
<b>PMMA</b>	poli(metilmetakrilat)
<b>PMT</b>	fotomultiplikatorska cev
<b>PS</b>	polistiren
<b>QD</b>	kvantna tačka
<b>red</b>	reduktant
<b>Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup></b>	rutenium (II) tris(bipiridin)
<b>SA</b>	samoorganizovanje
<b>SAM</b>	samoorganizovani monosloj
<b>SEM</b>	skenirajuća elektronska mikroskopija
<b>TEM</b>	transmisiona elektronska mikroskopija
<b>TPrA</b>	tripropilamin
<b>X-ray</b>	spektroskopija X-zracima

---

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	3
2. OPŠTI DEO.....	4
2.2. Otkriće elektrognerisane luminiscencije i kratak istorijski pregled .....	4
2.3. Osnova.....	4
2.3.1. Fotoluminiscencija.....	5
2.3.2. Hemiluminiscencija .....	7
2.3.3. Elektrognerisana hemiluminiscencija .....	9
2.4. ECL mehanizami .....	9
2.4.1. Anihilacija organskih jona .....	9
2.4.2. ECL neorganskom anihilacijom .....	13
2.5. Put koreaktanta.....	13
2.5.1. ECL sistemi pomoću koreaktanata i njihovi mehanizmi .....	14
2.5.2. ECL Luminofore .....	21
2.6. Primena ECL .....	26
2.6.1. Primene u testovima i komercijalni ECL sistemi .....	26
2.6.2. Primena ECL u CE, HPLC i FIA sistemima.....	30
2.7. Zaključak .....	31
3. REZULTATI I DISKUSIJA .....	33
3.1. Uvid u mehanizame ECL za model sisteme ECL imunotestova putem prostornog mapiranja distribucije svetlosti u prostoru .....	33
3.1.2. Uvod .....	33
3.1.3. Mehanizmi $Ru(bpy)_3^{2+}$ / TPrA Sistema.....	34
3.1.4. Princip rada ECL imunotestova baziranih na korišćenju mikro-perli.....	37
3.1.5. Mehanizmi $Ru(bpy)_3^{2+}$ / DBAE Sistema.....	39
3.1.6. Sendvič ECL imunotest na bazi mikro-perli .....	41
3.1.7. Dvodimenzijalni - 2D prikaz ECL .....	43
3.1.8. Trodimezioni - 3D prikaz ECL .....	45
3.1.9. Zaključak.....	51
3.2. Imunoanalize i mapiranje generisanja ECL sa nasumičnim nanoelektrodnim grupama ..	52
3.2.1. Uvod.....	52
3.2.2. Sintaza neuređenih nanoelektrodnih grupa .....	53
3.2.3. Sintaza uređenih nanoelektrodnih zraka (NEA).....	56

3.2.4. Elektrohemija NEE i NEA .....	56
3.2.6. Viskoosetljivi ECL senzori za biomarkere celijakije .....	62
3.2.7. NEE karakterizacija .....	64
3.2.8. Voltametrijska i ECL karakterizacija imunosenzora .....	66
3.2.9. Studija analitičkih karakteristika imunosenzora .....	70
3.2.10. Zaključak.....	73
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	99
5. ZAKLJUČAK .....	106
6. PREDLOG ZA NASTAVAK ISTRAŽIVANJA.....	108
7. LITERATURA.....	111
8. BIOGRAFIJA.....	121

## 1. UVOD

Elektrogenerisana hemiluminiscencija (ECL) je elektrohemijski proces, u kome je transfer elektrona na površini elektrode praćen emisijom svetlosti<sup>1-4</sup>. ECL je u suštini hemiluminiscencija izazvana elektrohemijskim metodama<sup>5</sup>. Ona predstavlja spoj dve metode: elektrohemije i spektroskopije. Kombinacija ove dve metode (elektrohemije i spektroskopije) omogućava izvesnu superiornost ECL u odnosu na druge optičke metode. S obzirom na to da ECL ne zahteva izvor svetlosti za pobuđivanje elektrona, aparatura za detekciju je pojednostavljena, i što je najvažnije ometajući signal koji potiče od rasute svetlosti i luminiscentnih nečistoća je eliminisan. To omogućavajućava visoku osetljivost analitičkih metoda baziranih na ECL<sup>1,6,7</sup>. Na primer, tris(bipiridin)rutenijum(II),  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , se može detektovati u subpikomolarnim koncentracijama sa izuzetno širokim dinamičkim opsegom neretko većim od šest redova veličine<sup>3</sup>. Pored toga, imajući u vidu, da se pobuđeno stanje luminofore može relativno jednostavno biti kontrolisano menjanjem primenjenog potencijala, obezbeđuje se visoka selektivnost analitičke metode. Ova činjenica, zajedno sa mogućnošću postavljanja optičkih detektora u neposrednu blizinu površine elektrode omogućava preciznu prostornu i vremensku kontrolu nad reakcijom. Emisija svetlosti može se odložiti kontrolisanjem njene inicijacije sve dok se imuno ili enzimske katalizovane reakcije ne odigraju<sup>1</sup>. Konačno, ECL omogućava istovremeno merenje dva eksperimentalna parametra, intenzitet emitovane svetlosti i faradejsku struju, u funkciji od potencijala, što olakšava ispitivanje mehanizma emisije ECL-a i omogućava istovremenu ECL i elektrohemijsku detekciju. Upravo zbog ovih osobina, ECL je postala važan metod detekcije u analitičkoj hemiji. Komercijalni imunotestovi i deoksiribonukleinski DNK testovi se široko koriste u oblasti kliničke dijagnostike, testiranju vode i hrane, monitoringu životne sredine, otkrivanju agensa koji se koriste u biološkim ratovima kao i u fundamentalnim naučnim istraživanjima<sup>1</sup>. ECL je takođe korišćena za određivanje mnogobrojnih analita kombinovanjem tečne hromatografije (*eng. high performance liquid chromatography - HPLC*), protočnih metoda analize (*eng. flow injection analysis-FIA*) i kapilarne elektroforeze (*eng. capillary electrophoresis- CE*)<sup>8-12</sup>.

S obzirom na to da je rad predstavljen u ovoj doktorskoj tezi baziran na izučavanju ECL mehanizama i ECL detekcije, principi ECL kao i njena praktična primena će biti opisani u opštem delu.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.2. Otkriće elektrogenerisane luminiscencije i kratak istorijski pregled

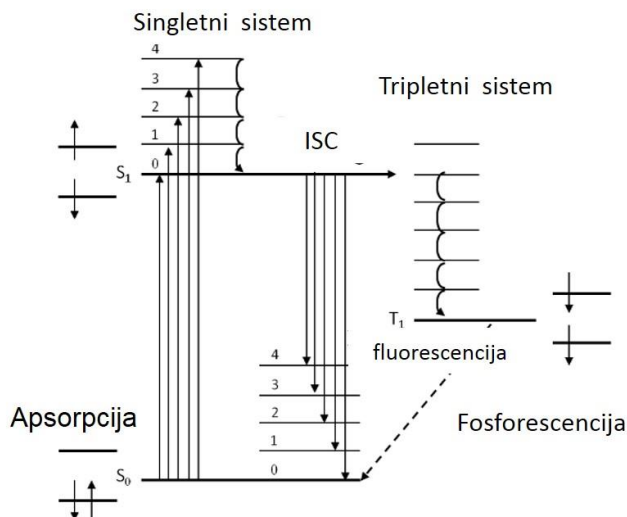
ECL je naučnoj zajednici prvi put predstavljena kao emisija svetlosti usled relaksacije molekula iz pobuđenog stanja nastalog usled elektrohemijски iniciranog procesa<sup>13</sup>. Prvi radovi vezani za elektrohemijско generisanje svetlosti datiraju sa početka dvadesetog veka<sup>14,15</sup>. Prve detaljne studije o ECL počele su 60-tih godina prošlog veka, na temu luminiscencije aromatičnih ugljovodonika i organometalnih jedinjenja<sup>16-18</sup>. Prvi eksperimenti izvedeni primenom naizmjenične struje izvedeni su sa ciljem otkrivanja mehanizam ECL i prve teorije o prenosu elektrona u ECL procesu<sup>19</sup>. 1972. godine objavljeno je da Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> emituje svetlost tokom snimanja cikličnog voltamograma na platinskoj elektrodi sa maksimumom emisije na istoj talasnoj dužini kao i prilikom spektroskopskog pobuđivanja molekula (tzv. fotoekscitacijom)<sup>20</sup>. Osim toga, organometalna jedinjenja zbog njihove ECL prirode smeštena su u sam centar interesovanja na polju dizajniranja novih ECL-emitujućih hemijских vrsta. Nadalje, 1997. godine je uočena karakteristična ECL emisija tokom istovremene oksidacije oksalata i nekih fluorofora kao što je ruben, 9,10 – difenilantracen i bpiridil helati rutenijuma (II) i osmiuma (II)<sup>21</sup>. ECL emisija pri jednosmernom linearnom skeniranju elektrodnog potencijala u prisustvu luminofore i molekula koreaktanata je predstavljala veoma važan korak u daljem razvoju ECL metode i boljem razumevanju principa iste. Deset godina kasnije alifatični amini su se pokazali kao veoma efikasni koreaktanti, od kojih je tri-n-propilamin proglašen za jedan od najefikasnijih koji je ostao u upotrebi sve do današnjih dana<sup>5,22</sup>. Primena ECL u biotestovima s početka 1990-ih godina igrala je veliku ulogu u komercijalizaciji ECL metode i njenoj instrumentalizaciji 1994. godine. Zahvaljujući visokoj osetljivosti i dobroj selektivnosti, ECL kao veoma značajna analitička tehnika se danas eksploatiše u više od 30 000 instrumenata širom sveta<sup>1,2,6</sup>.

### 2.3. Osnova

ECL je jedna od mnogih oblika luminiscencije (emisije svetlosti) koja je izazvana elektrohemijском reakcijom na površini elektrode. Da bismo razumeli princip ECL emisije i da bi je razlikovali od drugih vrsta luminiscencija, principi fotoluminiscencije (*eng. photoluminiscence* - PL) i hemiluminiscencije (*eng. chemiluminiscence* CL) će biti objašnjeni u daljem tekstu.

### 2.3.1. Fotoluminiscencija

Fotoluminiscencija je emisija svetlosti usled relaksacije molekula u pobuđenom stanju nakon apsorpcije fotona (elektromagnetnog zračenja). Apsorpcija energije se javlja između bliskih vibracionih i rotacionih energetske nivoa različitih molekulskih orbitala u pobuđenom stanju. Različita energetska stanja su dostupna molekulu i prelazi između njih su ilustrovani Jablonski dijagramom energetske nivoa na **Slici 1**. Slika prikazuje elektronske i vibracione nivoe (rotacioni energetske nivoi nisu prikazani)<sup>23</sup>. Jednom kada molekul apsorbuje energiju u vidu elektromagnetnog zračenja, postoji veliki broj relaksacionih mehanizama pomoću kojih se može vratiti u prvobitno osnovno stanje (na slici obeleženo sa  $S_0$ ). Osnovno stanje najvećeg broja molekula je singletno (na slici obeleženo sa  $S_1$ ), što znači da su molekuli upareni u nulti rezultujući spin. Ukoliko se emisija fotona javi između stanja istog spina (npr. prvo pobuđeno singlet stanje  $S_1 \rightarrow S_0$ ) onda se taj proces naziva fluorescencija. Drugo pobuđeno stanje na nižem energetske nivou od prvog pobuđenog singleta je triplet stanje  $T_1$ , sa rezultujućim spinom 1. U slučaju kada je stanje spina početnog i krajnjeg energetske nivoa različito (npr.  $T_1 \rightarrow S_0$ ), emisija je nazvana fosforescencija. Prelaz između singleta i tripleta se naziva intersistemski prelaz (*eng. inter-system crossing, ISC*). Mala verovatnoća ISC – a proizilazi iz činjenice da molekuli prvo moraju proći spin konverziju kako bi proizveli nesparene elektrone, što je energetske i samim tim kinetički nepovoljan proces. Za razliku od fluorescencije, re-emisija fotona je usporena energijom udruženih pobuđenih elektrona u „zabranjenom” stanju. Dužina trajanja fluorescencije je veoma kratka ( $1 \times 10^{-6}$  do  $10^{-9}$  sekundi), dok je fosforescencije je duža ( $1 \times 10^{-3}$  sekundi).



**Slika1.** Jablonski dijagram energetskih nivoa tokom apsorpcionog i emisionog zračenja

Različite fluorofore mogu apsorbovati svetlost različitih talasnih dužina s tim što svaka fluorofora apsorbuje svetlost specifične talasne dužine. Ovaj proces je određen energetskom razlikom između različitih energetskih stanja molekula što se može videti u njihovim ekscitacionim spektrima. Shodno tome, one imaju specifičan spektar re-emisije svetlosti, pod nazivom emisioni spektar. Talasna dužina maksimalne ekscitacije (~apsorpcije) i emisije (npr. apsorpcija/emisija = 485 nm/517 nm) su pojmovi koji se odnose na datu fluoroforu. Pošto su elektronski prelazi indukovani elektromagnetnim zračenjem, okarakterisani frekvencijom  $\nu$  i polarizacijom<sup>23</sup>. Ovo daje informaciju o prostornoj usmerenosti električnog polja. Dok se elektroni kreću od ekscitovanog stanja do osnovnog stanja oni gube vibracionu energiju. Količina energije koju polje zračenja može da razmeni sa materijom je:

$$E = h\nu \quad (1)$$

Obično izražena u kJ/mol, eV/molekul, gde je  $h$  Plankova konstanta ( $6.626 \cdot 10^{-34}$  Js),  $\nu$  je frekvencija (Hz). Uobičajeno je i koristiti veličine proporcionalne  $E$ , kao što je talasna dužina svetlosti:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2)$$

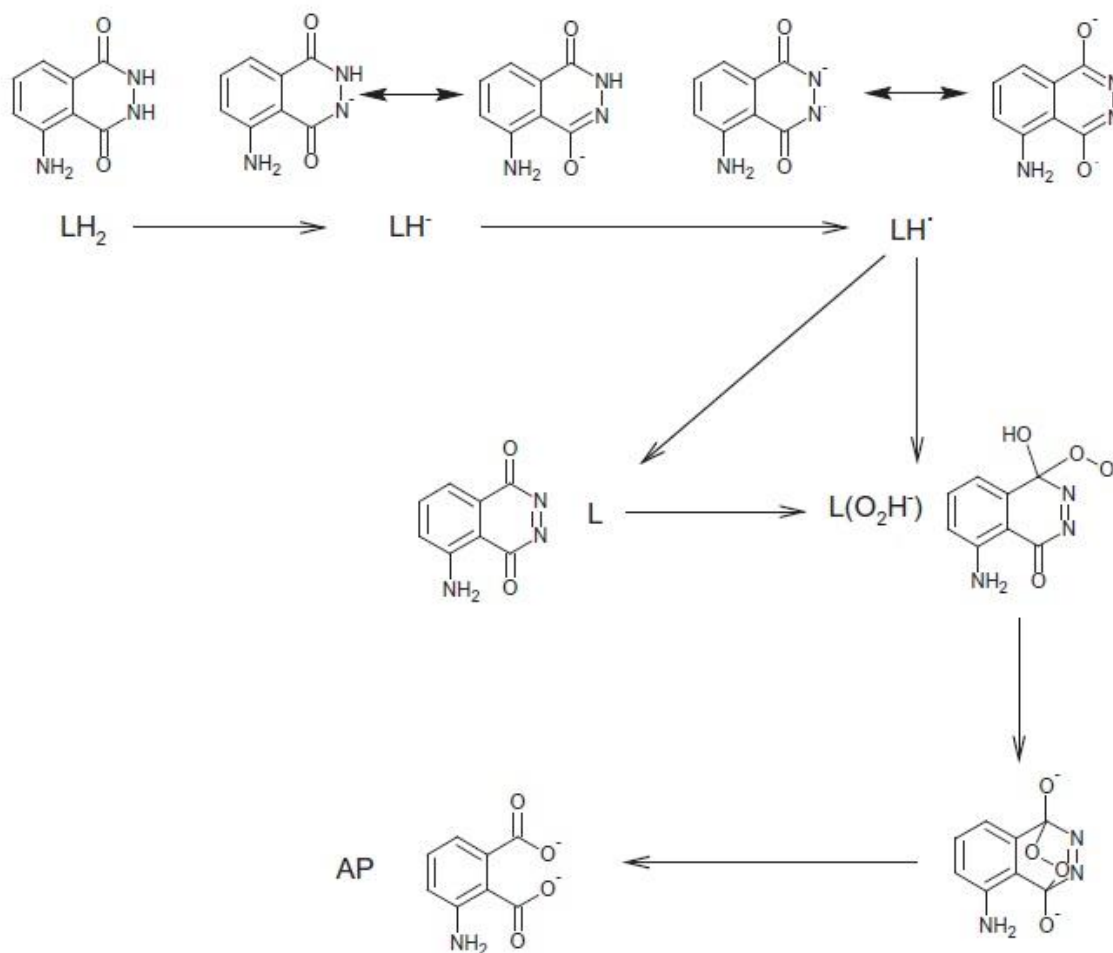
gde je  $c$  brzina svetlosti u vakuumu ( $2.99 \cdot 10^8$  m/s) i  $\lambda$  talasna dužina emisije (m). U apsorpcionom i emisionom spektru, intenzitet svetlosti je dat u funkciji jedne od karakteristika koje karakterišu energiju fotona. Prva jednačina povezuje položaj posmatranih spektralnih pikova sa energetskom razlikom između početnog i krajnjeg stanja molekula tokom



spektroskopskog prelaza. Očigledno, energija emisije je manja od energije ekscitacije i talasna dužina ekscitacije je veća u poređenju sa talasnom dužinom apsorpcije. Razlika između talasnih dužina maksimalne ekscitacione i maksimalne emisije naziva se Stoksov pomeraj. Na primer, kompleks  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  izložen beloj svetlosti apsorbuje plavu svetlost ( $\lambda_{\text{apsorpcije}} = 450 \text{ nm}$ ) koja omogućava pobuđivanje elektrona. Iz tog razloga kompleks je naradžasto – crvene boje ( $\lambda_{\text{emisije}} = 610 \text{ nm}$ )<sup>4</sup>.

### 2.3.2. Hemiluminiscencija

Hemiluminiscencija je homogen proces u poređenju sa ECL – om, u kojome se emisija svetlosti ostvaruje uz pomoć visoko – energetske elektron – transfer reakcije između dve reagujuće vrste. Reakcija se odigrava u homogenoj fazi<sup>24</sup>. Pored toga, mnoge konvencionalne hemiluminiscentne reakcije mogu biti inicirane elektrohemijski. Najproučavanija i korišćena reakcija je ona sa luminolom (**Slika 2.**). CL reakcija sa luminolom je oksidaciona reakcija koja se može odvijati u aprotičnim (dimetilsulfoksid (DMSO), N,N – dimetilformamid) kao i u protičnim rastvaračima (voda, niži alkoholi)<sup>27</sup>. Oksidacija u vodenim sistemima dovodi do emisije plave svetlosti na  $424 \text{ nm}$ <sup>28</sup>, dok u aprotičnim se premešta ka žuto – zelenom delu spektra. Luminol ( $\text{LH}_2$ ) se može posmatrati kao diprotonska kiselina. Za indukovanje hemiluminiscentne reakcije luminola u vodenim rastvorima, neophodno je prisustvo hemijskih oksidanasa kao što je npr. vodonik-peroksid. U baznoj sredini (pH 11 – 13) najzastupljenija forma luminola je luminol anjon ( $\text{LH}^-$ ) koji se lako može oksidovati do luminol anjon radikala ( $\text{LH}^{\bullet-}$ ). Ova reakcija se može izvesti i pomoću drugih jednelektronskih oksidanasa kao što su: peroksidaza izolovana iz korena rena kao i metali poput kobalta, bakra, mangana, gvožđa itd.). U narednom koraku oksidacije,  $\text{LH}^-$  se dalje oksiduje do aminodiazakinona (L) ili direktno (uz pomoć superoksidnog anjona) do hidroperoksidnog adukta ( $\text{LO}_2\text{H}$ ). Iz ovog adukta (međuproizvoda) može se formirati endoperoksidna vrsta, iz koje se usled izdvajanja azota generiše pobuđeno stanje: 3 – aminoftalat dianjona (AP).



**Slika 2.** Mehanizam CL luminol oksidacije<sup>25</sup>.

U poređenju sa ECL reakcijama, način da se postigne pobuđeno stanje je različito, ali su proces relaksacije i mehanizam emisije svetlosti isti. Mehanizam ECL biće detaljno obrađen u poglavlju 2.3.3. Međutim, u CL reakcijama emitujuća vrsta je pobuđen hemijski produkt, tako da se originalni CL reagens ne može ponovo stvoriti. Molekuli, kao što su kompleksi rutenijuma, koji mogu biti ponovo regenerisani nakon emisije fotona, pokazali su se kao pogodniji luminiscentni reagensi i zbog toga su glavni konkurenti luminolu u polju elektroanalitičke hemije. Na primer,  $Ru(bpy)_3^{2+}$  je stabilna vrsta u rastvorima dok se njegov reaktivan oblik,  $Ru(bpy)_3^{3+}$ , može lako proizvesti oksidacijom  $Ru(bpy)_3^{2+}$ .  $Ru(bpy)_3^{3+}$  može reagovati sa analitima koji sadrže tercijarne, sekundarne i primarne alkil-amino grupe i formirati pobuđeno stanje  $Ru(bpy)_3^{2+*}$ , koje će tokom relaksacije u osnovno energetska stanje emitovati žuto – narandžastu svetlost<sup>22</sup>. Zbog toga, u ECL reakcijama, rutenijumovi kompleks se regenerišu posle emisije svetlosti što ECL metodologiju čini veoma interesantnom sa analitičkog stanovišta.

### 2.3.3. Elektrogenisana hemiluminiscencija

ECL je kontrolisani oblik hemiluminiscencije pri kome je emisija svetlosti inicirana reakcijom elektronskog transfera koji se odvija na površini elektrode. Sistem koji je najčešće korišćen u analitičke svrhe se sastoji od luminofornih vrsta  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , ili jednog od njegovih derivata, sa tri-*n* -propilaminom kao koreaktantom. ECL reakcija se može kontrolisati s obzirom na to da se ECL reagensi generišu *in situ* na elektrodi promenom primenjenog elektrodnog potencijala, najčešće korišćenjem ciklične voltometrije ili hronoamperometrije. Aktivirane vrste formirane tokom oksidacije luminofore i ko-reaktanta mogu dalje međusobno reagovati pri čemu dolazi do formiranja ekscitovanog stanja  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  i usled toga ECL emisije. Zapravo, mehanizam predstavljene ECL reakcije je mnogo kompleksniji i predstavlja oblast aktivnog istraživanja<sup>26-29</sup>. Mehanizmi putem kojih se ostvaruje ECL će biti detaljno opisani u paragrafu 2.4.

### 2.4. ECL mehanizmi

Anihilacija i putevi koreaktanata su dva glavna načina preko kojih se može ostvariti ECL. Iako je analitički značaj ECL-a baziranog na upotrebi koreaktanata prepoznata i iskorišćena u velikoj meri, prva prva studija ECL je bila bazirana na anihilaciji jona.

#### 2.4.1. Anihilacija organskih jona

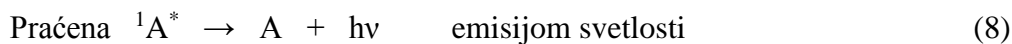
Visokoenergetske reakcije transfera elektrona između elektrohemijski generisanih jon-radikala aromatičnih ugljovodonika ili njihovih derivata, proizvedenih u potencijalnom koraku (*eng. potential step*) ili zamahu (*eng. sweep*), praćeni su emisijom svetlosti usled relaksacije pobuđenog stanja<sup>1,2</sup>. Zbog nedovoljne rastvorljivosti aromatičnih ugljovodonika u vodenim sistemima, ove reakcije se odigravaju u organskim rastvaračima u prisustvu pomoćnog elektrolita kao što je tetrabutilamonijumova so. Opšti mehanizam anihilacije organskih jona može de predstaviti kao:



Ili



ili



gde je A aromatični ugljovodonik a B je isti ili neki drugi aromatični ugljovodonik,  ${}^1A^*$  je singleto a  ${}^3A^*$  je tripletno pobuđeno stanje. Ako se potencijal radne elektrode brzo menja između dve različite vrednosti, vrsta A se može oksidovati do  $A^+$  (izraz 3) a vrsta B redukovatido  $B^-$  (izraz 4) na istoj elektrodi. Ove elektrohemijske reakcije se odigravaju u Nernstovom difuzionom sloju što rezultuje formiranjem pobuđenog stanja  $A^*$ , a time i prateću emisiju svetlosti (izraz 8)<sup>2</sup>. U zavisnosti od energije raspoložive u procesu anihilacije, proizvedene  $A^*$  vrste mogu biti ili u najnižem pobuđenom singletnom  ${}^1A^*$  ili tripletnom stanju  ${}^3A^*$ . U sistemima koji poseduju dovoljnu količinom energije, proces emisije svetlosti je definisan kao “S–put” (formacija pobuđenog singleta je opisana reakcijama (3) – (5)). Većina ECL sistema baziranih na aromatičnim jedinjenjima prati ovaj mehanizam. Iz redoks potencijala u jednačinama 3 i 4, entalpija koja je u direktnoj vezi sa energijom iz jednačine 5 se može izračunati putem jednačine date u izrazu 9<sup>1</sup>:

$$-\Delta H_{\text{ann}} = \Delta G + T\Delta S = E_p(A/A^+) - E_p(A/A^-) - 0.16 \quad (9)$$

$-\Delta H_{\text{ann}}$  (u eV) je entalpija jon anihilacije,  $E_p$  je pik potencijala za elektrohemijsku oksidaciju ili redukciju. Vrednost od 0.16 eV je data za aproksimativni faktor entropije ( $T\Delta S$ ) koji je procenjen na ~0.1 eV sa dodatkom od 0.057 eV kao rezultatom razlike između dva elektrodna potencijala pika reverzibilnog elektrohemijskog sistema. Ukoliko je entalpija anihilacije veća od energije potrebne za dobijanje najnižeg pobuđenog singlet stanja ( $E_s$ ), moguće je direktno generisati  ${}^1A^*$ , što je slučaj za „S – put”.

Nasuprot tome, u energetski deficitarnim sistemima će tripletno energetsko stanje  ${}^3A^*$  prvenstveno biti sintetisano (izraz 7). Iz narednog koraka anihilacije  ${}^3A^*$  (triplet – triplet anihilacije), može se sintetisati  ${}^1A^*$  stanje. Za ovakve sisteme se kaže da prate tzv. „T – put”. To znači da je  $-\Delta H_{\text{ann}}$  po vrednosti niža od energije singletnog pobuđenog stanja  $E_s$ , ali istovremeno viša od energije tripletnog pobuđenog stanja ( $E_t$ ). Emisija iz tripletnog stanja se retko sreće jer je prelazak iz tripletnog do nižeg singletnog generetskog stanja kvantnomehanički „zabranjen” prelaz.

Jedan od prvih proučavanih ECL sistema predstavlja klasičan primer sistema koji poseduje dovoljnu količinu energije („S–put”) i obuhvata 9,10 difenilantracen (DPA) u dimetilformamidu (DMF) primenom naizmeničnog potencijala.<sup>23</sup> U prvim eksperimentima, radne elektrode su bile platinske koaksijalne spirale ili par paralelno postavljenih planarnih elektroda od zlata (folija od zlata). Tokom promene potencijala oksidacija i redukcija DPA se dešavala na površini elektroda. Formirani  $\text{DPA}^+$  i  $\text{DPA}^-$  reaguju međusobno, što je dovodi do emisije svetlosti.



Anodni i katodni procesi DPA su ispitani cikličnom voltametrijom pri čemu je uočen redukcionni pik na  $-1.95 \text{ V}$  i oksidacioni pik na  $+1.25 \text{ V}$  (vrednosti elektrodnih potencijala su date vs. SCE). U skladu sa ovim rezultatima primenom jednačine (9), moguće je izračunati vrednost entalpije elektron–transfer procesa i on iznosi  $3,04 \text{ eV}$ . Kada se ova vrednost uporedi sa energijom emitovane svetlosti na  $435$  i  $410 \text{ nm}$  ( $2,85$  i  $3,02 \text{ eV}$ ), može se zaključiti da je emisiono stanje direktno ostvarivo<sup>1</sup>.  $\text{DPA}^*$  se može direktno nastaniti (popuniti) tako da prati S–put.

Tipičan primer triplet – triplet anihilacije (T – put) je DPA/TMPD (TMPD = N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin) ECL sistem, generisan iz dva različita prekursora. ECL se ostvaruje preko „unakrsne reakcije” između anjon radikala DPA i katjon radikala N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD) u DMF-u<sup>30-32</sup>.

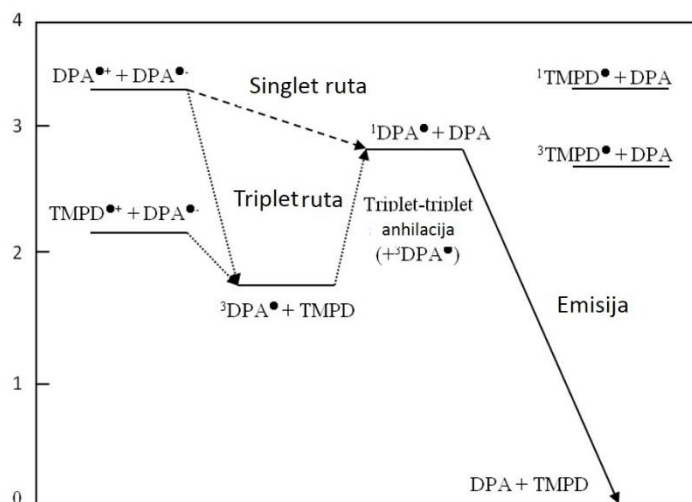


Entalpija reakcije elektronskog transfera je  $1.97 \text{ eV}$  što predstavlja vrednost manju od one koja je potrebna za postizanje emitujućeg singletnog stanja DPA ( $3.02 \text{ eV}$ ). Međutim, emitovana

svetlost generisana preko ECL je identična DPA fotoluminiscenciji što ukazuje na to da je DPA\* krajnji proizvod objedinjenog transfera<sup>31</sup>. Kao rezultat singlet pobuđeno stanje nije moguće postići direktno, već isključivo preko triplet–triplet anihilacije pri kojoj je energija elektron–transfer reakcije iskorišćena za obezbeđivanje dovoljne količine energije (jednačina 18)<sup>33</sup>.



Ukoliko je entalpija elektron – transferne reakcije znatno niza od energije singletnog pobuđenog stanja, T – put može doprineti formiranju  ${}^1\text{A}^*$  kao dodatak S – putu. Taj fenomen je poznat kao „ST–put”. Tipičan primer je rubren anjon–katjon anihilacija<sup>34</sup>.



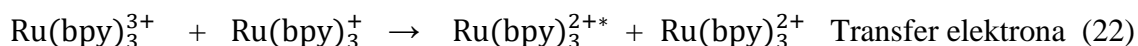
**Slika 3.** Dijagram energetske nivoa DPA-DPA i TMPD-DPA ECL sistema<sup>4</sup>.

Uprkos što je često korišćena u elektrohemijским ćelijama koje emituju svetlost (*eng. light-emitting electrochemical cells, LECs*) i najčešće proučavanom slučaju ECL, prema mehanizmu i prirodi pobuđenog stanja, ECL generisana anihilacijom nije našla značajnu primenu u analitici<sup>3</sup>. Uglavnom, to je zbog činjenice što se ove reakcije odvijaju u organskim rastvaračima kao što su acetonitril, dimetil-sulfoksid i metilhlorid. Radeći u aprotičnim rastvaračima raspon potencijala jednog elektrohemijskog sistema bi trebalo da bude dovoljno širok (od 3.3-2 V) (izraz 9) da bi se dobio ECL signal, ali istovremeno voda i rastvoreni kiseonik moraju biti u potpunosti isključeni kako bi se sprečilo gašenje ECL reakcije (*eng. quenching*).

Zbog svega navedenog, elektrohemijske ćelije i elektrode moraju biti konstruisane tako da je dotok rastvarača moguć, zatim degaziranje primenom visokog vakuuma ili da je moguće raditi u inertnoj atmosferi (*eng. glove-boxes*)<sup>2</sup>. Nadalje, poželjno je stvaranje oba radikala (anjonskog i katjonskog) na površini elektrode. Za singletne sisteme polazne vrste u ovom tipu reakcije moraju proći oksidaciju i redukciju unutar opsega potencijala koji je moguće primeniti u datom rastvaraču. Jednom formirani, jon-radikali moraju biti postojani dovoljno dugo kako bi se omogućila njihova difuzija, međusobna kolizija i u krajnjem koraku transfer elektrona.

#### 2.4.2. ECL neorganskom anihilacijom

Rutenijom(II)tris(2,2'-bipiridin),  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , je neorgansko jedinjenje, najčešće proučavana i korišćena ECL-luminofera i pored toga što je poznato da je moguće generisati ECL korišćenjem širokog spectra različitih neorganskih kompleksa i klastera<sup>35</sup>. Razlog leži u činjenici da je korišćenjem rutenijumovog kompleksa moguće ostvariti ECL sa visokom efikasnošću u vodenim puferskim sistemimam na lako dostižnom potencijalu na sobnoj temperaturi sa visokom efikasnošću. Ovo jedinjenje daje ECL, prateći „S put” analogno načinu na koji to čine prethodno navedeni aromatični ugljovodonici. To se može prikazati pomoću sledećeg mehanizma:



Upotreba ovog kompleksa u analitičke svrhe proizilazi iz činjenice da jedinjenja koja mogu da reaguju kao redukciona sredstva i sposobna su da zamene elektron-transfer korak jesu potencijalni analiti koji proizvode ECLsamo na anodi.

#### 2.5. Put koreaktanta

ECL tehnologija uz pomoć koreaktanata je suštinski deo svih komercijalno dostupnih ECL analitičkih instrumenata. Pronalaženje novih koreaktanata sa viskom ECL efikasnošću za biotestove je stalna pokretačka snaga u ovoj oblasti. Put koji u ECL mehanizmu prati koreaktant je u osnovi elektrohemijski proces (E) praćen uzastopnom hemijskom reakcijom (C)

što je u literaturi poznato kao EC mehanizam. Koreaktant je vrsta koja je u sistem uvedena sa namerom da posle izvršene oksidacije ili redukcije na površini elektrode reaguje sa ECL luminoforama i na taj način ih prevede u pobuđeno stanje. Za razliku od jon-anihilacionog ECL-a, ECL generisan pomoću koreaktanata je više pogodna za rad ne samo u vodenom medijumu već i u fiziološkim uslovima (pH 7.4). Najveći broj primenjenih ECL tehnika se bazira na ECL pomoću koreaktanata.

Glavna prednost u odnosu na ECL anihilacijom koja zahteva generisanje i oksidovanog oblika,  $A^+$  i redukovanog oblika  $B^-$ , je da put koreaktanta određen transferom elektrona između koreaktanta i oksidovanog  $A^+$  ili redukovanog  $B^-$  oblika. Kao rezultat, za ECL emisiju je karakterističan korak jednosmernog potencijala gde su reagensi ili oksidovani ili redukovani. U zavisnosti od polariteta primenjenog potencijala, i luminofora i koreaktant mogu biti prvo oksidovani ili redukovani što dovodi do anodne ili katodne ECL emisije respektivno. Intermedijarno formirani radikali se kasnije raspadaju formirajući snažne redukcionne ili oksidacione vrste. Ove vrste reaguju sa oksidovanim ili redukovanim luminoforama pri čemu dolazi do stvaranja eksitovanog stanja koje emituju svetlost<sup>1</sup>. Zbog svega navedenog, ECL se može jednostavno nazvati „oksidativna – redukcija” za anodnu ECL emisiju i „redukciona – oksidacija” za katodnu emisiju (detaljnije o ovome u 2.5.1.1. i 2.5.1.2.).

Uzimajući u obzir generisanje ECL pomoću jedno-potencijalskog koraka, ECL pomoću koreaktanata je lakše primenljiva nego ECL anihilacijom. Pre svega olakšano je generisanje ECL u vodenim rastvorima, otvarajući širok spektar mogućnosti za korišćenje ECL u oblasti hemijske analize. U ovom slučaju ne postoji potreba za primenom širokogopsega potencijala, te stoga drugi rastvarači sa uskim prozorom potencijala i vodeni rastvori mogu biti korišćeni. Drugo, gašenje signala koje je izazvano prisustvom kiseonika u rastvoru ne utiče značajno na smanjenje intenziteta ECL signala, tako da je ECL analiza efektivna i bez prethodnog uklanjanja rastvorenog kiseonika. Konačno, upotrebom koreaktanata moguće je korišćenje luminofora koja podležu procesu elektrohemijski reverzibilne oksidacije ili redukcije, dok jedinjenja koja se koriste u ECL anihilaciji moraju proći kroz oba elektrohemijška procesa.

### **2.5.1. ECL sistemi pomoću koreaktanata i njihovi mehanizmi**

ECL koreaktant je reagens koji se posle oksidacije i redukcije razlaže formirajući visoko reaktivne oksidacione ili reduktivne vrste koje lako mogu ostvariti elektron-transfer sa



oksidovanim ili redukovanim oblikom luminofore generišući na taj način ECL, kao što je objašnjeno u gore navedenom pasusu.

Da bi ECL uz pomoć reaktanata bila efikasna potrebno je ispuniti brojne kriterijume koji uključuju rastvorljivost, stabilnost, odgovarajuće elektrohemijske osobine, kinetiku, “quenching efekat”, ECL šum, i mnoge druge.<sup>45</sup> Tipični ECL koreaktanti dati su u tabeli 1.

**Tabela 1.** Tipični ECL koreaktant sistemi

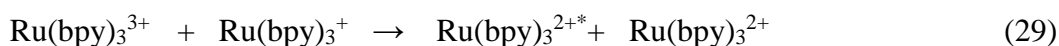
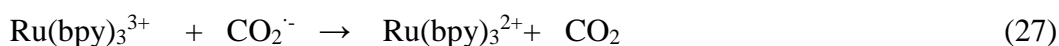
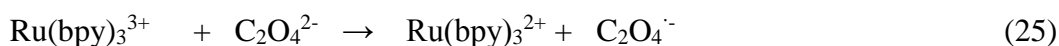
Tipični ECL koreaktanti	Luminofore	Koreaktanti	Glavni koreaktanti intermedijeri
„Oksidaciono-redukциони”	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	oksalat	$\text{CO}_2^{\cdot -}$
	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	piruvat	$\text{CH}_3\text{CO}^{\cdot}$
	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	tri-(n)popilamin	$\text{TPrA}^{\cdot +}$ , $\text{TPrA}^{\cdot}$
„Redukciono-oksidacioni”	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	hidrazin	$\text{N}_2\text{H}_2$ , $\text{N}_2\text{H}_3^{\cdot}$
	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	persulfat	$\text{SO}_4^{\cdot -}$
	aromatični ugljovodonici	benzoil peroksid	$\text{PhCO}_2^{\cdot}$
	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	vodonik-peroksid	$\text{OH}^{\cdot}$

Prvi slučaj generisanja CL reakcijom  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  i alifatičnih amina opisali su Nofsinger i Danielson<sup>24</sup>. Mehanizam reakcije je objašnjen oksidacijom alifatičnih amina pomoću  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  koja je dovela do formiranja kratko živećih radikal katjona. Tako sintetisani radikal katjoni u narednom stupnju reakcije gube proton stvarajući slobodne radikale. Ovaj slobodni radikal potom može redukovati  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  do pobuđenog nižeg oksidacionog stanja  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ . Ideja da se reaktanti u prethodno navedenom mehanizmu reakcije mogu elektrohemijski generisati, omogućila je Lelandu i Powellu da pronađu i objave ECL reakciju zasnovanu na TPrA i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .<sup>5</sup> Eksperiment je izveden na elektrodi od zlata u puferovanom rastvoru TPrA i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na fiziološkom pH uz istovremeno snimanje ECL krive i cikličnog voltamograma. Nadalje, veliki pomak je napravljen na polju korelisanja efikasnosti ECL-a sa koreaktantima sa hemijskom strukturom korišćenih amina. Važan preduslov za uspešno generisanje ECL je da amin ima atom vodonika na alfa ugljenikovom atomu kako bi nakon oksidacije novoformirani radikal mogao da podleže reakciji deprotonovanja i da na taj način

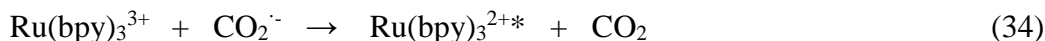
formira slobodni radikal jake redukcijske moći. Generalno, pokazano je da se intenzitet ECL-a povećava po sledećem redosledu: primarni, sekundarni, tercijarni amin, respektivno<sup>5,24,63,86</sup>. Efikasnost svih drugih ECL sistema je poređena sa efikasnošću Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/TPPrA sistema koji se zbog toga uzima kao standard za ECL.

### 2.5.1.1. Oksalat (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>) Sistem, primer oksidaciono-reduktivne ECL

Bard i saradnici su otkrili oksalat jon kao prvi ECL koreaktant<sup>21,36-40</sup>. Oni su pokazali da nano-čestice silicijum dioksida (SiNPs) mogu postići veći nivo emisije ECL dodavanjem C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> u višku. Prvi eksperiment je izveden u acetonitrilu a kasnije u vodenim rastvorima. U vodenom rastvoru, Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> je prvo oksidovan do Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, nakon primene anodnog potencijala što predstavlja primer ECL bazirane na tzv. „oksidativnoj-redukciji”. Ovaj katjon je sposoban da oksiduje oksalatne jone u difuznom sloju u neposrednoj blizini površine elektrode i da na taj način formira oksalatniradikal-anjon CO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Oksalatni radikal-anjon podleže razlaganju pri čemu dolazi do formiranja visoko-reduktivnog radikal anjona ugljen-dioksida i molekuskog ugljen dioksida. U ovoj reakciji, ekscitovano stanje je posledica direktne redukcije Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> radikalom C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>, ali takođe može nastati i putem mehanizma anihilacije. ECL mehanizam ovog sistema je prikazan u nastavku:

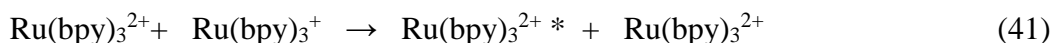
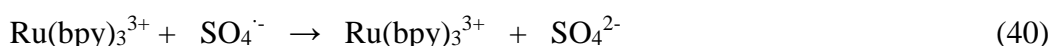
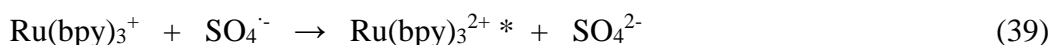
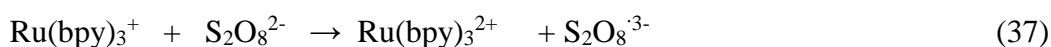
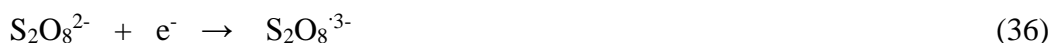


U predhodnom slučaju oksalatne vrste su oksidovane katalitički. U acetonitrilu oksalat se može oksidovati direktno na površini elektrode što mehanizam ECL čini znatno jednostavnijim.<sup>8</sup> Oksalat (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>) je oksidovan u oksalat radikal anjon (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>), koji se razlaže na redukcionu radikal anjon (CO<sub>2</sub><sup>-</sup>), koji nadalje reaguje sa Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> pri čemu dolazi do formiranja ekscitovanog stanja.



### 2.5.1.2. Peroksidisulfat ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ) Sistem, primer redukciono-oksidacione ECL

Persulfat je prvi primer takozvane „redukciono-oksidacione” ECL sa koreaktantom proizvedenim primenom katodnog potencijala<sup>41</sup>. Usled nestabilnosti  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  u vodenim rastvorima, slabe rastvorljivosti  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  u acetonitrilu kao i zbog intenzivne redukcije vode, reakcija je izvedena u smeši acetonitrila i vode. Primenom katodnog potencijala,  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  može biti redukovan direktno na površini elektrode ali i katalitički pomoću  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ . Potonja reakcija dovodi do formiranja  $\text{S}_2\text{O}_8^{\cdot 3-}$  koji se nakon toga razlaže na intermedijerni  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  radikal-anjon. Zbog jake oksidacione moći, intermedijerni  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  reaguje sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  oksidujući ga do ekscitovanog stanja<sup>42</sup>. Druga moguća reakcija je oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  do  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  uz anihilaciju pri čemu nastaje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ .



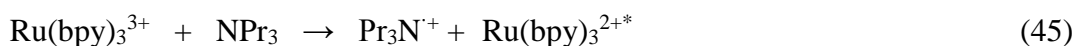
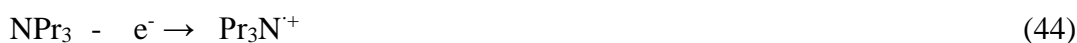
### 2.5.1.3. Tri-n-propilamin/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>Sistem, model ECL sistem

Među organskim aminima TPrA je model koreaktant za anodne ECL sistemeu kojima se svetlost u sistemu generiše putem „oksidativne-redukcije”<sup>5,22</sup>. Sistem koji se sastoji od Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (ili njegovih derivata) i TPrA kao koreaktanta u stanju je da ostvari visoku ECL efikasnost što je dovelo do toga da postane “zlatni standard” zakomercijalne ECL imunotestovei testove za analizu DNK<sup>1,6,42</sup>. Razumevanje kompleksnog mehanizma ECL reakcije je oblast aktivnog istraživanja<sup>5,22,26,27,29,43-45</sup>. Prema prvim saopštenjima Lelanda i Powella o ECL emisiji izRu(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/TPrA sistema predložen je mehanizam koji se može pojednostavljeno prikazati sledećim reakcijama: <sup>5,43,46</sup>

Kiselinsko-bazna ravnoteža:



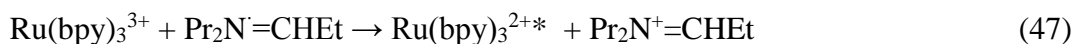
Oksidacioni korak:



Deprotonovanje:



Formiranje ekscitovanog stanja 1:



Emisija svetlosti:



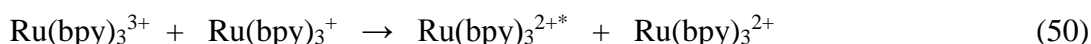
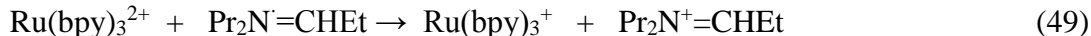
(gde je Pr = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- and Et = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)

Eksperiment je izveden na elektrodi od zlata u puferskom rastvoru TPrA i Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup><sup>47</sup>. U ECL analizi vodenog rastvora Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> optimalna pH vrednost TPrA pufera je između 7 i 8. U anodnom delu cikličnog voltamograma Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> i TPrA (NPr<sub>3</sub>) su istovremeno oksidovani.

(jednačina 43-44). Oksidacija TPrA se u cikličnom voltamogramu javlja u obliku širokog pika kao posledica postojanja kiselinsko-bazne ravnoteže ( $pK_a$  of  $\sim 10.4$ ) u sistemu (jednačina 42).<sup>54</sup> Poređenjem istovremeno snimljene ECL krive i cikličnog voltamograma zaključili su da ECL emisija takođe prati porast faradejske struje koja se javlja kao posledica oksidacije TPrA. Tokom oksidacije kratko postojeći katjon radikal  $TPrA^{+*}$  gubi proton sa alfa ugljenikovog atoma kako bi formirao snažan redukcionni intermedijer  $TPrA^{\cdot}$  (jednačina 44). Tako formiran  $TPrA^{\cdot}$  redukuje  $Ru(bpy)_3^{3+}$  do  $Ru(bpy)_3^{2+*}$  koji se nalazi u ekscitovanom stanju (jednačina 45). Uprkos tome što je moguće ostvariti direktnu oksidaciju TPrA na površini elektrode (jednačina 44) ona se takođe može odigrati i katalitičkim putem koji uključuje homogenu oksidaciju pomoću  $Ru(bpy)_3^{3+}$  (jednačina 45). Relativni doprinos oba načina oksidacije zavisi od relativne koncentracije  $Ru(bpy)_3^{2+}$  and TPrA i faktora koji utiču na elektrodni potencijal i brzinu direktne oksidacije TPrA na elektrodi.<sup>52,46</sup>

Visoko reaktivni intermedijer  $TPrA^{\cdot}$  takođe može redukovati prisutni  $Ru(bpy)_3^{2+}$  formirajući  $Ru(bpy)_3^+$ , koji potom reaguje anihilacionim putem sa  $Ru(bpy)_3^{3+}$  pri čemu dolazi do stvaranja ekscitovanog  $Ru(bpy)_3^{2+*}$  na način koji je opisan u pasusu 2.3.2.

Ekscitovano stanje formacija 2:



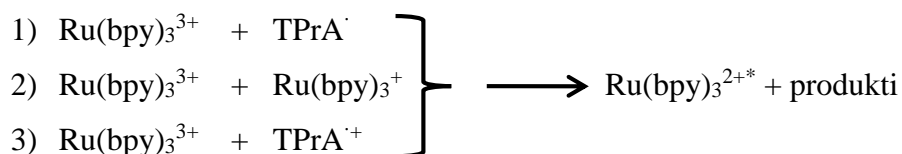
Doprinos ovih procesa ukupnom ECL intezitetu zavisi od koncentracije  $Ru(bpy)_3^{2+}$  i nije povoljan kada su koncentracije  $Ru(bpy)_3^{2+}$  male<sup>26</sup>.

Utvrđeno je postojanje dva pika na krivoj ECL u funkciji primenjenog elektrodnog potencijalau slučaju niskih koncentracija  $Ru(bpy)_3^{2+}$  (nM- $\mu$ M) i visokih koncentracija TPrA (10-100 mM)<sup>34</sup>. Drugi pik pojavljuje se na potencijalu koji odgovara oksidaciji  $Ru(bpy)_3^{2+}$  dok poreklo prvog pika prvo nije bilo moguće objasniti putem mehanizma koji jedino uključuje direktnu oksidaciju  $Ru(bpy)_3^{2+}$  na površini elektrode<sup>26,43</sup>.

Miao i Bard su predložili novu mehanističku putanju koja uzima u obzir nizak anodni potencijal pri kome se javlja ECL emisija<sup>26</sup>. Proces se dešava putem direktne oksidacije TPrA na elektrodi pri čemu dolazi do stvaranja  $TPrA^+$  i  $TPrA^{\cdot}$  jonskih vsta. U narednom stupnju, reakcija između TPrA i  $Ru(bpy)_3^{2+}$  rezultuje stvaranjem  $Ru(bpy)_3^+$  koji reaguje sa  $TPrA^+$  i na taj način formira pobuđeno stanje  $Ru(bpy)_3^{2+*}$ . Inicijalni ECL signal počinje da se javlja na elektrodnom potencijalu dovoljnom za direktnu oksidaciju TPrA na elektrodi od staklastog

ugljenika dok se drugi signal javlja u oblasti potencijala direktne oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .<sup>34 52</sup> Uočeno je da rastvoreni kiseonik može uticati na smanjenje ECL inteziteta ukoliko su korišćene koncentracije TPrA niske ( $C < 20 \text{ mM}$ ) što je pogotovo uočljivo u regionu potencijala na kojima se javlja prvi ECL pik.<sup>52</sup> Ovakvo ponašanje sistema može se objasniti na osnovu poslednje opisanog ECL mehanizama. Veliki višak intermedijernih redukujućih radikala  $\text{TPrA}^\cdot$  je proizvedenu reakcijama sa visokim koncentracijama  $\text{TPrA}^\cdot$ ; rastvoreni  $\text{O}_2$  koji je prisutan unutar ECL reakcionog sloja je potpuno redukovan ovim radikalima što je dovelo do suzbijanja njegovog uticaja na gašenje ECL signala. Međutim, pri niskim koncentracijama TPrA, koreaktant oksidacijom stvara relativno male količine redukovanih intermedijera koji reaguju sa kiseonikom prisutnim u sistemu. To za posledicu ima značajno smanjenje intenziteta ECL emisije.

Da sumiramo, ekscitovano stanje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  može se dobiti na tri različita načina : 1) redukcijom  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  sa TPrA; 2) anihilacionom reakcijom između  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  i 3) oksidacijom  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  sa  $\text{TPrA}^+$  katjon radikalom.



Intezitet ECL oba pika zavise od eksperimentalnih uslova. Krucijalni parametar u ECL mehnizmima je pH. ECL je efektivniji pri pH većim od 5.5 sa maksimalnim intezitetom na pH 7.5.<sup>1</sup>

Vrednost pH ne bi trebalo da bude veća od 9 jer tada TRrA postaje slabo rastvorljiv pri čemu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  generisan na površini elektrode može reagovati sa hidroksidnim jonom što dovodi do stvaranja pozadinskog ECL signala<sup>42</sup>.

Direktna oksidacija TPrA veoma zavisi od materijala od koga je sačinjena elektroda. Na GC elektrodi, direktna oksidacija je evidentna dok na elektrodama od zlata i platine formiranje površinskih oksida može značajno onemogućiti oksidaciju. Stoga, poboljšanje oksidacije TPrA može dovesti do pojačanja ECL inteziteta<sup>43</sup>. U daljim istraživanjima došlo se do zaključka da dodavanje nekih nejonskih surfaktanata kao što je Triton X-100 može značajno pojačati ECL intezitet na Pt i Au elektrodama<sup>48-51</sup>. Mehanizam kojim surfaktant utiče na povećanje ECL intenziteta je u direktnoj vezi sa hidrofilnošću elektrodne površine koja se značajno povećava usled adsorpcije molekula surfaktanta.

ECL intezitet prvog i drugog pika je proporcionalan koncentraciji  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i TPrA u velikom dinamičkom osegu.<sup>5,26,43-45</sup> sa granicom detekcije od 0.5 pM za  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ <sup>52</sup> i 10 nM TPrA<sup>62,63</sup>. Takve osobine  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA ECL sistema omogućavaju brojne primene u analitici.

#### 2.5.1.4. 2-(dibutilamin)etanol/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ Sistem

Zbog toga što  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA sistem daje jak ECL odgovor, većina aplikacija i komercijalnih sistema su bazirana na njegovoj primeni. Nedavno, novi koreaktant, 2-(dibutylamino)ethanol (DBAE), opisan je u literaturi<sup>53</sup>. ECL intezitet  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /DBAE sistema na elektrodama od Au i Pt je 10 do 100 puta veći nego sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA sistemom, respektivno. Visoka ECL efikasnost ovog sistema je pripisana katalitičkom efektu hidroksietil grupe prema direktnoj oksidaciji DBAE na površini elektrode. Pošto je DBAE alifatični tercijarni amin strukturno sličan TPrA, predloženi su mehanizmi analogni onima za TPrA. U ovom slučaju, mehanizam uključuju formiranje pozitivnih radikala  $\text{DBAE}^{\bullet+}$  i redukcionog intermedijera  $\text{DBAE}^\bullet$  deprotonovanjem.<sup>54</sup>

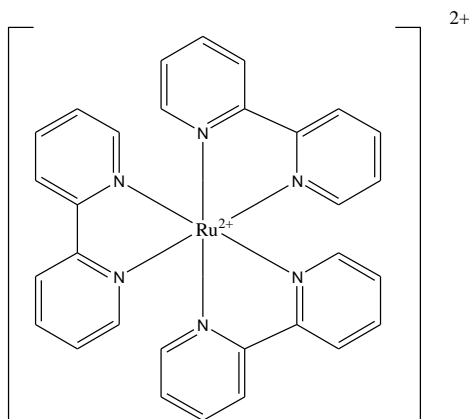


DBAE je manje toksičan, više rastvoran i manje isparljiv nego TPrA i stoga je obećavajući kandidata za koreaktanta koji bi mogao da nadje primenu u ECL baziranim imunotestovima i DNA probama<sup>66</sup>. Mehanizmi  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /DBAE sistema biće detaljno prodiskutovani u Poglavlju 3.<sup>37</sup>

#### 2.5.2. ECL Luminofore

Generalno, luminofore koje se koriste u ECL sistemima mogu se klasifikovati u tri kategorije: 1) neorganski sistemi koji uglavnom sadrže organometalne komplekse; 2) organski sistemi, koji uključuju policiklične aromatične ugljovodonike (PAHs) i 3) sistemi poluprovodnih nano-čestica.

Kao što je navedeno u delu 2.4.2.,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  je prvi neorganski kompleks koji ima ECL svojstva. Zbog odličnih hemijskih, elektrohemijskih i fotohemijskih karakteristika i dalje je najčešće korišćena ECL luminofora.  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  je rastvorljiv u mnoštvu različitih vodenih i nevodnih rastvarača na sobnoj temperaturi. Ima sposobnost da se podvrgne reverzibilnom jedno-elektronskom transferu na lako dostižnom potencijalu.



**Slika 4.** Strukturna formula  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

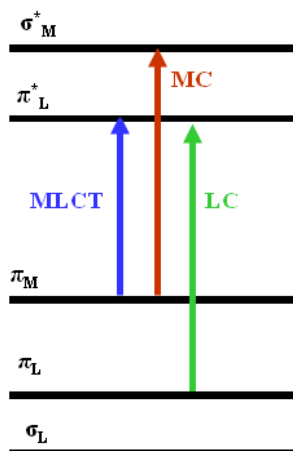
Da bi se unapredila emisija svetlosti i elektron-transfer performanse, uloženi su mnogi naponi da se dizajniraju ili modifikuju ligandi koji ulaze u sastav rutenijumovog kompleksa.<sup>67</sup> Cilj ove teze nije fokusiran na pronalaženju i poboljšanju efikasnosti ECL luminofora te će stoga biti predstavljeni samo osnovni primeri.

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  je žuto-narandzasti kompleks ( $\lambda_{\text{abs}} = 454 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 607 \text{ nm}$ ).<sup>57</sup>  $\text{Ru}^{2+}$  je  $d^6$  sa elektronskom konfiguracijom  $[\text{Kr}]4d^6$ .<sup>6</sup> U navedenom kompleksu, centralni metalni jon je okružen sa tri bidentatna polipiridinska liganda koji su obično bezbojni molekuli a koji poseduju  $\sigma$  donorske orbitale lokalizovane na azotovom atomu i  $\pi$  – donorske i  $\pi^*$ - akceptorske orbitale više ili manje delokalizovane na aromatičnom jezgru<sup>58</sup>. Na **Slici 5.** predstavljen je pojednostavljen prikaz elektronske konfiguracije za  $d^6$  kompleks (kao što je slučaj za  $\text{Ru}(\text{II})$  koji poseduje oktaedarsku simetriju ( $D_3$ )).

Jedno-elektronska ekscitacija iz  $\pi_M$  orbitale metala u  $\pi^*_L$  orbital liganda dovodi do metal-ligand transfera naelektrisanja (*eng. metal-to-ligand charge transfer (MLCT)*) i ekscitovanog stanja, dok pomeranje elektrona iz  $\pi_M$  u  $\sigma_M$  orbitale dovodi do pobudjenog stanja

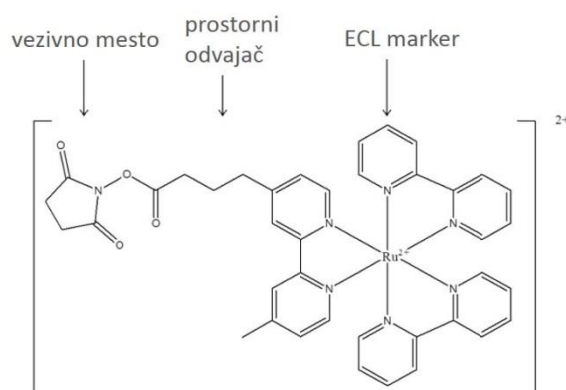


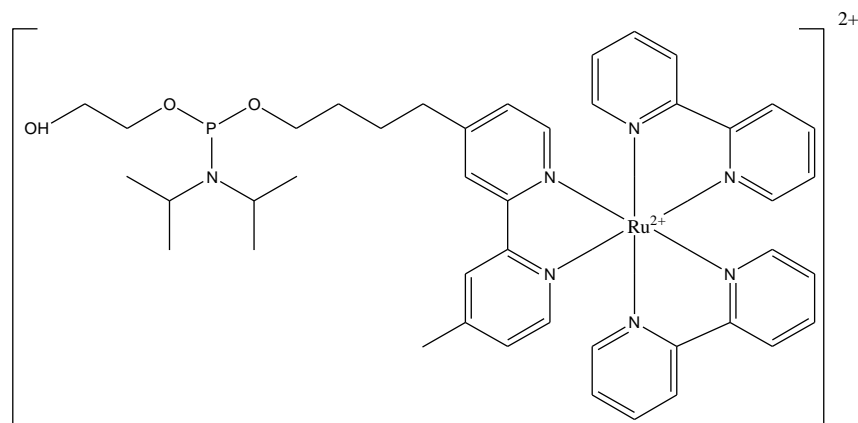
centralnog metala (MC). Ligand-centrirana (LC) pobuđena stanja se dobijaju pomeranjem elektrona iz  $\pi_L$  u  $\pi^*_L$ .<sup>58, 59</sup>



**Slika 5.** Uprošćen molekulskeorbitalni dijagram za  $\text{Ru}(\text{LL})^{2+}$  kompleks u oktaedarskoj simetriji koji prikazuje tri tipa elektronskih prelaza koji se dešavaju na nižim energijama.

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kao najviše korišćena luminofora je uključena u širok spektar primena i najčešće se koristi u obliku imobilizovanog sloja na površini elektrode, mada je njegova primena u rastvoru takodje zastupljena. ECL detekcija sa TPrA kao koreaktantom je specijalno značajna zato što omogućava efikasnu ECL ne samo u vodenoj sredini već i na fiziološkom pH ( $\sim 7.4$ ).<sup>38,60-64</sup> Hemijskom modifikacijom biperidinskih grupa,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  se može hemijski vezati za različite biološki važne molekule kao što su npr. antitela koja se koriste kao markeri u analizama. Neki primeri često korišćeni za ECL označavanje u kliničkim ispitivanjima prikazani su na **Slici 6**.





**Slika 6.** Gornja slika-  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS estar za ECL označavanje bioloških molekula, (donja)  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  fosforamidat za ECL obeleživanje DNK i RNK.

Prikazani ECL kompleksi se može iskoristiti za direktnu detekciju različitih koreaktanata kao što su amini, oksalati, piruvati, peroksodisulfati itd<sup>1,2,65</sup>. Takođe, mogu se upotrebiti za indirektnu detekciju analita koji ne poseduju koreaktantske karakteristike. Pojedini analiti se mogu detektovati posle enzimske reakcije koja npr. uključuje transformaciju  $\text{NAD}^+$  u NADH. U ovom slučaju NADH može imati ulogu koreaktanta<sup>66-69</sup>.

Iako se većina ECL primena bazira na  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i njegovim derivatima kao luminoforama i drugi kompleksi se mogu koristiti kao efikasne ECL luminofore. Mnogi kompleksi metala i klasteri imaju elektrohemijske i spektroskopske kvalitete potrebne za ECL emitere. ECL kompleksi i klasteri Ag, Al, Au, Cd, Cr, Cu, Eu, Hg, Ir, Mo, W, Os, Pd, Pt, Re, Ru, Si, Tb i Tl opisani su u literaturi.<sup>2</sup>

Prvi opisan osmijumski kompleks korišćen za ECL bio je  $\text{Os}(\text{phen})_3^{2+}$ . U ovom slučaju, ECL je indukovana u DMF-ukao rastvaraču pomoću  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  koji je ima ulogu koreaktanta. Razvoj sistema baziranih na osmijumu mogli bi da imaju prednost zbog toga što su osmijum sistemi više fotostabilni i najčešće se oksiduju na manjim anodnim potencijalima nego analogni rutenijum sistemi. Međutim, ECL primena osmijum sistema je ograničena zbog kraćeg života ekscitovanog stanja i slabije efikasnosti emisije.<sup>69</sup>

Kompleksi iridijuma takođe imaju mogućnost emitovanja ECL. U zavisnosti od strukture neki od njih su izuzetno efikasni kao što je to slučaj sa  $(\text{pq})_2\text{Ir}(\text{acac})/\text{TPrA}$  (pq: 2-fenilhinolin, acac: acetil acetonat) koji pokazuju 77 puta veću ECL efikasnost sa TPrA kao korektantom nego  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  pod istim uslovima.<sup>70</sup> Međutim, kako je utvrđeno,  $\text{Ir}(\text{ppy})_3$  uz TPrA kao koreaktant pokazuje slabiju ECL emisiju nego  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  pod istim uslovima, ali ovaj sistem ima „zelenu

emisiju“ pa je njegov maksimum dovoljno udaljen od „crveno/narandzastog“ maksimuma  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , što omogućuje diferencijaciju i kvantifikaciju oba signal u jednom ECL eksperimentu.<sup>71</sup> Značajna pažnja je usmerena na kontrolu boje emisije sa stanovišta istovremenog detektovanja više spektralno različitih elektrohemiluminofera za multipleks kvantitativne analize ili internu standardizaciju.<sup>72-76</sup> Veoma važno pitanje ostaje sinteza vodorastvornih Ir kompleksa u visokom prinosu.

Od trenutka kada je ECL silikonskih nano-čestica (*eng. nano-particles* - NPs) opisana u literature 2002. godine, nanomaterijali različitih veličina i oblika su ispitani kao potencijalni ECL nano-emiteri za bioanalizu. Nađeno je da poluprovodne NPs, (poznate i kao kvantne tačke i skraćeno *eng. quantum dots* - QDs) mogu biti uključene u ECL reakcije putem oba mehanizma: anihilaciona i ECL pomoću reaktanata.<sup>77,78</sup> Poluprovodne nanočestice poseduju izuzetnel uminiscentne osobine uključujući i visok kvantni prinos, stabilnost prema fotoizbeljivanju i luminescentna svojstva koja primarno zavise od njihove veličine. Pored toga, bikompatibilnost i niske cene čine ih atraktivnim materijalima za ovu vrstu primene.<sup>6</sup> ECL studija o poluprovodnim NPs prvi put je saopštena u slučaju silicijumskih nanočestica. Kasnije je otkriveno da nanočestice izgrađene od mnogih drugih poluprovodničkih materijala kao što su CdS, CdSE i CdTe. Pored toga, se može dobiti ECL koja može biti elektrohemijski indukovana u oba medijuma; vodenom<sup>55</sup> i nevodenom.<sup>80</sup> Zajednička karakteristika ECL dobijenih iz NPs je crveni pomeraj njihovog ECL maksimuma u poređenju sa njihovim fotoluminiscencijama što ukazuje na to da su emisionastanja različita. Ovo je objašnjeno činjenicom da fotoluminiscentni odgovor nastaje transferom elektrona uglavnom iz unutrašnjosti čestica dok ECL nastaje na površini gde je uticaj površinske hemije (*eng. surface chemistry*) dominantan. ECL vodenih suspenzija CdTe nanočestica je nedavno saopštena. Demonstriran je uticaj veličine NPs na ponašanje ECL.<sup>81</sup>

Pronalaženje novih luminofora sa visokom ECL efikasnošću za bioanalize je pokretačka snaga u ovoj oblasti. U novije vreme broj nano-emitera za ECL je proširen od QDs, razvojem novih nanomaterijala, koji se razlikuju po kompoziciji, veličini, obliku, uključujući metalne nano-klastere,<sup>82</sup> nano-tačke od ugljenika (*eng. carbon nanodots*),<sup>83</sup> poluprovodnike metalnih oksida,<sup>84</sup> i organske nano-agregate.<sup>85,86</sup>

## 2.6. Primena ECL

Zbog vrlo visoke osetljivosti, dobre selektivnosti, slabog uticaja matriksa pri određivanju bioloških uzoraka i visokog dinamičkog opsega ECL je robusna detekciona metoda.<sup>87</sup> Široko je korišćena u kliničkoj dijagnostici, analizama životne sredine kao što su testiranja vode i hrane kao i u otkrivanju toksina biološkog porekla koji se koriste kao oružije. Zbog visoke ECL efikasnosti, najveći deo ECL baziranih detekcionih sistema se zasniva na primeni  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ili njegovih derivata kao emitera i TPrA ili drugih srodnih amina koji imaju ulogu koreaktanata.<sup>88</sup>

Analitička primena je bazirana na činjenici da je intezitet ECL proporcionalan koncentraciji ECL luminofora ili koncentraciji koreaktanta. Ukoliko su ECL eksperimenti izvođeni u prisustvu visoke i stalne koncentracije koreaktanta, ECL intezitet će biti linearno zavisn od koncentracije ECL emitera u širokom dinamičkom opsegu. Alternativno, ako se eksperimenti izvode u prisustvu konstantne koncentracije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , ECL signal će pokazati zavisnost od koncentracije koreaktanta.

### 2.6.1. Primene u testovima i komercijalni ECL sistemi

Najčešća i najvažnija komercijalna ECL je u oblasti dijagnostičkih testova. Imunoeseji bazirani na ECL detekciji imaju nekoliko prednosti u odnosu na postojeće tehnike imunoanalize. S obzirom na to da nije potrebno koristiti radio-izotope problemi vezani za skladištenja uzoraka, rukovanje i odlaganje otpadnog materijala su potpuno eliminisani. ECL markeri su izuzetno postojani sa rokom trajanja većim od godinu dana na sobnoj temperature. Limiti detekcije su veoma niski i kreću se na nivou subpikomolarnih koncentracija zahvaljujući činjenici da svaki marker može emitovati nekoliko fotona po jednom ciklusu merenja. Takođe, linearni dinamički opseg je proširen za više od 6 redova veličine. Konačno, njihove male veličine dozvoljavaju višestruko markiranje istog molekula bez značajnog uticaja na imunoreaktivnost ili hibridizaciju probe.

Veliki broj biomolekula kao što su proteini, DNK i peptidi nemaju funkcionalnost koreaktanata i zbog toga ne mogu učestvovati u generisanju ECL emisije ili mogu dati ECL signal izuzetno niskog intenziteta. Zbog toga se njihova ECL detekcija uglavnom izvodi pomoću ECL testova na čvrstoj fazi (*eng. solid-phase ECL assays*) u kojima su biomolekuli vezani za ECL markere, (obično  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ili njegovim derivatima), imobilisani na čvrstoj

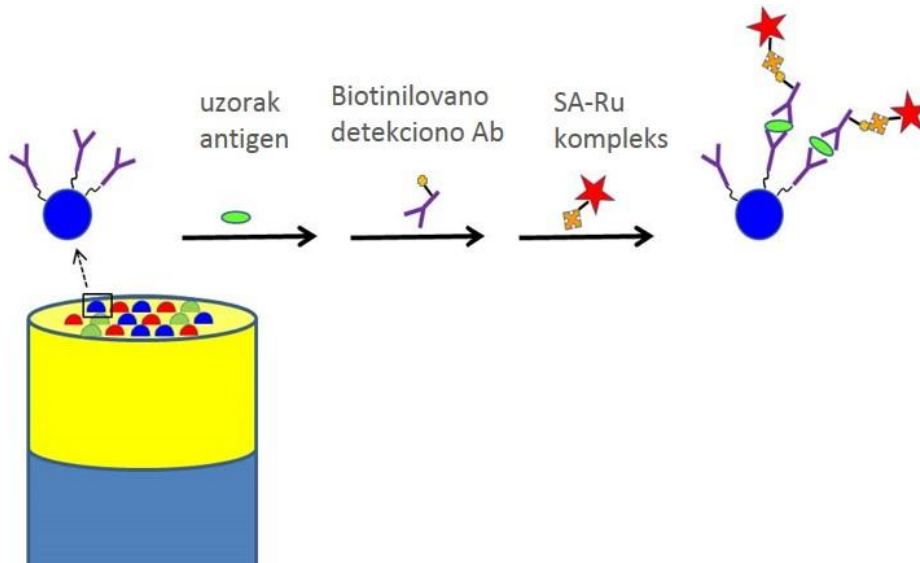
podlozi pri čemu je ECL generisana u prisustvu ECL koreaktanta, najčešće TPrA. Dosta napora je učinjeno u pogledu razvoja komercijalnih imunotestova i DNK testova.

Senzitivna i selektivna detekcija hibridizacije DNK ima veliki značaj u skriningu genetičkih oboljenja. Ultrasenzitivna DNK hibridizaciona metoda zasnovana na ECL uz korišćenje polistirenskih mikro-sfera/perli (*eng. polystyrene microspheres/beads-PSB*) kao nosioca ECL markera- tris(2,2'-bipiridil)rutenijum(II)tetra(pentafluorofenil)borata ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{-}[\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]_2$ ) je opisana u literaturi.<sup>36</sup> Ovaj metod se zasniva na činjenici da je ECL intenzitet linearno proporcionalan DNK koncentraciji u opsegu od 0.1 fM do 10 nM prioptimalnim eksperimentalnim uslovima.

Takođe, ECL sistem se može koristiti za detekciji proteina. Na primer, anti-C-reaktivni protein (CRP), akutno-fazni protein nađen u ljudskom serumu, može se kvantifikovati imunotestovima sendvič-tipa koji koriste ECL kao mehanizam za čitanje. Biotinilovane CRP vrste prikačene na površinu streptavidinom modifikovane magnetne perle (MB) i avidin-presvučene polistirenske mikro-perle (PMB) imaju mogućnost vezivanja velikog broja ECL markera ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{-}[\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]_2$ ). To dalje dovodi do formiranja anti-CRP $\leftrightarrow$ MB i Ru(II)-PSB/avidin $\leftrightarrow$ anti-CRP kako bi se ostvarilo vezivanje sendvič-tipa u prisustvu CRP analita.<sup>89</sup>U tvrđeno je da je ECL intenzitet proporcionalan CRP analitu u opsegu od 0.1-10  $\mu\text{m}/\text{mL}$ .

Sendvič format je u širokoj upotrebi u imonotestovima koji se baziraju na prepoznavanju i vezivanju antitela za antigen i obratno. Platforma koja se bazira na upotrebi perli i koja eksploatiše ECL za detekciju tri antigena simultano je opisana u literaturi.<sup>11</sup> Površina mikrosfera imobilizovane u mikro-bunare koji se nalaze na površini elektrode je bila modifikovana antitelima. Mikrosfere sa različitim antitelima su obeležene (dešifrovane, *eng. encoded*) različitim koncentracijama  $\text{Eu}^{3+}$  sa ciljem da se izvrši mapiranje površine perli. Analiza upotrebom testova zasnovanim na perlama izvršena je u nekoliko koraka. U prvoj fazi eksperimenta, uređena grupa (*eng. array*) perli koje su smestene u mikro-bunare na površini elektrode je inkubirana u rastvoru uzorka koji sadrži antigen.

U narednom koraku elektroda sa perlama je inkubirana u rastvoru koji sadrži biotinilovana detekciona antitela (*eng. biotinylated detection antibodies*) za koje je u krajnjoj fazi vezan streptavidinom modifikovan  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  koji ima ulogu ECL markera. Konačno, ECL odgovor sa perli u ovako formiranoj analitičkoj platformi je meren pomoću CCD kamere (**Slika 7.**).



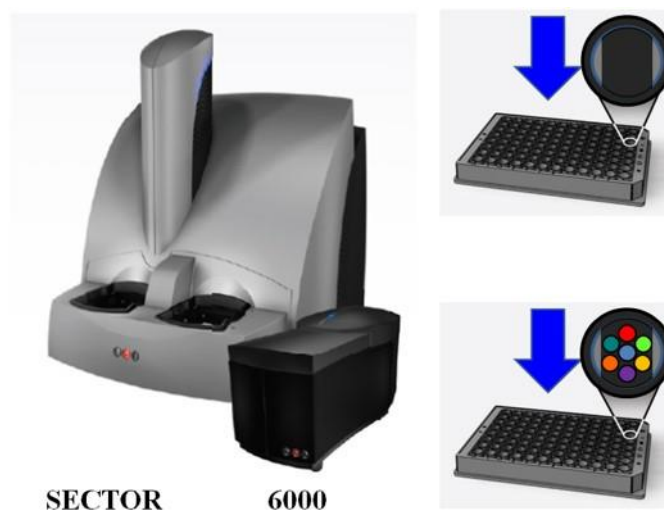
**Slika 7.** Shematski prikaz imunotesta baziranih na multianalitnoj detekciji zasnovanoj na kodiranim perlama objedinjenim na opričkom vlaknu u vidu pravilno raspoređenih grupa.<sup>11</sup> ECL snimanje može biti razvijeno za analizu pojedinačne ćelije. Nedavno je objavljen razvoj nove optički transparentne elektrohemijske ćelije za ECL snimanje, pogodne za analizu na nivou pojedinačnih ćelija.<sup>90</sup>

CL detekcija je široko u upotrebi u komercijalnim sistemima. ECL instrumenti su komercijalno dostupni od 1994. i brzo su bili primenjeni za kliničku i industrijsku detekciju.<sup>87</sup> Origen-1 Analizator (IGEN International Inc)<sup>87</sup> je bio prvi ECL analizator koji je bio opisan od strane Carter-a i Bard-a<sup>56</sup>. Ovi analizatori su napravljeni za kliničke testove.<sup>9</sup> Potpuno automatizovani instrumenti ELECSYS 10100 i ELECSYS 20100, razvijeni od strane kompanije Roche Diagnostics, nude preko 150 jeftinih imunotestova u oblasti kardiologije, funkcije tiroidne žlezde, onkologije, anemije, plodnosti, infektivnih bolesti i osteoporoze. U proseku se godišnje uradi oko billion testova ove vrste.



**Slika 8.**ORIGEN analizator komercijalizovan od Roche Diagnostics.<sup>57</sup>

ORIGEN analizator je prilagodjen za merenje ECL markera koji se nalaze na površini paramagnetičnih perli. Princip funkcionisanja uređaj je sledeći. Magnetne perle malih dimenzija su funkcionalizovane streptavidinom za koji se vezuju molekuli biotina. Za streptavidin-biotin adukt se u narednom koraku vezuju selektovana antitela ili antigeni specifična za dati analit. Perle su kombinovane sa analitima koje se vezuju za grupe koje se nalaze imobilizovane na površini perli. Antitelo označeno sa rutenijum-bipiridil kompleksom se tada uvodi u sistem pri čemu takođe dolazi do njegovog vezivanja za analit. Testovi su tako dizajnirani tako da količina markera prisutnih na površini perli odgovara količini analita u uzorku. Sistem se sastoji od protočne ćelije koja sadrži elektrodu od platine za višekratnu upotrebu sa jedne strane i fotomultiplikatorske cevi za detekciju svetlosti sa druge strane. Specifično vezivanje i ECL markiranje analita na površini perli se izvodi u offline modu prevođenja analita u protočni sistem. Zatim se svaki pojedinačni uzorak uvodi u ćeliju i primenom eksternog magnetnog polja paramagnetne perle bivaju privučene na površinu elektrode. Na ovaj način, analiti od interesa se odvajaju od matriksa što ovaj metod čini veoma pogodnim jer nije potrebno izvršiti bilo kakav pred-tretman uzoraka. Sa druge strane, markeri vezani za perle su koncentrovani na površini elektrode što značajno doprinosi povećanju osetljivosti sistema. Svi nevezani markerski molekuli mogu biti uklonjeni iz sistema ispiranjem što značajno utiče na smanjenje pozadinske emisije.



**Slika 9.** Komercijalni ECL Imager marker od Meso Scale Discovery kompanije. Instrument koristi CCD kameru ultra niskog šuma i pogodan je za pojedinačne i multianalitne testove.

Drugi tip komercijalnog ECL sistema je proizveden od strane Meso Scale Discovery-a. ECL merenja kod testova na čvrstoj fazi izvode se na elektrodama za jednokratnu upotrebu. Prvi komercijalizovani ECL instrumenti bazirani na ovom konceptu predstavljeni su od strane Meso Scaled Discovery-a (modeli Sector HTS Imager i Sector PR).<sup>8</sup> Testovi se izvode na elektrodama štampanih pomoću ugljeničnog mastila (*en. carbon ink*).

### 2.6.2. Primena ECL u CE, HPLC i FIA sistemima

Važna komponenta ECL metode detekcije je njena mogućnost kombinovanja sa sistemima kao što su kapilarna elektroforeza (CE), tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i protočne injekcione metode analize (FIA). Analiti ili njihovi derivati bi trebalo da se ponašaju kao ECL koreaktantišto često znači da imaju sekundarne ili tercijarne amino grupe sa protonima na  $\alpha$ -ugljenikovom atomu kako bi efikasno generisanje ECL-a u prisustvu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  bilo izvodljivo. Pošto tercijarni amini mogu proizvesti osetljive ECL odgovore, dosta truda je uloženo da se takve grupe uvedu u inicijalo ECL manje osetljive ili neosetljive analite kao što su amino kiseline ili masne kiseline.<sup>92,93</sup> Amino kiseline kao što su prolin, valin ili leucin mogu biti uspešno detektovane u CE-ECL sistemu sa limitom detekcije u opsegu  $\mu\text{M}$  – nM koncentracija.

Primećeno je da su mnoge komponente sistema u mogućnosti da zaustave, inhibiraju ili povećaju ECL intenzitet. Na primer, fenoli, ferocen, anilini i njihovi derivati mogu značajno smanjiti „oksidativno-redukcionu” ECL putem transfera energije ili elektrona između



$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i elektro-oksidovanih vrsta kvenčera (*eng. quencher*).<sup>94-96</sup> Ova strategija je korišćena u FIA-ECL analizi tetraciklina u lekovitim preparatima kineske tradicionalne medicine kao i u uzorcima injekcija noradrenalina i dopamina.

Termodinamičke i kinetičke studije mogu takođe biti izvedene korišćenjem CE-ECL sistema. Na primer, saopšteni su rezultati istraživanja na polju uticaja vezivanja serumskog albumina za paracetamol na aktivnost prolidaze u eritrocitima i u uzorcima seruma osoba koje su obolele od dijabetesa.<sup>98-100</sup> CE-ECL metoda nudi niz prednosti za ovu vrstu studije, bez umanjena značaja drugih često korišćenih metoda separacije-detekcije kao što su HPLC (sa UV ili fluorescentnom detekcijom), uz dobru selektivnost, visoku osetljivost, laku pripremu uzoraka i brz rezultat pošto nije potrebna prethodna priprema uzoraka.<sup>98,101</sup>

## 2.7. Zaključak

ECL je moćni detekcioni metod gde intenzitet svetlosti predstavlja analitički signal. Metod pruža nekoliko prednosti u odnosu na druge metode za detekciju kao što su visoka osetljivost, dobra selektivnost, neosetljivost na delovanje matriksa i visoki dinamički opseg. Kako je reakcija inicirana i kontrolisana primenom adekvatnog potencijala, metod omogućava kontrolisanje vremena i pozicije reakcije sa mogućnošću simultanog merenja oba eksperimentalna parametra, intenziteta svetlosti i faradejske struje. U zavisnosti o reakcionog mehanizma mogu se razlikovati dva ECL puta: a) anihilacija i b) ECL pomoću koreaktanata. Iako su prvi eksperimenti bazirani na ECL anihilacijom, primena im je ograničena zbog eksperimentalnih uslova kao što su širok opseg potencijala i nevodena sredina. ECL uz pomoć koreaktanata se najčešće izvodi u vodenoj sredini često na fiziološkim uslovima, tako da je pogodnija za različite primene uključujući i biološki-srodnesisteme. Zbog svojih izvrsnih elektrohemijskih i spektroskopskih osobina  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i njegovi derivati su najviše korišćene luminofoze. Mogu se koristiti kako u vodenim tako i u nevodnim rastvorima ili imobilizovani na površini elektrode. Postoji nekoliko prednosti imobilizacije luminofoza uključujući visoku osetljivost zbog visoke koncentracije centara emisije u detekcionom prostoru blizu površine elektrode i manje potrošnje hemikalija što je posebno važno u slučaju protočnih sistema. ECL se može kuplovati sa CE, HPLC-om o FIA-om u svrhu izvođenja različitih analiza u oblastima hemije životne sredine, analiziranja hrane i vode kao i za detekciju agenasa koji se koriste u uslovima biološkog rata.

ECL se takođe koristi kao metod za detekciju u enzimskim biosenzorima, imunotestovima i probama za analizu DNK gde su ECL markeri prikačeni za biomolekul. ECL

detekcija se primenjuje u naučnim istraživanjima kao i u komercijalnim detekcionim sistemima. Različiti kompleti za detekciju proizvedeni od strane kompanija Roche Diagnostic i Mesosale Discovery, pružaju veliki broj brzih, pouzdanih i jeftinih analiza u oblasti kliničke dijagnostike. Do sada poznate primene ECL ukazuju na njen značaj kao opšteg postupka detekcije. Iz tog razloga, uloženi su mnogi naponi da se odgonetne ECL fenomen koji je operativan u testovima na bazi peril, kao i da se poboljšaju i dalje razviju drugi sistemi zasnovani na ECL detekciji. Ovo je cilj rada doktorske disertacije koji će biti predstavljen u narednim poglavljima.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 3.1. Uvid u mehanizame ECL za model sisteme ECL imunotestova putem prostornog mapiranja distribucije svetlosti u prostoru

##### 3.1.2. Uvod

Glavne karakteristike i prednosti ECL-a kao analitičke metode se ogledaju u njenoj primeni za određivanje mnogobrojnih bioloških, odnosno medicinskih uzoraka<sup>1,2</sup>. ECL tehnologija omogućava profilisanje biomarkera kao što su citokini i unutarćelijski signalni proteini, što dalje direktno pomaže u otkriću lekova i samim tim poboljšanju zdravlja ljudi<sup>3</sup>. U odgovarajućoj hemijskoj sredini ECL markeri (*eng. labels*) emituju svetlost nakon elektrohemijske stimulacije. Emitovana svetlost dobijena na ovaj način, kao analitički signal je našla primenu u biotestovima, nakon otkrića reagensa koji omogućavaju detekciju u vodenim sredinama i koji se nazivaju ECL koreaktanti<sup>4</sup>. Sistem koji čine  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kompleksi tri-n-propilamin (TPrA) kao koreaktant, ima najveću ECL efikasnost. Otkiven je i 2-(dibutilamino)etanol (DBAE) kao efikasniji, bolje rastvoran, manje toksičan i manje isparljiv koreaktant od TPrA<sup>6</sup>.  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA Sistem, ipak ostaje ECL standard koji se eksploatiše u komercijalizovanim uređajima u dijagnostičke svrhe, kao što su imunotestovi i DNK analize. Trenutno se u upotrebi koristi više od 30 000 „ORIGEN“ analiizatora, komercijano dostupnih od strane vodeće farmaceutske kompanije „Roche Diagnostic“. „ORIGEN“ tehnologija koristi paramagnetične perle u ECL imunotestovima. Međutim, izuzetno visoka osetljivost ECL testova baziranih na perlama dalje ostaje nerazjašnjena. Broj instrumenata i testova koji koriste ECL kao analitički signal, jasno ukazuju na potrebu za dešifrovanjem ECL mehanizama.

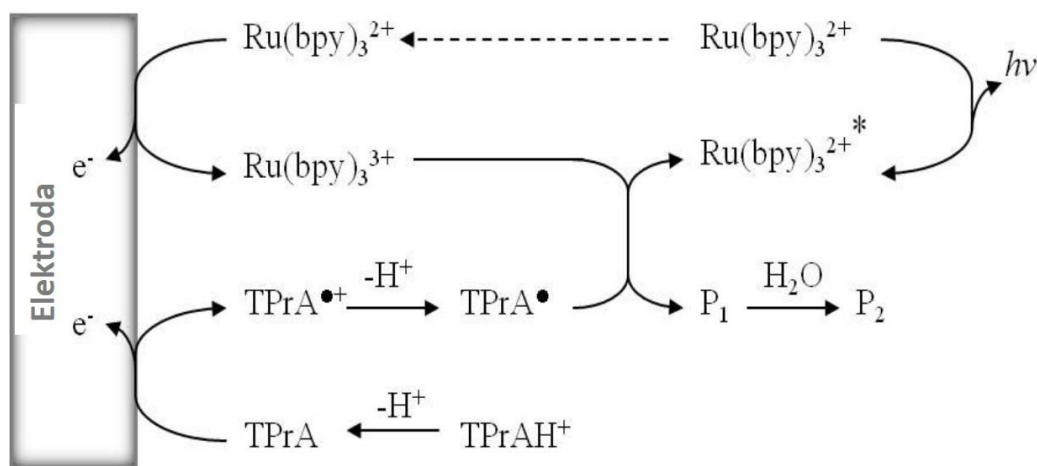
Nakon otkivanja reakcije između  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i TPrA, koja dovodi do ECL, predlagani su različiti kompetivni mehanizmi kako bi se objasnila ECL emisija<sup>2,17-21</sup>. Mehanizmi se mogu podeliti u dve glavne grupe zavisno od načina na koji se odigrava oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kompleksa. U prvu grupu svrstani su mehanizmi koji dovode do emitovanja ECL-a isključivo nakon direkne oksidacije pomenutog kompleksa na površini elektrode. Međutim, ove mehanistički putevi ne mogu da objasne visoku osetljivost imunotestova zasnovanih na perlama<sup>14,22</sup>. Miao i saradnici su tokom daljeg istraživanja predložili drugu, „revidiranu putanju“, po kojoj je  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kompleks indirektno oksidovan od strane katjon-radikala tripropilamina,  $\text{TPrA}^{\bullet+23}$ . U ovom putu isključivo je oksidovan TPrA koreaktant na površini elektrode. Nastali radikali:  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  i  $\text{TPrA}^{\bullet}$  imaju glavnu ulogu u procesu generisanja ECL-a.

Sa druge strane DBAE kao koreaktant ima blaži uticaj na zagađenje životne sredine i stoga mogućnost primene u biotestovima. Intenzitet ECL-a je takođe veći pri korišćenju DBAE u odnosu na TPrA kada se  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  nalazi u rastvoru, što nije slučaj u imunotestovima zasnovanim na perlama. Naime, u imunotestovima ECL luminofora je imobilizovana na paramagnetičnim perlama. Iz svih gore navedenih razloga, ovaj rad ima za cilj da dešifruje ECL mehanizme u ECL imunotestovima zasovanim na perlama.

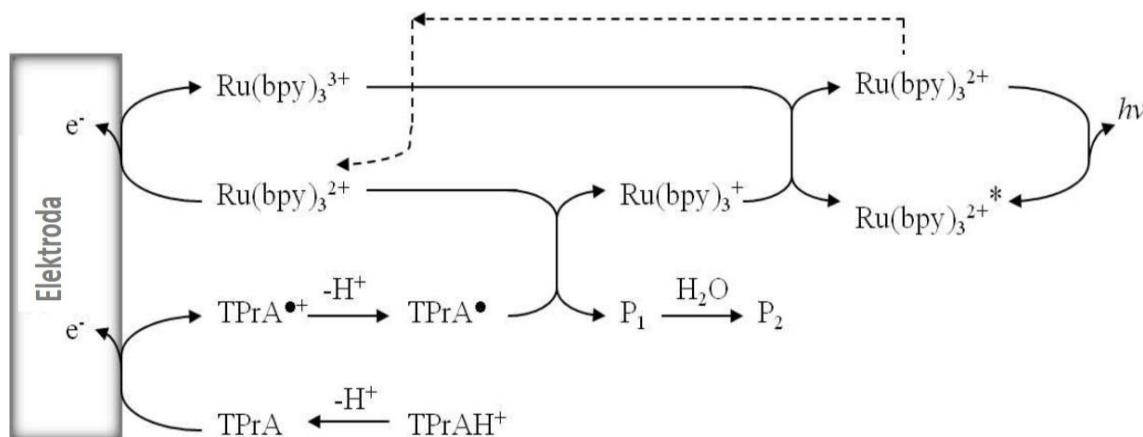
Prvi deo ovog poglavlja govori o objavljenim rezultatima istraživanja koji se odnose na reakcione mehanizme  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /koreaktant sistema. U drugom delu je opisano ispitivanje mehanizama  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /koreaktant sistema na nivou jedne perle, sa TPrA ili DBAE, respektivno, tehnikom snimanja koja daje trodimenzionalni prikaz, skraćeno 3D prikaz, distribucije inteziteta svetlosti ECL.

### 3.1.3. Mehanizmi $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / TPrA Sistema

Mehanizam reakcije ECL između  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  slobodnog u rastvoru i TPrA je najvećim delom ispitan od strane Leland-a i Bard-a<sup>5,11,13,18</sup>. Prema njihovim, i istraživanjima koje slede, utvrđene su mehanistički putevi ECL. Za generisanje ECL signala visoke efikasnosti, značajnu ulogu ima direktna oksidacija TPrA na površini elektrode. ECL signal se dobija nakon istovremene elektro-oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i TPrA (**Shema 1 i 2**)<sup>5,19</sup>. Nakon oksidacije, kratkoživeći katjon radikal,  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  otpušta proton sa alfa ugljenikovog atoma, pri čemu nastaje radikal visoke redukcionne moći -  $\text{TPrA}^{\bullet}$ <sup>28,29</sup>. Nadalje, nastali radikal može redukovati  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  i na taj način dovesti u pobuđeno stanje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  kompleks (**Shema 1**). Takođe, visoko redukujući agens  $\text{TPrA}^{\bullet}$ , može redukovati slobodni  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , nakon čega sledi reakcija anihilacije između  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  (**Shema 2**)<sup>5,19</sup>.

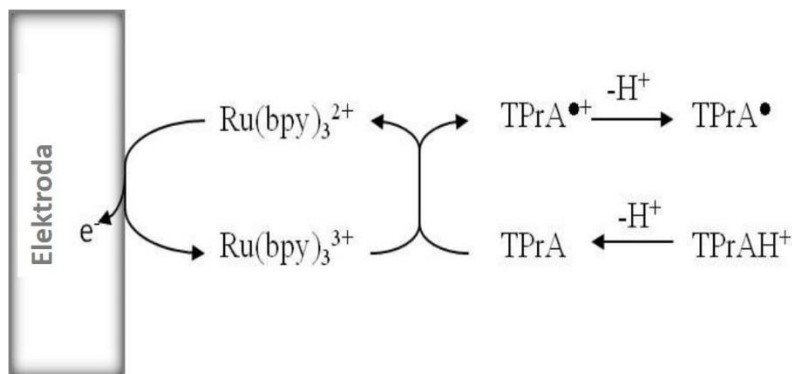


Shema 1.

**Shema 2.**

Ovi mehanizmi su opisani detaljnije u opštem delu.

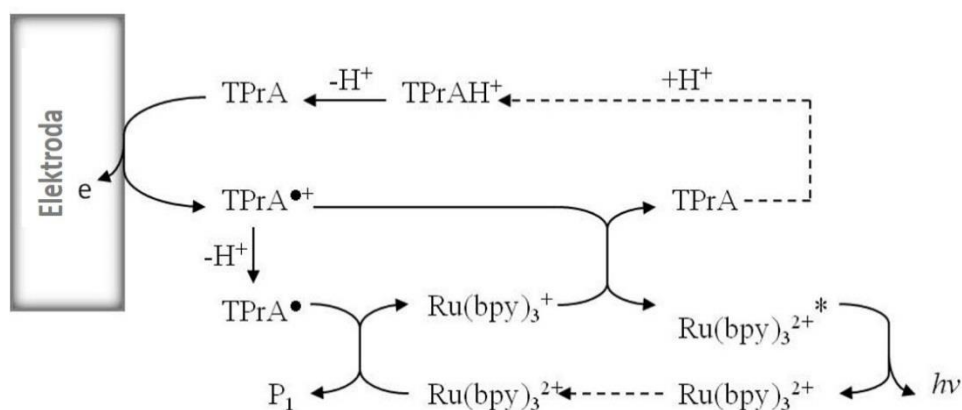
U literaturi je navedeno da se TPrA može oksidovati direktno na površini elektrode, ali i katalitičkim putem ureakciji sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  (**Shema 3**)<sup>18,19</sup>:

**Shema 3.**

Bitno je napomenuti da iako TPrA može biti oksidovan od strane  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , ova reakcija je značajna samo pri dovoljno visokim koncentracijama  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . To dalje ukazuje da je oksidacija TPrA  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  kompleksom zanemarljiva pri niskim koncentracija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , kao što je to slučaj u imunotestovima zasnovanim na perlama mikrometarskih dimenzija. Uticaj direktne oksidacije koreaktanta na površini elektrode od staklastog ugljenika, na elektrodi od zlata i platine, Au i Pt, respektivno, ispitivali su Zu i Bard<sup>18</sup>. U eksperimentu izvođenom na elektrodi od staklastog ugljenika i 1  $\mu\text{M}$  koncentraciji  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , na ECL krivi javljaju se dva pika. Elektrohemijske, hemijske i spektroskopske osobine ECL pika na 1,2 V se odnose na oksidaciju  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i opisane su u literaturi<sup>18</sup>. Ove osobine dalje ukazuju na

moгуće objašnjenje prirode nastanka prvog pika koji se javlja na nižoj vrednosti oksidacionog potencijala (na potencijalu manjem od +1.0 V vs. SCE) u odnosu na pik direktne oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . U daljim istraživanjima nađeno je da prvi pik ECL emisije pokazuje zavisnost od materijala elektrode. Odsustvo prvog pika primećeno je u prilikom snimanja voltamogramana elektrodama od zlata i platine. Formiranje oksida na površini elektroda od *Au* i *Pt*, značajno blokira direktnu oksidaciju TPrA. Na osnovu toga možemo zaključiti da je prvi oksidacioni ECL pik jako zavistan od direktne oksidacije TPrA.

Pokazano je zatim da ECL emisijski spektar dobijen na potencijalu prvog ECL pika odgovara emisiji svetlosti pobuđenog stanja kompleksa rutenijuma  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ . Kako direktna oksidacija TPrA vodi do formiranja redukovanih radikala  $\text{TPrA}^\bullet$  koji bi mogli da reaguju sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kako bi generisali  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ , autori predlažu da bi moguća put izazivanja ekscitovanog stanja  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  mogao biti transfer elektrona sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  na neku oksidacionu vrstu. Miao i Bard su dve godine kasnije objavili „revidirani“ put gde ECL emisija u potpunosti zavisi od direktne oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na površini elektrode i uključuje radikal-katjon  $\text{TPrA}^{\bullet+}$ . Mehanizam se zasniva na pretpostavci da  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  kao veoma reaktivni intermedijerima životni vek dovoljno dug da intereaguje pre nego što se podvrgne deprotonovanju. Reakcije se odigravaju sledećim redosledom: oksidacijom deprotonovanog TPrA generiše se radikal-katjon  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  koji dalje gubi jedan proton formirajući visoko redukcionu agent  $\text{TPrA}^\bullet$ . Taj radikal je u mogućnosti da redukuje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ . Istovremeno proizvedeni  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  ponaša se kao dobar oksidant i oksiduje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  (Shema 4).

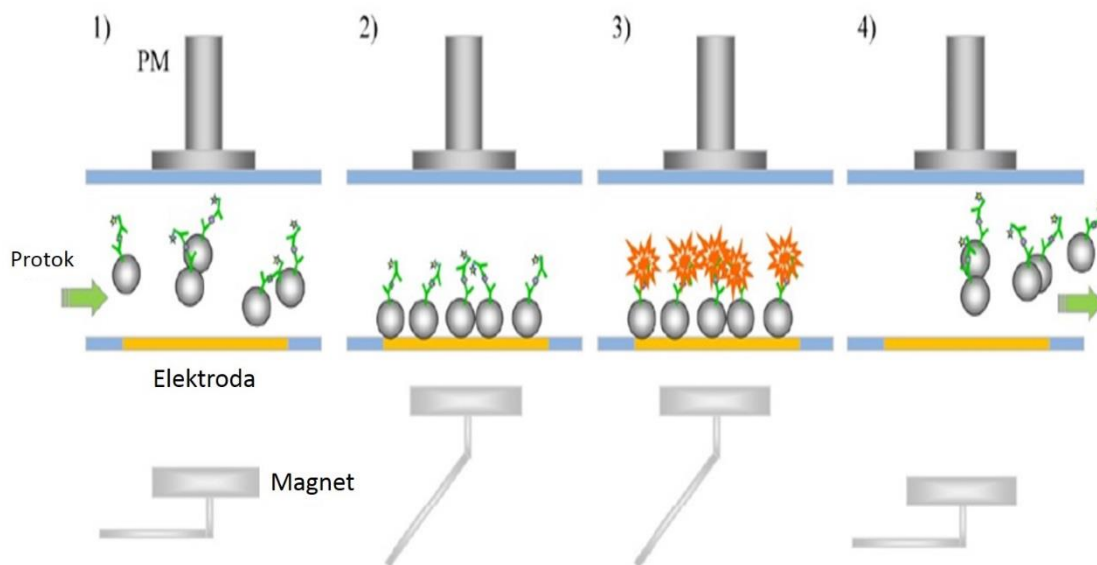


Shema 4.

Kako bi potvrdili ovu pretpostavku, izvedeno je nekoliko eksperimenata. Skenirajuća elektrohemijska mikroskopija, SECM-ECL, je korišćena kako bi se utvrdilo da li dolazi do emisije svetlosti bez direktne oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na površini elektrode<sup>23</sup>. Naime kao supstrat je  $\text{Ru}(\text{bpy})_2[\text{bpy}(\text{COOH})_2]^{2+}$  kompleks, čije je ECL ponašanje slično  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , u prisustvu TPrA, kovalentno imobilizovan na ITO elektrodi. Kako bi se izbegla direktna oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_2[\text{bpy}(\text{COOH})_2]^{2+}$ , tokom SECM-ECL eksperimenta, izmenjena ITO elektroda je bila u otvorenom kolu potencijala. Kao radna elektroda korišćena je „tip“ elektroda hemisfernog oblika od zlata, 1.5 mm u prečniku. Vrh elektrode je udaljavan od površine ITO do određene distance dok su struja i ECL krivesnimane skeniranjem potencijala od 0 do 1.0 V vs. Ag/AgCl/KCl cikličnom voltametrijom. Primećeno je da se nakon oksidacije TPrA na ~ 0.80 V pojavljuje ECL signal. Zatim ECL signal može biti detektovan samo na kratkom rastojanju od površine elektrode (~5-6  $\mu\text{m}$ ). Smanjuje se gotovo eksponencijalno sa povećanjem rastojanja. Ovaj eksperiment očito pokazuje da oksidacijom samo TPrA formirani intermedijeri  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  and  $\text{TPrA}^{\bullet}$ , jesu potrebni za generisanje ECL kompleksa rutenijuma. Maksimalno rastojanje na kom je zabeležena ECL emisija je ~ 5  $\mu\text{m}$  i stoga ono predstavlja rastojanje difuzije  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  pre deprotonovanja. Procenjeno vreme poluživota radikal-katjona je ~ 0.2 ms za tipični difuzioni koeficijent od  $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

#### 3.1.4. Princip rada ECL imunotestova baziranih na korišćenju mikro-perli

Proučavanje mehanizma ECL i njegov uticaj na ECL emisiju na nivou jedne perle je odvelikog značaja s obzirom na brojne komercijalno dostupne analize koje koriste ECL kao metod detekcije. „ORIGEN“ analizator, proizveden od strane IGEN Inc. (sada Elecsys, proizvodne linije Roche Diagnostic), je prvi komercijalizovani system koji je baziran na ECL kao detekcionoj metodi<sup>3</sup>. Korišćenje ECL u analitičke svrhe ima mnogo prednosti u odnosu na druge sisteme za detekciju posebno zbog svoje neverovatne osetljivosti, zanemarljivog auto-luminiscentnog pozadinskog signal i jednostavnosti samog dizajna eksperimenta. Marker i su stabilni u poređenju sa većinom hemiluminiscentnih sistema i što je bitnije nisu radioaktivni. Granice detekcije ECL markera su ekstremno niske (200 fmol/l) sa dinamičkim opsegom kvantifikacije preko šest reda veličine<sup>7</sup>. ORIGEN analizator je prilagođen za merenje ECL obeleživača koji senalaze na površini magnetnih perli. Instrument se sastoji od protočne ćelije koja sadrži platinsku elektrodu (koja se može koristiti više puta) i PMT za detekciju svetlosti (Slika 1).



**Slika 1.** Prikaz procesa za merenje ECL u imunotestovima baziranim na paramagnetičnim perlama u protočnoj ćeliji. 1) Paramagnetične perle koje na sebi imaju vezivnu komponentu imunotesta su uvedene u sistem; 2) Privremena imobilizacija paramagnetičnih perli primenom spoljašnjeg magnetnog polja i uvođenje TPrA u pufersanom rastvoru; 3) Primena elektrodnog potencijala potrebnog za indukciju ECL; 4) Ispiranje perli.

ECL markeri su obično  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  derivati koji se vezuju za biomolekule. Vezivanje ECL markera za magnetne perle zavisi od tipa testa. U sendvič imuno testovima, na primer, magnetne perle obložene antitelom se koriste za vezivanje ciljanog antigena i sekundarnog antitela koje na sebi ima ECL marker. Vezivanje se obično radi pre uspostavljanja strujnog kola. Potom se svaki individualni uzorak dovodi u protočnu ćeliju, gde su paramagnetične perle usled primene spoljašnjeg magnetnog polja „zarobljene“ na površini elektrode. Na ovaj način su markeri na mikrosferi koncentrisani na površini elektrode povećavajući osetljivost testa. Rastvor koji sadrži TPrA je potom uveden u protočnu ćeliju. Sledi njegova oksidacija primenom potencijala između radne i kontra elektrode. Emitovana svetlost se detektuje fotomultiplikatorskom tubom. Perle su potom isprane iz ćelije, i rastvor za prečišćavanje se uvodi u ćeliju da bi se površina elektrode očistila i sistem bio spreman za sledeće merenje<sup>33</sup>.

Trenutno postoji nekoliko komercijalnih sistema koji se zasnivaju na ORIGEN tehnologiji. Ovi instrumenti su dizajnirani za različite primene kao što su analize bioloških uzoraka, testiranje hrane, vode, zdravlja životinja i u naučno istraživačke svrhe.



Roche Diagnostics i Mesoscale prodaju različite tipove testova za kliničku dijagnostiku. Ovi sistemi se ubrzano razvijaju za imunotestove u oblasti kardiologije, plodnosti, funkcije štitne žlezde, onkologiji, anemiji, zaraznim bolestima i osteoporozi<sup>3,34</sup>.

U domenu naučnih istraživanja, ECL testovi bazirani na perilama su takođe opisani u literaturi<sup>8,11,35-37</sup>. Veoma osetljiv imunotest zasnovan na sličnoj aparaturi je opisan. Sistem se primenjuje za detekciju  $\alpha$ -fetoproteina (AFP)<sup>38</sup>. Magnetne perle obložene anti-AFP antitelima su korišćene za vezivanje AFP u imunotestu tipa sendviča sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS obeleženim sekundarnim anti-AFP antitelima. Postignuta detekcija za 5 pg/ml AFP-a sa širokim dinamičkim opsegom<sup>38</sup>.

### 3.1.5. Mehanizmi $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / DBAE Sistema

Obimno istraživanje je usmereno na istraživanje efektivnih koreaktanata za osetljivu detekciju brojnih analita kao što su oksalati<sup>39,40</sup>,  $\text{NADH}^{41}$ , glukoze<sup>42,43</sup>, amina<sup>5,17</sup> i amino kiselina<sup>44</sup>. Klasičan koreaktant koji se koristi je TPrA, ali su pronađeni i drugi i utvrđeno je da izazivaju generisanje ECL jačeg intenziteta u odnosu na TPrA. Dobar primer za generisanje ECL sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  je DBAE kada je dostupan u rastvoru. DBAE se upotrebljava u sve više kao koreaktant za ECL<sup>25,45,46</sup>. On se koristi ne samo u sistemu sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kao luminoforom već i sa njegovim derivatima, kao što su kvantne tačke (QD)<sup>25</sup>. Grupa profesora Guobao Xu je radila na istraživanju serije ECL koreaktanata koji imaju strukturu tercijarnih amina i različite supstituente, pri čemu je koncentracija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  bila niža u odnosu na amine<sup>6</sup>. Generalno, tercijarni amini su efikasniji od sekundarnih amina, primarnih amina i drugih vrsta koreaktanata<sup>5,17</sup>. Oni su pronašli da je ECL intenzitet za sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /DBAE blizak sistemu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /TPrA kada je koncentracija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  1mM; međutim intenzitet DBAE sistema je oko deset puta veći od TPrA sistema kada je koncentracija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  1 $\mu$ m na radnim elektrodama od zlata i platine. Ovi rezultati još jednom potvrđuju da direktna oksidacija koreaktanta ima važnu ulogu pri niskim koncentracijama  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i da je elektrolitička oksidacija koreaktanta sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  dominantna pri visokim koncentracijama  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Kako signal ECL zavisi od materijala radne elektrode, efikasnost sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /DBAE ispitan je na Au, Pt i GC elektrodi. ECL sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /DBAE na Pt elektrodi je uporediva sa onom na Au elektrodi, i oko 100 puta je jačeg intenziteta od ECL za sistem  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  /TPrA na Pt elektrodi. Upadljiva razlika se može pripisati različitim brzinama oksidacije DBAE i TPrA na elektrodi od platine.

Istraživanja Zu i Bard-a, pokazala su da je intenzitet ECL signala  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$  sistema na Pt elektrodi čini oko 10% od intenziteta signala na Au elektrodi. Razlog tome je formiranje oksidacionih slojeva prilikom skeniranja potencijala na platinskoj elektrodi koji značajno inhibira direktnu oksidaciju TPrA<sup>18</sup>. Nasuprot tome, direktna oksidacija DBAE na Pt elektrodi je mnogo brža, što ukazuje na to da hidroksietil grupa takođe katalizuje direktnu oksidaciju amina i time poboljšava ECL odgovor. Na početku reakcije, intenzitet ECL ubrzano raste sa porastom koncentracije DBAE do 20 mM, a zatim polako opada sa daljim povećanjem njegove koncentracije. Smanjenje ECL intenziteta na visokim koncentracijama DBAE-a može se pripisati sporednim reakcijama<sup>6,24</sup>. Poređenja radi, 20 mM koncentracija DBAE je efikasnija nego 100 mM koncentracija N,N-dietil-etanolamina i TPrA, iako se sa povećanjem koncentracija N,N-dietil-etanolamina i TPrA povećava ECL. Na elektrodi od staklastog ugljenika intenzitet ECL-a raste sa koncentracijom DBAE do samo 3 mM koncentracije. Kao rezultat formiranja jedinjenja iz sporednih reakcija na višim koncentracijama koreaktanta ECL signal se gasi<sup>6</sup>.

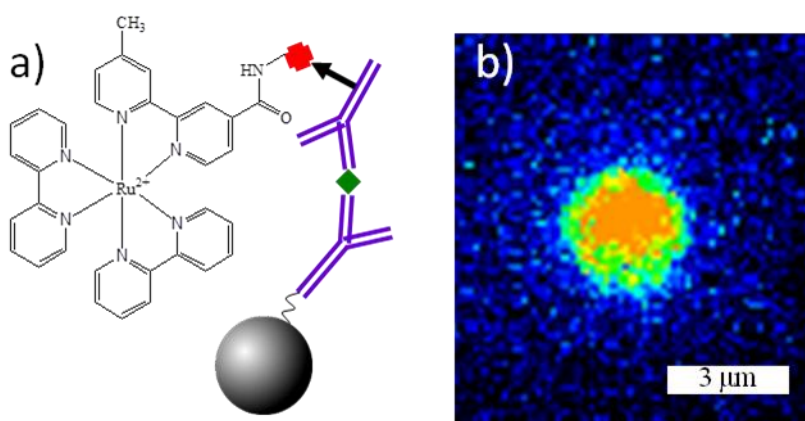
Tang i saradnici su nedavno proučavali mehanizam  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{DBAE}$  sistema korišćenjem QD kao koreaktant<sup>25</sup>. Pokazano je da  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{DBAE}$  sistem sledi sličan mehanizam za  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$  sistem koji su predložili Bard i Miao. ECL mehanizam  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$  sistema po Bard-u i Miao uključuje redukciju  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  do strane intermedijernih TPrA radikala i na taj način izazivanje ekscitovanog stanja  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Predloženi mehanizam  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{DBAE}$  se bazira na činjenici da je DBAE takođe alifatični tercijarni amin i da ima molekulsku strukturu sličnu TPrA-u. DBAE se prvo oksiduje na elektrodi (~0.60 V u odnosu na Ag/AgCl) i nastaje  $\text{DBAE}^{\bullet+}$  radikal katjon, koji se dalje deprotonuje do slobodnog radikala,  $\text{DBAE}^{\bullet}$ <sup>24</sup>. Poznato je takođe da se  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  može oksidovati na 1.14 V (u odnosu na Ag/AgCl) u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ . Zbog svoje zadovoljavajuće reduktivne sposobnosti, slobodni radikali  $\text{DBAE}^{\bullet}$  redukuje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  pri čemu nastaje ekscitovano stanje kompleksa rutenijuma  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  koji kasnije, uz emisiju svetlosti, prelazi u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+4}$ . Elektron spin rezonantna (ESP) merenja su potvrdila da se pri oksidaciji DBAE može generisatiaminski radikal-katjon,  $\text{DBAE}^{\bullet+}$ , koji se naknadno deprotonuje do slobodnog radikala  $\text{DBAE}^{\bullet}$ .<sup>25</sup> ESR merenja pokazuju da postoji i prenos naelektrisanja između QD-a i radikalskog oblika DBAE, koji vodi gašenja ECL signala u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{DBAE}$  sistemu.

Iz svega pokazanog može se zaključiti da se upotreba DBAE koreaktanta može proširiti na biotestove zbog veće efikasnosti nego TPrA-a u generisanju ECL kada se luminofora, nalazi u rastvoru  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (nije imobilizovana kao u slučaju imunotestova baziranih na perlama). U cilju simuliranja kinetičkih parametara, potrebno je uzeti u obzir niz uzastopnih reakcija kratkoživućih radikala različitih redoks potencijala koje se odvijaju u okviru kompetitivnog ECL mehanizma<sup>47,48</sup>. Dakle, veliki je izazov modelovanje precizne vrednosti za reakcije u rastvornoj fazi i još teže u realnim uzorcima.

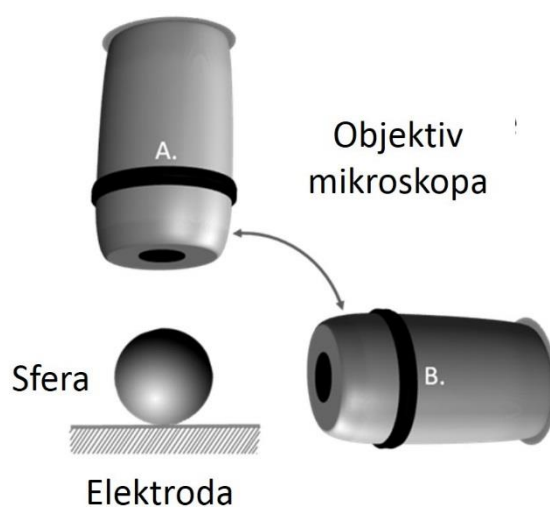
### 3.1.6. Sendvič ECL imunotest na bazi mikro-perli

Sa obzirom na brojne primere testova zasnovanih na perlama, istraživanje ECL mehanizama je od velike važnosti za poboljšanje efikasnosti sistema i za razvoj novih analitičkih protokola. U komercijalnom ORIGEN analizatoru, antitela obeležena  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  su prikazana na paramagnetne perle/sfere prečnika  $2.8\mu\text{m}$ .<sup>3</sup> U našem istraživanju izveli smo sendvič ECL imunotest koristeći  $3\text{-}\mu\text{m}$  perle od polistirena (PS), uzimajući u obzor veličinu perli koje se koriste u komercijalizovanim testovima. PS sfere modifikovane vezujućim antitelom (anti-IL-8) izložene uzorku koji sadrži antigen i zatim biotinilovanim detekcionom antitelu. Na kraju je prikazan streptavidinom modifikovani  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (**Slika 2a**). Mikro-sfere u fosfatnom puferu su nanošene na ravnu površinu elektroda od staklastog ugljenika (GC) pomoću metode premaza (*eng. drop-coating*) i ostavljene na sobnoj temperature da se osuše, zaštićene od svetlosti. Tehnika ECL slikanja je izvedena uz pomoć epifluorescentnog mikroskopa u „top-view“ konfiguraciji, tako da je površina elektrode bila orjentisana paralelno sočivu objektiva (Shema 5(A)). Da bi se odredio položaj sfera na površini elektrode, korišćen je fotoluminiscentni mod sa ekscitacijom na 485 nm i emisijom na 605 nm. Hronoamperometrija je primenjena za generisanje ECL signala. ECL snimanje je realizovano u istoj ravni fokusa bez upotrebe ekscitacione svetlosti nakon što je pimenjen anodni potencijala od 1.1 V na modifikovu GC elektrodu u rastvoru koji sadrži TPrA. Žica od platine i Ag/AgCl/KCl su bile kontra i referentna elektroda, respektivno. Da bi se izbeglo pojavljivanje pozadinskog ECL signal usled prisustva rastvorenog kisenonika, puferisan rastvor TPrA je degaziran uvođenjem gasovitog azota tokom 30 minuta.<sup>32</sup> Na **Slici 2b** se može videti da jedna funkcionalizovana sfera emituje ECL svetlost. Dobija se utisak da se ECL generišesa cele površine perle, a ne samo sa regiona koji je u dodiru sa elektrodom. Sa obzirom na njenu sfernu geometriju samo mali deo perle je u kontaktu sa površinom elektrode.

To dalje govori da ECL nastaje ne samo usled puta koji sledi direktnu oksidaciju centara kompleksa rutenijuma, jer bi ECL signal u tom slučaju bio emitovan sa razdaljine od 1-2 nm od površine elektrode (*eng. electron tunnelling distance*). Kako se rutenijum markeri nalaze na površini sfera samo radikali koreaktanta nastali u oksidacionom koraku na elektrodi, difunduju da bi reagovali sa ECL markerima i generisali pobuđeno stanje. Sa **Slike 2b** dalje možemo uočiti da je ECL signal nehomogeno distribuiran na površini perile; dobija se utisak da je intenzivniji u centru. Međutim, ECL slika dobijena u top-view konfiguraciji ne omogućava da se dešifruje ovakva distribucija ECL intenziteta.

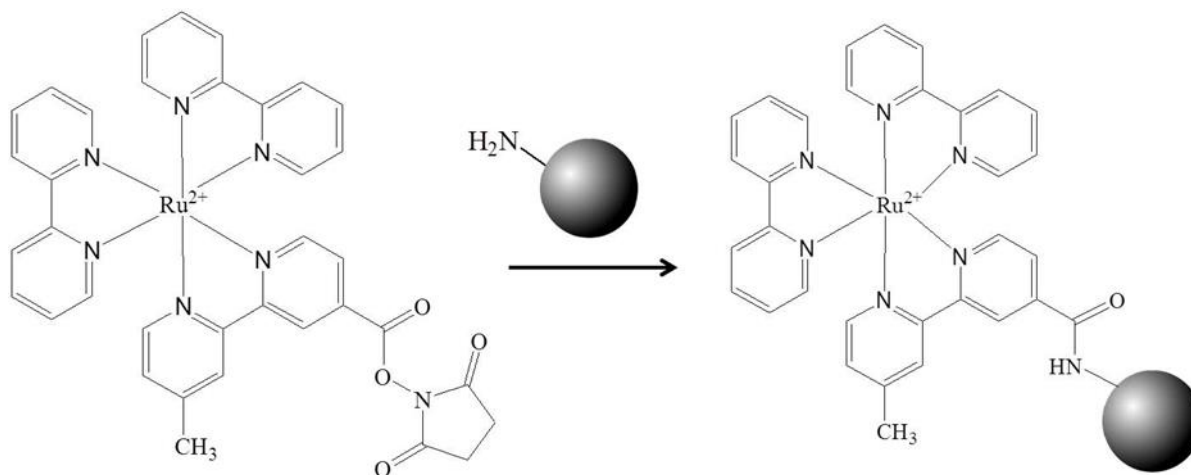


**Slika 2.** (a) Sendvič imunoesej sa PS perlama. (b) ECL slika jedne 3-µm perle korišćenjem top-view konfiguracije. ECL snimanje je realizovano tokom vremena ekspozicije od 6 s na potencijalu od 1.1 V u odnosu na Ag/AgCl/KCl u rastvoru PBS-a koji sadrži 100mM TPrA (pH=7.4).



**Shema 5.** Shematski prikaz obe optičke konfiguracije korišćene za ECL snimanje funkcionalizovanih mikro-sfera: top-view (A) i side-view (B).

Kako bi se poboljšala prostorna rezolucija luminiscentnog fenomena u daljim eksperimentima korišćene su sfere od 12  $\mu\text{m}$ . Mikro-sfere funkcionalizovane  $-\text{NH}_2$  grupom su modifikovane istim ECL markerom korišćenim u sendvič imunotestu,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS estrom (bis(2,2'-bipiridin)-4'-metil-4-carboksibipiridin-rutenijum N-sukcinimidil ester-bis(heksafluorofosfat)) čije je ECL ponašanje slično  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , uz formiranje peptidne veze. (Shema 6).

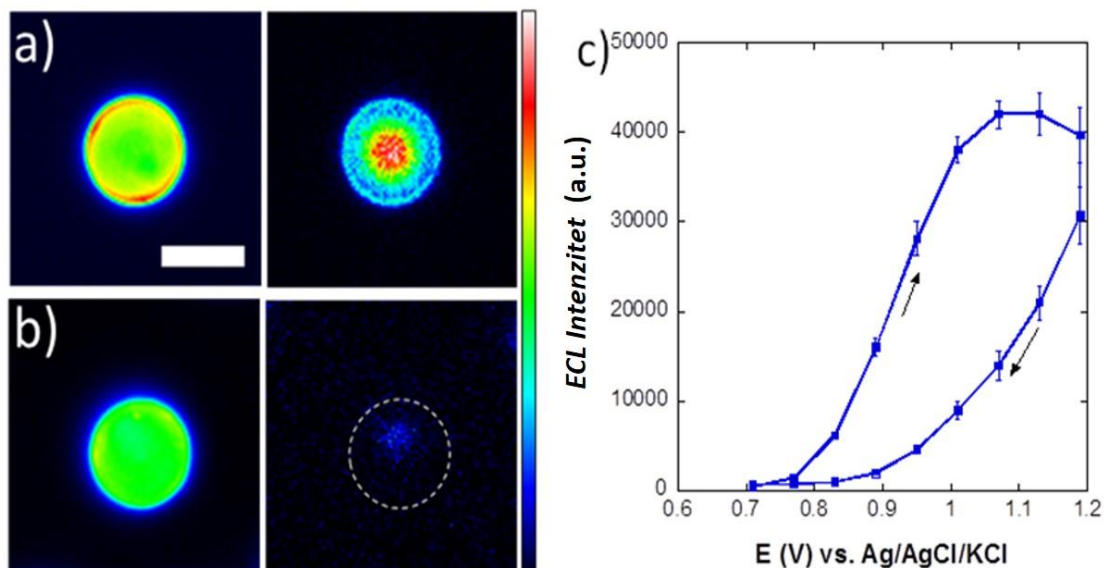


Shema 6. Modifikacija sfere sa  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  markerom

### 3.1.7. Dvodimenzijalni - 2D prikaz ECL

Fotoluminiscentno (*eng. photoluminescence* -PL) snimanje pokazuje lokaciju markirane PS sfere (Slika 3a). PL intenzitet dolazi od imobilizovanog kompleksa rutenijuma na površini sfere i na Slici 3a se vidi homogena raspodela ECL markera preko cele perle. To je dokaz da je modifikacija sfere ECL obeleživačem bila uspešna. Da bi se ispitala zavisnost emisije ECL od primenjenog elektrodnog potencijala, serija ECL snimaka je zabeležena tokom ciklično voltametrijskog skeniranja na GC elektrodi. Progresivnim povećanjem primenjenog potencijala sa 0.7 V, gde nema generisanja ECL, na 1.2 V, ECL intenzitet se progresivno povećava. Maksimalna vrednost ECL signala je dobijena na 1.1 V (Slika 3c).<sup>23</sup> Kao i pri snimanju imunotesta, primetili smo, sada sa dobrom prostornom rezolucijom, da se ECL svetlost emituje na celoj površini sfere sa nešto svetlijom tačkom u samom centru. Naime, PS sfere se ponašaju kao efikasna sočiva koja fokusiraju svetlost u svom centru. Takva neobična distribucija elektromagnetnog polja koja nastaje iz dielektrične mikrosfere je eksperimentalno već demonstrirana.<sup>49,50</sup> Iz mikrosfere se javlja snop svetla visokog intenziteta i niske divergencije. Sposobnost sfera da fokusiraju svetlost koncentriše analitički signal i doprinosi izuzetno dobroj osetljivosti ECL imunoseja koji se zasnivaju na upotrebi markiranih perli.

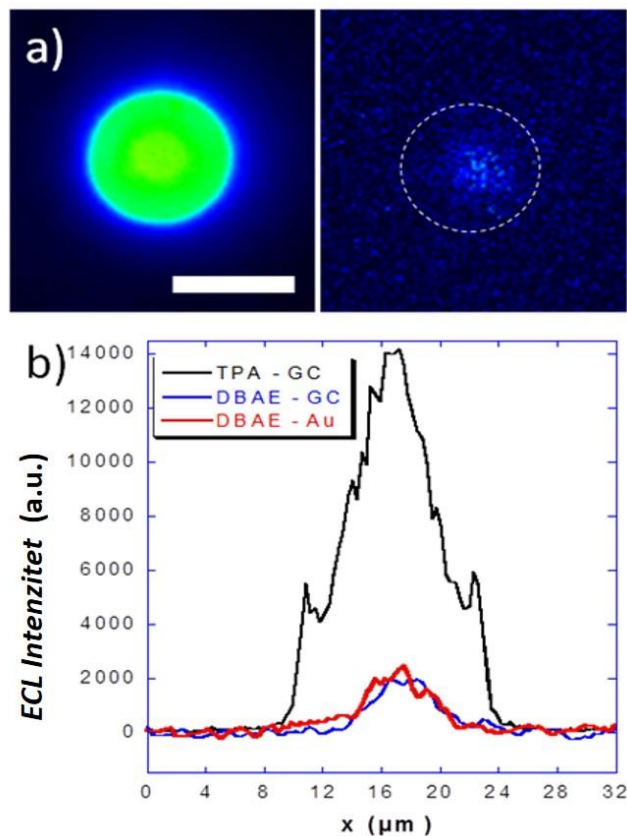
S obzirom da rastvoreni DBAE proizvodi jači ECL signal u odnosu na TPrA (npr., 6-5 puta veći ECL signal pri 20 mM koncentraciji DBAE)<sup>6</sup>, ispitali smo njegove osobine u ekperimentima koji se zasnivaju na upotrebi sfera (Slika 3b i 4a).



**Slika 3.** (a-b) Top-view: PL (levo) i ECL (desno) slike PS sfere prečnika 12  $\mu\text{m}$ , obeležene rutenijum markerom. ECL slike su snimljene u PBS rastvoru koji sadrži (a) 100 mM TPrA ili (b) 20 mM DBAE na GC elektrodi. Isprekidane linije označavaju položaj perle. Eksperimenti su izvedeni na više od 50 pojedinačnih perli sa oba koreaktanta. Skala: 10  $\mu\text{m}$ . (c) ECL intenzitet izmeren na PS sferi u funkciji primenjenog potencijala na GC elektrodi u PBS rastvoru koji sadrži 100 mM TPrA (pH= 7.4).

U našim uslovima maksimalan ECL intenzitet je dobijen na 1.2 V sa 20 mM koncentracijom DBAE. ECL emisija se javlja tačno u centru sfere na prečniku površine od preko  $\sim 4\text{-}5 \mu\text{m}$ . Neočekivano, ECL intenzitet je bio izuzetno nizak na GC i Au elektrodama. ECL signali snimljeni sa funkcionalizovanim perlama iznenađujuće su bili 7-puta niži nego oni snimljeni sa TPrA. Ova razlika se može objasniti različitim eksperimentalnim uslovima s obzirom da su u do sada objavljenim naučnim radovima,<sup>6,24,51</sup> kompleksi  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  bili prisutni u rastvoru i mogli su homogeno da reaguju sa DBAE radikalima. U testovima koji se baziraju na perlama, radikali nastaju oksidacijom DBAE treba da difunduju od elektrode i reaguju sa imobilizovanim kompleksom  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  da bi se izazvalo pobuđeno stanje ovih molekula. Takvo ponašanje ukazuje na razliku u reaktivnosti oba ispitivana koreaktanta koja zavisi od redoks potencijala i poluživota njihovih radikala. Manja ekspanzija kao i slabiji intenzitet ECL ukazuju na to da oksidacijom nastali DBAE radikali slabije difunduju kroz rastvor i da su manje stabilni nego radikali TPrA.

U ovoj konfiguraciji snimanja (top-view) sfere uočavamo neuniformnu distribuciju ECL intenziteta na njenoj površini i ne možemo precizno locirati regiju ECL emisije. Snimljeni ECL šablon oslikava uglavnom optički put svetlosti kroz sferu.



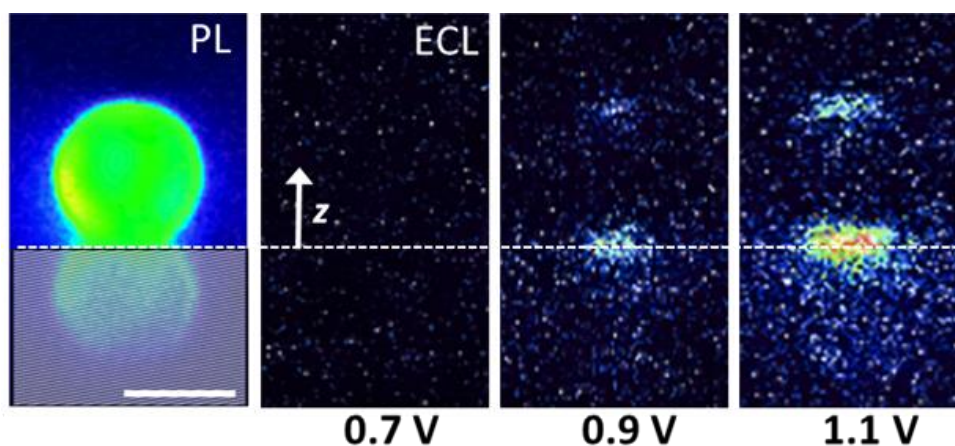
**Slika 4.** a) PL (levo) i ECL (desno) slika PS sfere prečnika 12  $\mu\text{m}$ , obeležene rutenijum markerom. ECL snimanje je realizovano tokom vremena ekspozicije od 6 s na potencijalu od 1.2 V u PBS (pH=7.4) rastvoru koji sadrži 20 mM DBAE na Au elektrodi. Isprekidana linija materijalizuje poziciju sfere. Skala: 10  $\mu\text{m}$ . b) Profili ECL intenziteta uzeti su duž srednje vertikalne ose sfere; snimljeni u 100 mM TPrA na GC elektrodi (crna linija) ili u 20 mM DBEA na GC (crvena linija) i na Au (plava linija) elektrodi.

Za rekonstrukciju prostornog položaja ECL-emitujuće regije, 3D kartografija, kao u scintigrafiji, može se dobiti promenom ugla posmatranja emitujućeg objekta.

### 3.1.8. Trodimezioni - 3D prikaz ECL

Ovde smo koristili ortogonalnu konfiguraciju, „side view“ (pozicija B na Shemi 5), u kojoj je radna elektroda sa imobilizovanim perlama bila orjentisana tako da je površina elektrode normalna u odnosu na objektiv mikroskopa. Ona dopunjuje „top view“ pristup sa 2D ECL prostornim mapiranjem normalnim na površinu elektrode.

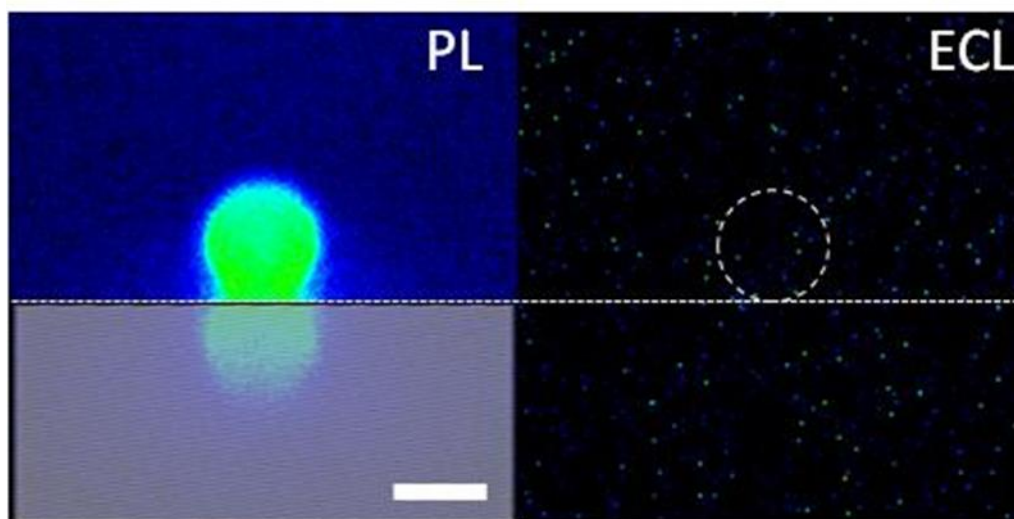
Na **Slici 5** prikazan je PL snimak sfere: gornji deo slike odgovara stvarnoj perli, a donji deo njenom odrazu koji nastaje refleksijom svetlosti sa GC površine. PL snimak precizira položaj perle i takođe njenu dodirnu površinu sa elektrodom. Kao i u „top view“ konfiguraciji, u ECL eksperimentima sa TPrA, nije zabeležena emisija svetlosti pre primene dovoljnog velikog anodnog potencijala (**Slika 4**). Na potencijalu od 1.1 V regija ECL emisije je zabeležena na dodirnoj površini između GC površine i mikro-sfere (npr.  $z=0$ ); ova regija se pruža preko  $\sim 6$   $\mu\text{m}$  dužine i obuhvata deo koji potiče od refleksiji svetlosti. Interesantno je da postoji još jedna oblast na snimku gde je zabeležena ECL pojavila, koja je locirana na vrhu PS sfere.



**Slika 6.** „Side view“ slike PS sfere prečnika 12  $\mu\text{m}$ , obeležene rutenijum markerom. Prva slika je dobijena u PL modu, a ostale u ECL u rastvoru PBS-a koji sadrži 100 mM TPrA (pH=7.4). Isprekidana linija predstavlja poziciju sfere na površini GC elektrode (tj.  $z=0$ ), a osenčena zona predstavlja PL refleksiju sfere na površini elektrode. Isti eksperimentalni uslovi su korišćeni kao i za Sliku 1. Skala: 10  $\mu\text{m}$ .

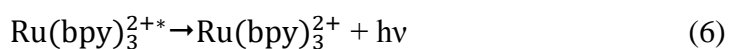
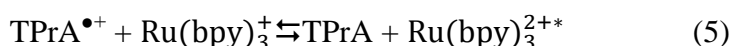
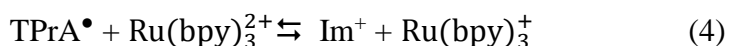
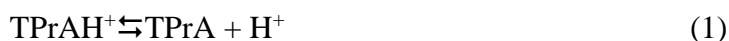
Kao što je već rečeno ranije, ova oblast se javlja zbog osobina sfere da fokusiranja svetlost i da se ponaša kao sočivo i ne sadrži nikakve realne hemijske informacije. Regija ECL emisije je bila ograničena na deo uz površinu elektrode i prostire se samo 3-4  $\mu\text{m}$  duž  $z$ -ose. U „side view“ konfiguraciji, nismo bili u mogućnosti da zabeležimo ECL emisiju koristeći DBAE kao koreaktant čak i kada je vreme ekspozicije CCD kamere povećano na 20 s (**Slika 7**). Opet, sa DBAE, region ECL emisije je verovatno veoma malo na dodirnoj površini perle i elektrode i njegov intenzitet je suviše slab da bi bio zabeležen u ovoj eksperimentalnoj postavci.





**Slika 7.** „Side view“ slike PL (levo) i ECL (desno) PS sfere prečnika 12  $\mu\text{m}$ , obeležene rutenijum markerom. ECL snimanje je realizovano tokom vremena ekspozicije od 20 s na potencijalu od 1.2 V u PBS (pH=7.4) rastvoru koji sadrži 20 mM DBAE na Au elektrodi. Isprekidane linije prikazuju poziciju sfere na površini elektrode (tj.  $z=0$ ), koja je prikazana tačkastom linijom. Osenčena zona prikazuje PL refleksiju na površini elektrode. Isti eksperimentalni uslovi su korišćeni kao i za Sliku 1. Skala: 10  $\mu\text{m}$ .

ECL mehanizami koji se odnose na direktnu oksidaciju  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  može se odigrati samo na nanometarskoj udaljenosti od površine elektrode (*eng.* electron tunnelling distance  $\sim 1$ - $2$  nm), stoga njih koje nije moguće zabeležiti klasičnim optičkim instrumentima. Mikrometarska prostiranje ECL regije usnimljenu u našim eksperimentalnim uslovima sa TPrA-om u potvrđuje postojanje „revidiranog” puta koji uključuje oba radikala TPrA.<sup>23</sup>

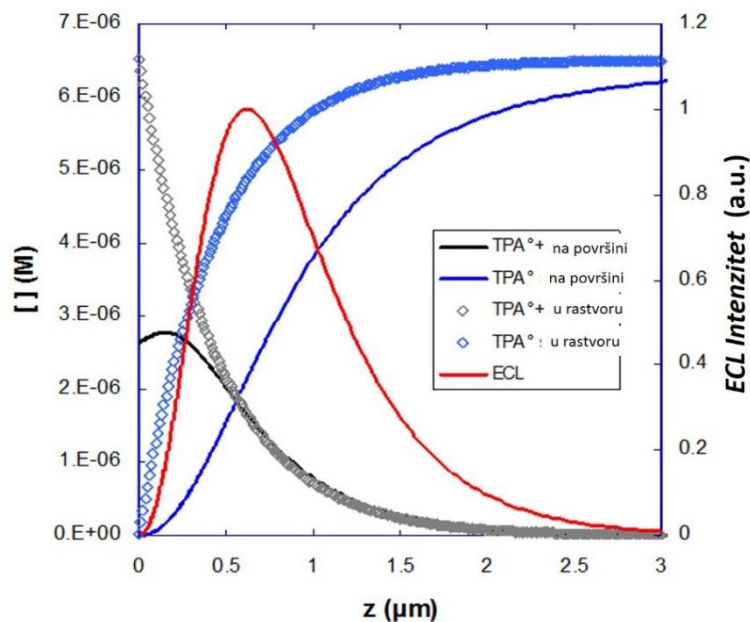


gde je  $\text{Im}^+$  označava proizvod iminijuma.

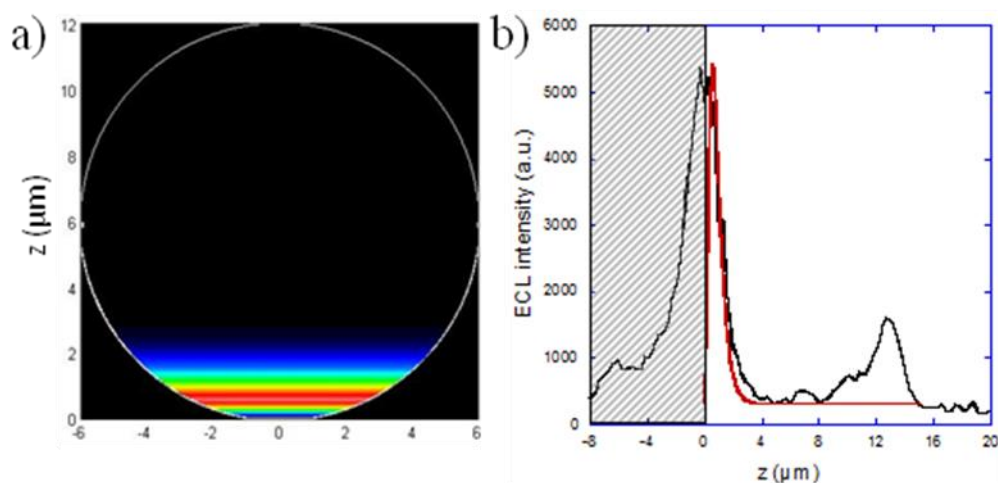
Na ovom putu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  nije direktno oksidovan na elektrodi. Oksidacijom deprotonovanog TPrA nastaje radikal katjon  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  (izraz 2); koji se brzo deprotonuje i formirajući slobodni radikal  $\text{TPrA}^{\bullet}$ ,<sup>23</sup> koji je jak redukcionni agens (izraz 3). Ovaj radikal redukuje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  (izraz4). Potom  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  oksiduje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  i nastaje pobuđeno stanje  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  (izraz5) koje se deaktivira emisijom fotona. U ovom putu generisanje ECL zahteva simultano prisustvo oba radikala sa fluksevima difuzijekoji omoućavaju formiranje pobuđenog stanje.

Polazeći od činjenice da je DBAE alifatični tercijarni amin strukturno sličan TPrA-u, predloženo je da prati mehanizam sličan TPrA-u sa formiranjem radikal katjona DBAE<sup>•+</sup> i redukujućeg intermedijera DBAE<sup>•</sup> deprotonovanjem.<sup>51-53</sup> Čak iako DBAE izaziva jači ECL intenzitet u odnosu na TPrA kada je  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kompleks prisutan u rastvoru,<sup>6</sup> ECL emisija snimljena na modifikovanim sferama je veoma niska i čak se ne može detektovati u „side view“ konfiguraciji. Takvo neočekivano ponašanje se može pripisati mnogo nestabilnim intermedijerima DBAE (tačnije najmanje 10 puta većoj brzini deprotonovanja DBAE<sup>•+</sup>) što drastično smanjuje regiju ECL emisije. Naši rezultati pokazuju različitu reaktivnost oba koreaktanta i značaj ispitivanja mehanističkih puteva ECL sa molekulskim vrstama čije je generisanje ograničeno na površinu elektrode ili „read/write“ pristupom. Uzimajući u obzir ukupnu shemu mehanizma TPrA, simulirani su profili koncentracija radikala oba ko-reaktanta koji difunduju sa elektrode i oko sfere (**Slika 8**).

Simulacije su izvedene u saradnji sa Profesorom Frederikom Kanoufijem sa Paris Detroid Univerziteta (za detalje izvođenja simulacija pogledajte propratne informacije reference 27). Prostorni položaj i proširenje regije ECL je takođe ograničeno na prvih 3- $\mu\text{m}$  visine sfereoddodirne površine sa elektrodom, što je i potvrđeno simulacijom ECL intenziteta prikazanom na **Slici 9a**. Profil ECL je ograničen koncentracionim gradijentima  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  i  $\text{TPrA}^{\bullet}$  na površini sfere. Zaista, generisanje ECL zahteva usatopne reakcije i redukujućih i oksidujućih TPrA radikala na istoj lokaciji. U stanju mirovanja, ECL na malim z vrednostima održava koncentracioni profil  $\text{TPrA}^{\bullet}$ , dok rep ECL profila na visokim z vrednostima oponaša distribuciju hemijski najnestabilnijeg radikala, što je u ovom slučaju  $\text{TPrA}^{\bullet+}$ .

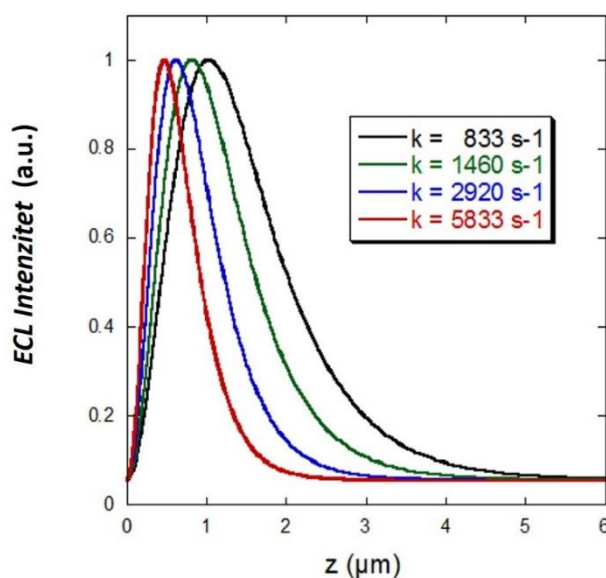


**Slika 8.** Profili koncentracije TPrA<sup>•+</sup> (crna kriva), TPrA<sup>•</sup> (plava kriva) i rezultujućeg ECL intenziteta (crvena kriva) sa kompleksom rutenijuma imobilizovanim na perili. Prikazani profili koncentracije i ECL profil su simulirani za vrednost konstante brzine deprotonovanja TPrA<sup>•+</sup> od 2920 s<sup>-1</sup>. Vrednost 2920 s<sup>-1</sup> je izvedena iz profila ECL za konstantu brzine deprotonovanja,  $k_3$ , TPrA<sup>•+</sup> (izraz 3). Uz pretpostavku da je ova reakcija proces prvog reda, vreme poluživota ( $\tau_{1/2}$ ) je  $\tau_{1/2} = \ln 2 / k_3$ . Dobija se vreme poluživota od ~0.24 ms. Profili koncentracije duž  $z$  ose u rastvoru, tj. daleko od sfera  $r > 50 \mu\text{m}$ , označeni su simbolima na grafiku.

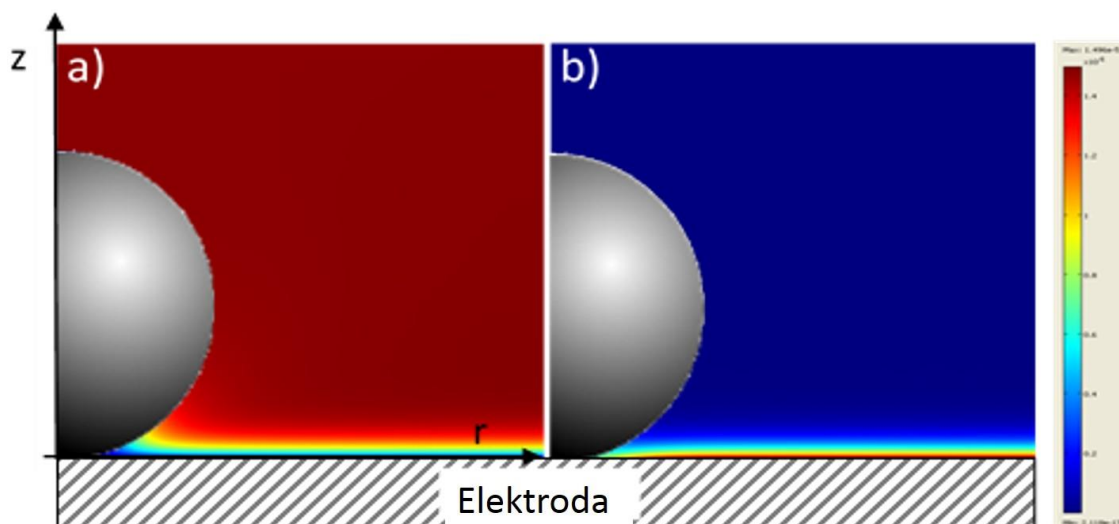


**Slika 9.** (a) „Side view“ simulirane distribucije generisanog pobuđenog stanja Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+\*</sup> (tj. ECL intenzitet) na površini 12- $\mu\text{m}$  sfere. (b) Poređenje eksperimentalnih (crna linija) i simuliranih (crvena linija) profila ECL intenziteta na nivou pojedinačne sfere. Eksperimentalni podaci odgovaraju PS sferi prikazanoj na **Slici 3a** snimljenoj na 1.1 V. ECL signali su simulirani za vrednost konstante brzine deprotonovanja TPrA<sup>•+</sup> od 2920 s<sup>-1</sup>. Osenčena zona predstavlja refleksiju ECL svetlosti sa površine elektrode.

Na **Slici 9a** (crna linija) prikazuje tipičan eksperimentalni profil ECL intenziteta uzet duž ose vertikalne simetrije PS sfere na GC elektrodi. Region ECL emisije je jasno uočljiv i okružen sa 2 svetle zone koje potiču od optičkih efekta: refleksije za  $z < 0$  i svetlosti fokusirane na vrhu perle (tj.  $z \sim 13 \mu\text{m}$ ), kao što je objašnjeno ranije. Upravo smo razmotrili zonu emisije fotona koja sadrži sve informacije o hemijskoj reaktivnosti. Projekcija simuliranog ECL profila duž iste  $z$  ose simetrije je prikazana na **Slici 9b** (crvena linija) i najbolje se uklapa sa eksperimentalnim podacima dobijenim za vrednost  $2920 \text{ s}^{-1}$  konstante brzine deprotonovanja  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  (vreme poluživota  $\sim 0.24 \text{ ms}$ ). Dobijena vrednost je u relativno dobrom slaganju sa vrednošću  $35500 \text{ s}^{-1}$  koju su dobili Miao i saradnici<sup>23</sup>.



**Slika 10.** Efekat kinetičke brzine deprotonovanog  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  na normalizovanom intenzitetu ECL profila u blizini perle prečnika  $12\text{-}\mu\text{m}$ .



**Slika 11.** Simulirani profili koncentracija (a) TPrA• i (b) TPrA•<sup>+</sup> u blizini sfere prečnika 12 μm. Izabrana vrednost konstante brzine TPrA•<sup>+</sup>deprotonovanja je bila 2920 s<sup>-1</sup>.

Ključni kinetički parameter u ovom celokupnom procesu je konstanta brzine deprotonovanja TPrA•<sup>+</sup>. Položaj maksimuma ECL intenziteta i debljina ovog emisijng regiona zavisi od vrednosti ove konstante brzine. Ukoliko je ovaj korak deprotonovanja spor, onda se TPrA•<sup>+</sup> mogu formirati dalje od elektrode što dovodi do proširenja ECL zone. U suprotnom, povećanje brzine reakcije ograničava zonu ECL emisije na blizinu elektrode (**Slika 10**). Sfera ograničava prenos različitih reaktivnih vrsta u određenoj od ometajućeg transporta mase<sup>54,55</sup>. Na taj način omogućava proširenje koncentracionih profila i regiona ECL emisije ka većim z vrednostima od onih očekivanih u reakcionom sloju tokom planarne difuzije (**Slika 11**).

### 3.1.9. Zaključak

ECL snimanje na nivou pojedinačne sfere dalo je opšti opis ECL fenomena koji se javlja u ECL biotestovima zasnovanim na perlama; omogućava dešifrovanje mehanističkog puta, testiranje efikasnosti koreaktanta i pokazuje povezane propratne optičke efekte. Mapiranje reaktivnosti demonstrira mehanističku putanju koja vodi do ECL emisije. Maksimalan ECL intenzitet se javlja u mikrometarskom regionu gde su koncentracije TPrA•<sup>+</sup> i TPrA• radikala na lokalnom nivou najveće. Samo luminofore koje se nalaze 3 μm do elektrode doprinose ECL signalu i ovaj konačni reakcioni sloj definiše optimalnu veličinu funkcionalizovanih perili za biotestove. U poređenju sa situacijom u balku (npr. Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> je prisutan u rastvoru), dodatni termodinamički i kinetičke kriterijumi treba uzeti u obzir da bi se izabrali efikasni koreaktanti u biotestovima zasnovanim na perlama: adekvatni redoks potencijali i odgovarajuće konstante

brzine deprotonovanja kako bi se formirali koncentracijski gradijenti oba radikala koji mogu simultano da difunduju preko dovoljno velike razdaljine sa ciljem da pobude  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  - markere koji su udaljeni od elektrode. Takođe smo pokazali efekat sočiva sfere koji koncentruje ECL emisiju i tako daje mogućnost odabira novih koreaktanata sa poboljšanom osetljivošću i doprinosi razvoju novih analitičkih strategija.

## 3.2. Imunoanalize i mapiranje generisanja ECL sa nasumičnim nanoelektrodnim grupama

### 3.2.1. Uvod

Od trenutka njenog otkrića, ECL je bila duboko proučavana i primenjena za detekciju velikog spectra bioloških uzoraka<sup>59</sup>. Naglasak je stavljen na razvoj novih i osetljivih analitičkih metoda i uređaja<sup>59</sup>. Važan zaokret u razvoju diagnostičkih biosenzora na polju primene<sup>38,60,61</sup> je otkriće ECL uz pomoć koreaktanata u vodenim sistemima na fiziološkom pH<sup>38,41,62</sup>. Kao dodatak već spomenutim prednostima tehnike,<sup>63-65</sup> razotkrivanje ECL mehanizama, posebno mehanističkog puta na niskim oksidacionim potencijalima, dovelaje do bitne prednosti u razvoju novih analitičkih strategija sa poboljšanom osetljivošću<sup>66</sup>.

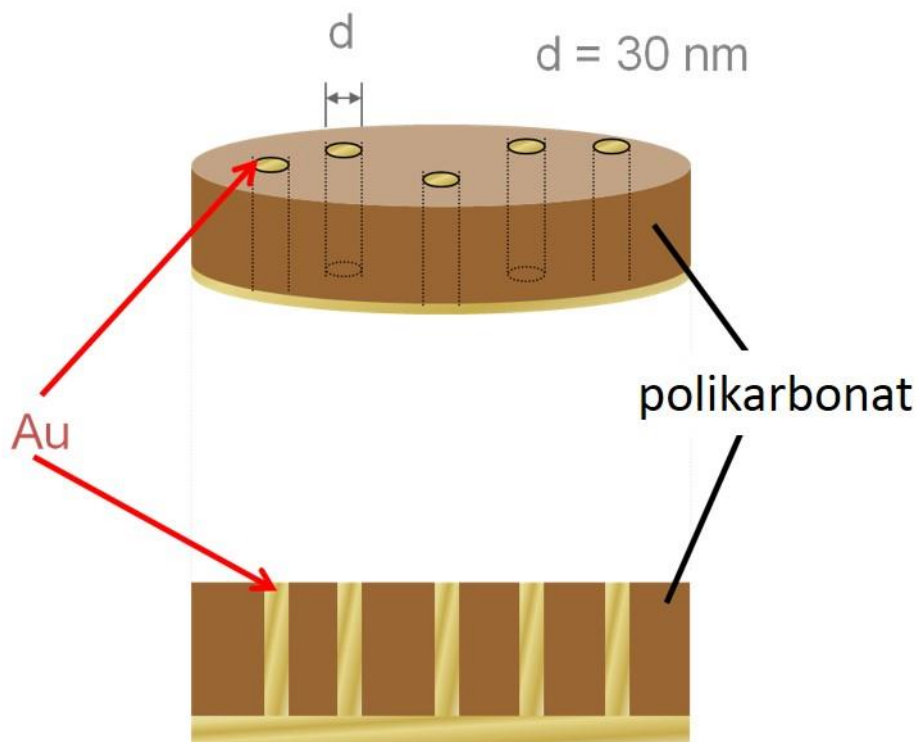
Prostorno mapiranje reaktivnosti pomoću ECL slikanja je otkrilo način na koji rutenijumski centri pozicionirani na mikrometarskoj udaljenosti od površine elektrode mogu da generišu ECL samo putem oksidacije molekula koreaktanata<sup>29</sup>. Takođe, ukazuje na važnost samog doprinosa tzv. „revidiranog” puta u ukupnom ECL odgovoru. Sa druge strane sve veće korišćenje uređaja nano veličine omogućuje dalji napredak same tehnike<sup>67,68</sup>. Napredak u primeni nanostrukturiranih elektroda npr. nasumičnih (*eng. nanoelectrode ensembles* -NEE) i regularno (*eng. nanoelectrode arrays*, NEA) uređenih nanoelektrodnih grupa na polju bioelektroanalitičkehemije, omogućio je poboljšanje osetljivosti ECL metoda zbog pojedinih prednosti takvih sistema kao što je, poboljšani transport elektroaktivnih vrsta iz ukupne zapremine rastvora (*eng. bulk*) ka površini NAA i NEA<sup>69-72</sup>. To dovodi do značajnog povećanja odnosa signal/šum. Grupa profesora Paola Ugo-a je razvila imunosenzore za određivanje koncentracije kancerskih biomarkera HER2 (receptor za ljudski epidermalni faktor rasta) i DNK hibridizaciju. Princip rada ovih imunosenzora se zasniva na imobilizacijibio-prepoznavajućeg (*eng. biorecognition*) sloja u blizini nanoelektroda, preciznije na površini izolatorskog dela elektroda (*eng. polycarbonate – PC*)<sup>73-75</sup>. U takvoj konfiguraciji, poboljšani transport mase tipičan za nanoelektrode je u potpunosti iskoristiv. Nasuprot klasičnom

konceptu bioelektrosenzora<sup>76-78</sup>, u ECL baziranim biosenzorima imobilizacija biomolekula obeleženih luminoforama namaloj udaljenosti od aktivne površine nanoelektrode omogućava da se ECL generiše na niskom oksidacionom potencijalu. Primenom tako niskih elektrodnih potencijala dobijaju se sledeće prednosti: izbegava se hemijsko i strukturno oštećenje osetljivih molekula kao što su proteini i oligonukleotidi; smanjuje se interferencija sporednih proizvoda posebno u realnim uzorcima kompleksnih matriksa (npr. krv); sprečava se formiranje površinskog oksidnog sloja u slučaju upotrebe elektroda od platine i zlata<sup>62</sup>. Sve ovo inače može imati uticaj na slabu reproduktivnost rezultata. Kombinujući gore navedena svojstva ECL tehnike i NEEs, u ovoj oblasti ćemo prezentovati naš poslednji doprinos dizajniranju novih imunoeseja za dijagnostiku autoimunog oboljenja koje se naziva celijakija. Pacijenti oboleli od celijakije su netolerantni na protein žitarica, gluten (ima ga u pšenici, ječmu, ovsu). Enzim koji bi trebalo da razlaže gluten, tkivna transglutaminaza, tačnije deo njegovog lanca koji se zove glijadin je defektan i stoga nefunkcionalan. Čitavi molekuli glijadina prodiru u ćelije tankog creva i potom započinje imunološka – autoimuna reakcija u kojoj organizam stvara antitela protiv kompleksa glijadin–tkivna transglutaminaza. To za posledicu ima destrukciju ćelija tankog creva i teško oštećenje sluzokože tankog creva u strukturalnom i funkcionalnom smislu. Iako biopsija tkiva još uvek predstavlja „zlatni standard” za pouzdanu dijagnozu ove autoimune bolesti, mnogi naporu su učinjeni u cilju razvijanja različitih elektrohemisjskih metoda<sup>60,77-79</sup>, ali do sada nijedna nije prihvaćena za praktičnu upotrebu. Serološki testovi su kao i slučaju našeg biosenzora bazirani na detekciji autoantitela protiv tkivne transglutaminaze (tTG)<sup>80</sup>.

### 3.2.2. Sintaza neuređenih nanoelektrodnih grupa

Nanoelektrode se mogu definisati kao elektrode koje imaju najmanje jednu dimenziju (nazvanu kritična dimenzija) u nanometarskom opsegu. Prva templatna sinteza NEE za elektrohemisjsku upotrebu je opisana od strane Menon-a i Mertin-a<sup>69</sup> koji su deponovali zlatna nanovlakna sa dijametrom od 10 do 30 nm unutar porozne strukture „track-etched” polikarbonatne membrane hemijskim putem. Grupa metlanih nanodiskova nasumično raspodeljenih u izolatorskom sloju polimera shematski je prikazana na **Slici 1**. Ukoliko raspored nanodiskova nije slučajan onda se govori o nano-elektrodnim zracima -NEA. Pošto su sve nanoelektrode međusobno povezane u jedan sistem ceo uređaj se prema tome ponaša kao zbir pojedinačnih elektrohemisjskih senzora nano-veličine.

Membranska sinteza se zasniva na ideji da se pore materijala (u slučaju koji je prikazan an **Slici 1.** reč je o polikarbonatnoj membrani) koriste kao matrica čija je uloga da usmeri elektroprovodni material koji se ciljano deponuje unutar pora. U sintezi nanoelektroda svaka pora membrane je na kraju popunjena metalnim nano-žicama ili nano-vlaknima. Rast metalnih vlakana se može postići elektrohemijском<sup>81</sup> ili hemijskom depozicijom<sup>14,31,32</sup>.



**Slika 1.** Shematski dijagram nasumično distribuiranih nano-elektroda unutar porozne structure membrane izgrađene od plikarbonata.

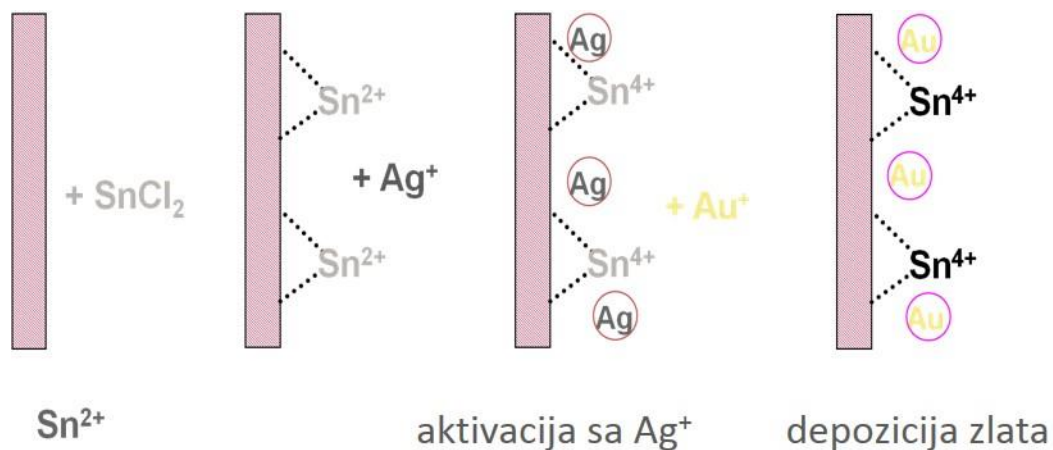
U slučaju obe depozicione tehnike (elektrohemijske i hemijske), gustina pora (tj. broj pora po jediničnoj površini) koje su prisutne u templatu određuje broj metalnih nano-elektrodnih elemenata na površini NEE i prosečnu udaljenost između njih. Pri tome prečnik pora određuje konačan prečnik pojedinačnih nano-elektroda. Komercijalno su dostupne membrane sa porama čiji prečnika varira od 10 nm do 10  $\mu\text{m}$ . Elektrohemijska depozicija unutar pora nano-porozne membrane zahteva elektro-provodljivost jedne strane membrane. Depozicija se može odvijati pod potenciostatskim ili galvanostatskim uslovima. Templatna elektrohemijska depozicija se odvija u elektrohemijskoj ćeliji u kojoj sama membrana presvučena elektroprovodnim slojem igra ulogu katode dok je anoda kontra elektroda. Elektrodepozicija metala se koristi kod dobijanja nano-žica ne samo zlata već i drugih metala.



Bez-elektrodna (*eng. electroless*) depozicija uključuje hemijsku redukciju jona metala koji su prisutni u rastvoru na površini porozne membrane<sup>69</sup>.

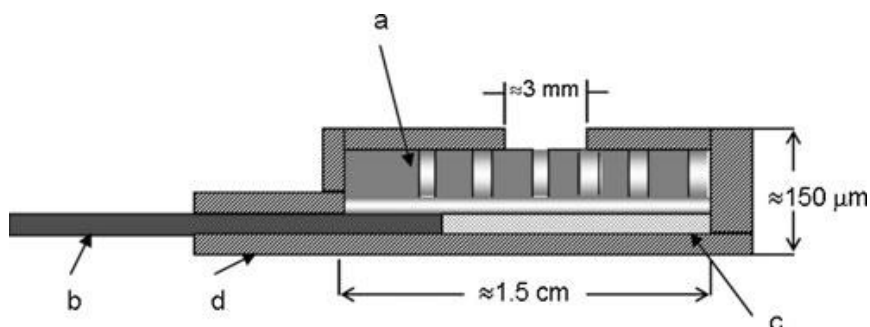
Bez-elektrodna sinteza nano-elektroda može se sumirati u nekoliko koraka (**Slika 2.**):

1. Senzitivizacijamembrane, pri čemu  $\text{Sn}^{2+}$  joni bivaju adsorbovani na površini supstrata,
2. Depozicija srebrnih nano-čestica na površini membrane kroz redukciju  $\text{Ag}^+$  rastvora od strane adsorbovanih  $\text{Sn}^{2+}$  jona,
3. Galvanska zamena prethodno sintetisanih Ag čestica putem redukcije  $\text{Au}^+$  jona u rastvoru,
4. Katalitička redukcija zlata na deponovanim kristalizacionim nukleusima, pomoću drugog redukujućeg agensa (npr. formaldehida).



**Slika 2.** Shematski prikaz bez-elektrodne depozicije

Konačna struktura NEE je prikazana na **Slici 3**. Površina koja je u kontaktu sa rastvorom definiše geometrijsku površinu NEE-a ( $A_{geom.}$  - ukupna površina nanodiskova kojoj je dodata površina izolatora koji se nalazi između nanoelektroda).



**Slika 3.** Shematski prikaz preseka NEE pripremljenog pomoću polikarbonatne membrane kao matrice: (a) membrana u čijim porama je hemijski ili elektrohemijski deponovano zlato; (b) lepljiva bakarna traka sa provodnim lepkom koji povezuje NEE sa potenciostatom/galvanostatom; (c) lepljiva aluminijumska folija premazana slojem elektro-neprovodnog lepka; (d) izolujuća traka. Napomena: dimenzije pora (nano-vlakana) nisu prikazane u pravoj razmeri<sup>82</sup>.

### 3.2.3. Sinteza uređenih nanoelektrodnih zraka (NEA)

Tehnike kao što su litigrafija elektronskim snopom (*eng. electron beam lithography* (EBL)<sup>83</sup>), litografija<sup>67</sup> jonskim snopom (*eng. ion beam lithography*) inano-imprinting<sup>83</sup> omogućavaju formiranje nanostrukture visokih rezolucija putem preciznog pozicioniranja i samanjena dimenzija na nanometarske. To se može postići pomoću tehnika čiji se princip može opisati pomoću sledeća tri koraka<sup>67,83,84</sup>:

- Premazivanje supstrata slojem foto-, elektron- ili jono-osetljivog polimera (*eng. photoresist*),
- Izlaganje tako pripremljenog supstrata svetlosnom, elektronskom ili jonskom snopu,
- Razvijanje kontrastne slike pomoću odgovarajućih hemikalija.

### 3.2.4. Elektrohemija NEE i NEA

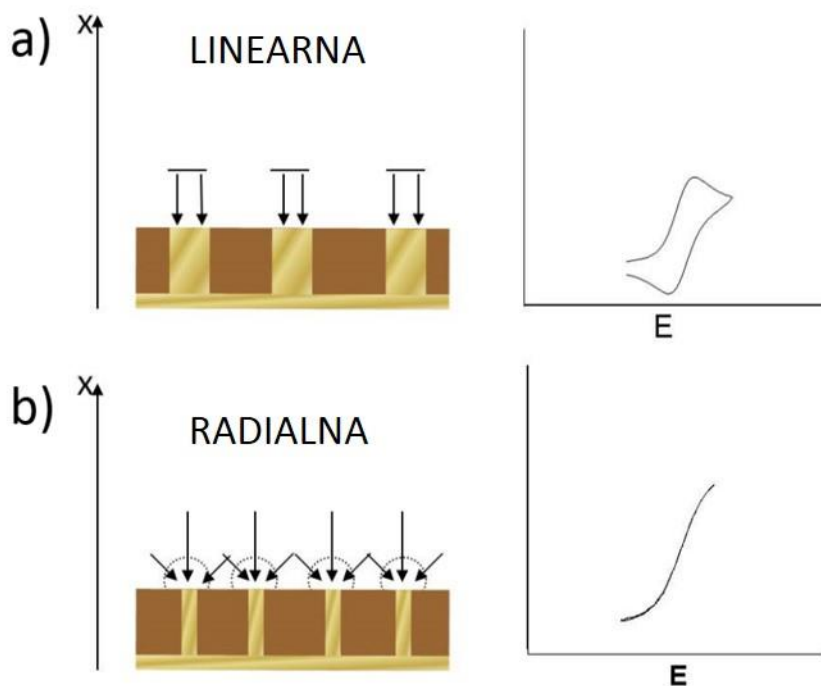
NEE/NEA se mogu smatrati skupom ekstremno malih ultramikroelektroda međusobno odvojenih električnim izolatorom<sup>85</sup>. Ultramikroelektrodama se smatraju elektrode kod kojih najmanje jednadimenzija manja ili jednaka debljini difuzionog sloja ( $d_{diff.} < 25 \mu m$ )<sup>86</sup>.

Zbog tako malih dimenzija, efekat ivice elektrode postaje značajan i difuzija iz rastvora ka površini elektrode postaje radijalna umesto jednostavnije geometrije u slučaju elektroda

makroskopskih dimenzija ( $\varnothing > 100 \mu\text{m}$ ), kao što je prikazano na **Slici 5**. Linerna difuzija na makroelektrodama je odgovorna je za izgled voltamograma sa karakterističnim pikovima čiji položaj odgovara elektrodnom potencijalu na kome se neka redoks vrsta oksiduje ili redukuje. Vrednost jačine struje pika ( $I_p$ ) u sistemima sa linearnom difuzijom data je Randles-Ševčikovom jednačinom:

$$I_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A_{\text{geom.}} v^{1/2} D^{1/2} c^b \quad (1)$$

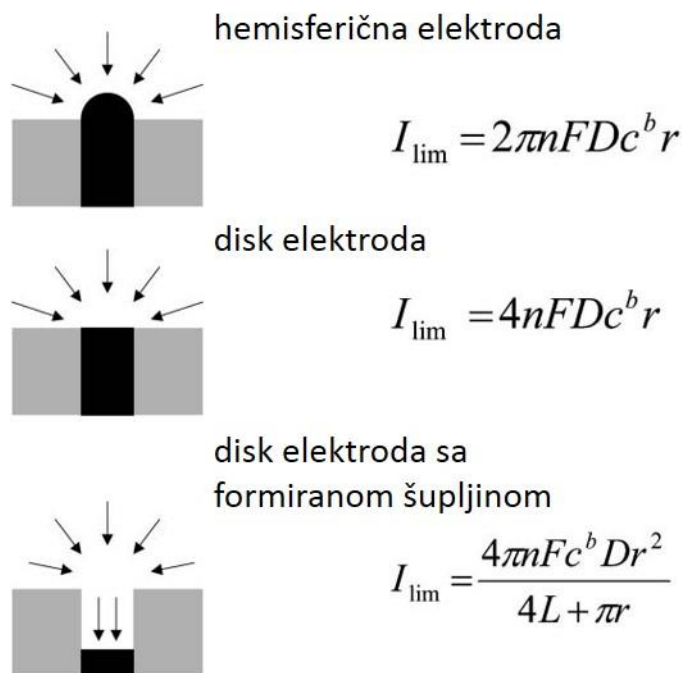
Gde je  $n$  broj transferovanih elektrona,  $A$  je geometrijsko polje elektrode,  $c$  je koncentracija,  $D$  je difuzioni koeficijent i  $v$  je brzina skeniranja.  $F$ ,  $R$  i  $T$  imaju svoja uobičajena značenja<sup>86</sup>.



**Slika 5.** Shematski prikaz linearne (a) i radijalne (b) difuzije sa odgovarajućim voltamogramima<sup>87</sup>.

Pri uslovima radijalne difuzije voltamogrami su sigmoidalnog oblika pri čemu je granična difuziona struja direktno proporcionalan koncentraciji analita. Zapravo, zbog male veličine nano-elektroda, sferno difuziono polje (trodimenzionalno) se lako i brzo uspostavlja pri čemu snimljeni steady-state (stabilni) voltamogrami poseduju sigmoidni oblik. Oblik voltamograma je nezavisan od geometrije nano-elektrode<sup>87</sup>.

Generalno, kritični parametar za nano-elektrode (npr. površina diska) može se dobiti teorijskim putem korišćenjem odgovarajućeg modela za steady-state struju. Na slici 6 su prikazani različiti difuzioni modeli sa jednačinama za steady-state struje za hemisferični difuzioni model i odgovarajuća steady-state struja (limitirajuća struja) jednačine za hemisferičnu, disk i disk elektrodu sa formiranom šupljinom<sup>67</sup>.

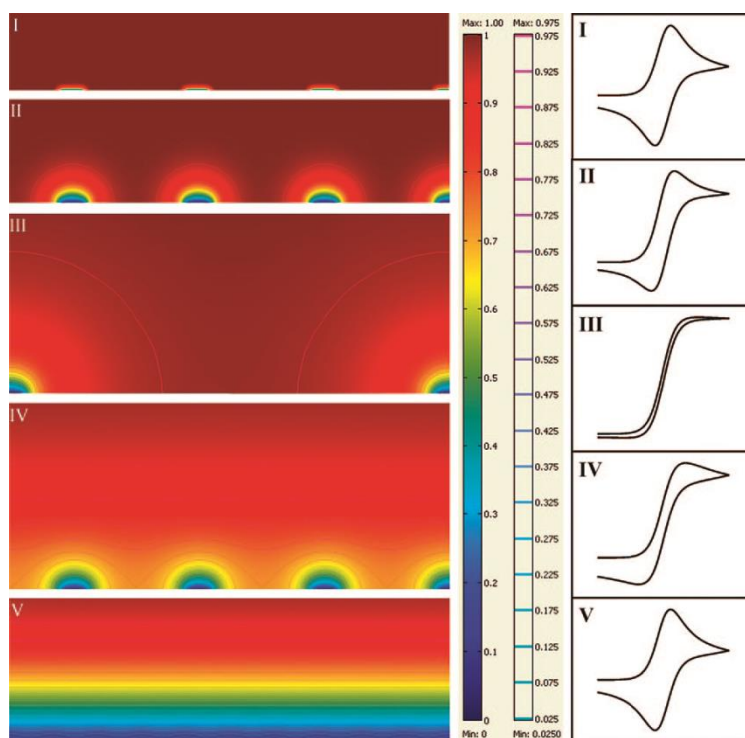


**Slika 6.** Prikaz tri najvažnije elektrodne geometrije (hemisferična elektroda, disk elektroda i disk elektroda sa formiranom šupljinom) sa izrazima za izračunavanje intenziteta granične steady-state struje gde su:  $r$  – radijus elektrode,  $L$  – dubina ulegnuća elektrode dok  $c$ ,  $F$  i  $R$  imaju uobičajena značenja<sup>67</sup>.

Smanjivanjem dimenzija elektrode sa mikrometarskih na nanometarske, proučavanje brzih elektrohemijskih i hemijskih reakcija postaje moguće. Razlog tome leži u veoma brzom transportu mase iz ukupne zapremine rastvora ka površini elektrode što dovodi do toga da proces transfera elektrona nije limitiran transportom elektro-aktivnih vrsta<sup>88,89</sup>. Na taj način se steady-state odgovor sistema može dostići što utiče na dramatično smanjenje kondenzatorske struje. Glavni nedostatak u vezi sa upotrebom individualnih nano-elektroda je veoma niska vrednost jačine struje generisane na elektrodama tih dimenzija. Iz tog razloga, razvoj NEE u kome sve nano-elektrode rade istovremeno je od velikog značaja.

Šta više, NEE/NEA mogu da rade u različitim difuzionim režimima. Prema propisanom modelu od strane Guo-a i Linder-a<sup>90</sup>, difuzioni režimi koji se dešavaju na grupama ultramikroelektroda mogu se podeliti na pet kategorija (**Slika 7**) u zavisnosti na brzinu skeniranja ili reciprociteteta među-elektrodnog rastojanja:

- 1) Planarna difuzija na svakoj mikroelektrodi,
- 2) Mešovita difuzija na svakoj mikroelektrodi (tranzicija između planarne i hemisferične/radijalne difuzije),
- 3) Difuzija preko svake hemisferične mikroelektrode,
- 4) Difuzija pomešana sa početkom preklapanja difuzionih slojeva,
- 5) Planarna difuzija preko čitave skupine elektroda (ukupna preklapajuća difuzija).



**Slika 7.** Simulirani koncentracijski profil sa prikazanim izokonturacijama koje se prostiru preko ultramikroelektrodne skupine predstavljajući pet glavnih kategorija difuzionih modela (kategorije I-V). Na legendi boja (prva skala), crvenom je označena koncentracija elektroaktivne vrste u ukupnoj zapremini rastvora dok je plavom bojom prikazana nulta koncentracija. Druga skala predstavlja skalnu relativnih koncentracija za date konturine linije. Tipični ciklični voltamogrami, koji su dobijeni za svaki od prikazanih difuzionih profila, predloženi su od strane Guo-a i Linder-a i prikazani su na desnom delu slike<sup>90</sup>.

Za ultramikroelektrode, debljina  $\delta(t)$  difuzionog slojakoji je uspostavljen u okolini površine elektrode dat je jednačinom 2:

$$1/\delta(t) = [1/(\pi Dt)^{1/2}] + 1/r \quad (2)$$

$t$  je vreme eksperimenta,  $r$  je radius elektrode. Dok se smanjuje veličina elektrode, debljina difuzionog sloja se po svojoj vrednosti približava dimenzijama elektrode. Intenzitet steady-state difuziono-kontrolisane granične struje obrnuto je proporcionalan debljini difuzionog sloja sto se može zapisati kao:

$$I(t \rightarrow \infty) = nFAc^b/\delta(t \rightarrow \infty) \quad (3)$$

gde je  $A$  površina elektrode.

Kao što je prethodno navedenobkarakteristike vremenski-zavisnog difuzionog profila NEE/NEA najviše zavise odmeđu-elektrodnog rastojanja  $d/r$  (gde  $d$  predstavlja rastojanje između centara nanoelektroda dok je radijus elektroda obeležen sa  $r$ ) kao i od brzine skeniranja od koje zavisi vreme izvođenja elektrohemijskog eksperimenta.

U slučaju velikih među-elektrodnih rastojanja (veliki odnos  $d/r$ ) ili kod velikih brzina skeniranja, difuzija elektroaktivnih vrsta ka svakoj eelektrodi ponaosob ostaje nezavisna i linearna difuzija će biti predominantna na svakoj elektrodi (slučaj I, voltamogram sa oksidacionim i redukcionim pikovima)<sup>83</sup>. Ovo je režim koji daje visoku Faradejskustruju i zbog toga predstavlja režim izbora u cilju postizanja niskih limita detekcije kada ne postoje ograničenja u pogledu povećanja razmaka između elektroda.

Kada se granice radijalnih difuzionih slojeva potpuno preklape npr. kada je difuziona hemisfera veća od srednje poludistance među nanoelektrodama, NEE/NEA se ponašaju kao makroelektrode u odnosu na faradejsku struju koja se može generisati na njihovoj površini potpuno preklapanje difuzionih slojeva rezultuje izgledom voltamograma sa pikovima (slučaj V) pri čemu je struja jačine pika mnogo veća nego u slučaju voltamograma prikazanog u slučaju I. Prema tome, difuziono kontrolisana struja će biti proporcionalna geometrijskoj površini  $A_{geom}$  NEE ili NEA (npr. aktivna elektrodna površina kao i međuelektrodna izolacija, jednačina 4.).Nasuprot tome, pozadinska tj. kondenzatorska struja je proporcionalna jedino aktivnoj površini nanoelektroda,  $A_{active}$ , za razliku od konvencionalnih elektroda (CE) (jednačina 6)<sup>87,91</sup>.

$$\text{Faradejska struja na CE/NEE : } I_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A_{geom} v^{1/2} D^{1/2} c_b \quad (4)$$

$$\text{Pozadinska struja na NEE : } I_c = A_{\text{active}} \nu C_d \quad (5)$$

$$\text{Pozadinska struja na CE : } I_c = A_{\text{geom}} \nu C_d \quad (6)$$

kombinacijom jednačina (4)–(6), može se dobiti odnos:

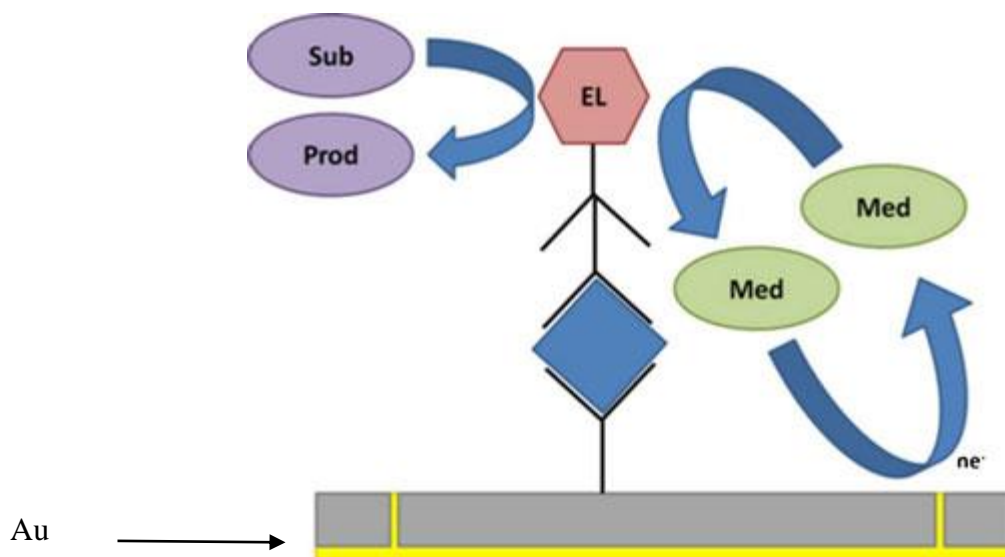
$$(I_p/I_c)_{\text{NEE}} = (I_p/I_c)_{\text{conv}} \times (A_{\text{geom}}/A_{\text{active}}) = (I_p/I_c)_{\text{conv}} / (A_{\text{active}}/A_{\text{geom}}) \quad (7)$$

$$f = \frac{A_{\text{active}}}{A_{\text{geom}}} \quad (8)$$

gde je  $C_d$  kapacitet dvojnog električnog sloja, a  $f$  je veličina recipročna površini elektrode. Ovo znači da efektivno povećanje odnosa signala (difuzijom kontrolisana struja) i šuma (pozadinska struja) dostignuto.

Ovo predstavlja važan napredak u analitičkoj upotrebi NEA i NEE iz razloga što smanjenje pozadinskog 0 reda veličine u odnosu na konvencionalne mikroelektrode<sup>70,91</sup>, čini ih veoma pogodnim za detekciju elektroaktivnih vrsta u niskim koncentracijama. Osim toga, sa elektrodama napravljenim putem bez-elektrodne depozicije zlata unutar pora nano-poroznih PC membrana<sup>69,70,72</sup>, dijametar pora i gustina pora osnove određuje broj i površinsku gustinu Au-nano-elektroda. NEE napravljene upotrebom komercijalno dostupnih templatnih membrana imaju visoku gustinu nano-elektroda sa više  $10^8$  nanoelektroda po  $\text{cm}^{-2}$ . Kao posledica toga, ove NEE rade u režimu totalnog preklapanja njihovog pojedinačnog elektrohemijskog odgovora pri čemu proizvodi elektrohemijskih procesa homogeno difunduju od površine elektroda ka ukupnoj zapremini rastvora. Nedavno, ove prednosti NEE su iskorišćene u cilju razvoja elektrohemijskih biosenzora u kojima je velika količina bioprepoznavajućih slojeva imobilizovana direktno na PC sloj NEE<sup>70</sup>. Kod takvog dizajna, korisni elektroanalitički signal je osiguran u prisustvu rastvora supstrata i/ili redoks mediatora koji tokom svoje difuzije preko celokupne geometrijske površine NEE, može predati elektrone redoks markerima koji su vezani za bio-prepoznavajuću sloj<sup>68</sup>. Prema ovoj ideji Pozzi *et al.* su razvili imunosenzor za određivanje receptora humanog epidermalnog faktora rasta, HER2, kod koga je specifični vezujući agens imobilizovan na templatnu osnovu polikarbonata<sup>75</sup>. U slučaju kancera dojke protein HER2 je prisutan u velikoj količini što uzorkuje da se broj ćelija kancera povećava nekontrolisano. Mehanizam detekcije ovog proteina je prikazan na **Slici 8**. Prvo, monoklono antitelo anti-HER2 (pod komercijalnim nazivom Herceptin) je imobilizovano na površinu polikarbonata NEE. Funkcionalna NEE je potom inkubirana sa uzorkom kako bi se ostvarilo vezivanje targetnog proteina HER2. Na kraju, vezani protein interaguje sa primarnim

(monoklonalni CB-11) i sekundarnim antitelom koje je obeleženo peroksidazom (HPR) izolovanom iz korena rena.



**Slika 8.** Shematski prikaz HER2 detekcionog mehanizma. Specifično antitelo je prvo vezano za polikarbonat kako bi se omogućilo vezivanje ciljanog proteina (plavi romb). Primarno antitelo se nadalje vezuje za protein za koji se u krajnjem koraku vezuje sekundarno (enzimski obeleženo) antitelo (EL)<sup>75</sup>.

Biosenzor je tada uronjen u fosfatni pufer (koji u ovom slučaju ima i sekundarnu ulogu osnovnog elektrolita) koji sadrži HRP supstrat (npr. vodonik-peroksid) i redoks medijator metilensko plavo, koji posreduje i značajno pospešuje prenos elektrona između aktivnog mesta enzima i površine elektrode. Sličan pristup je primenjen kod elektrohemijske detekcije DNK sekvence za genotipizaciju virusa<sup>18,19</sup> i ligand proteina od interesa za dijagnostiku kulturnog nasleđa<sup>92</sup>. U ovom poglavlju smo predstavili prednosti oba, ECL i NEE svojstva koja su iskorišćena za razvoj viskoosetljivih senzora za detekciju biomarkera celijakije.

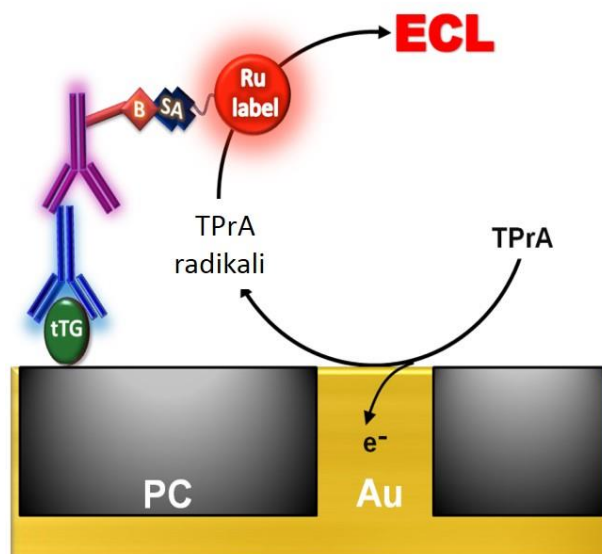
### 3.2.6. Viskoosetljivi ECL senzori za biomarkere celijakije

Celijakija (CD) je autoimuni poremećaj ostavlja posledicena gastrointestinalni trakt i karakteriše se upalom malog intestina (tankog creva) tokom digestije glutena, proteina koji je sačinjen od glaidina i gluteina<sup>80</sup>. Prevalenca CD približno iznosi 1% ukupne populaciju<sup>93</sup> sa rastućim trendom tokom vremena<sup>94</sup>. U slučaju pojedinih pacijenata simptomi mogu ostati neispoljeni tokom perioda od nekoliko godina dok klinička slika CD varira od blage do veoma ozbiljne.



Kalsični simptomi uključuju gastrointestinalne tegobe (npr. diareja) mad su poznati i van-intestinalni simptomi koji se manifestuju stanjima kao što su osteoporoza<sup>95</sup>, *dermatitis herpetiformis*<sup>96</sup>, psihičkim i neurološkim poremećajima<sup>97</sup>, artritism<sup>98</sup>, kardijačnim<sup>99</sup> i poremećajima u ishrani<sup>100</sup>. Rana dijagnostika i prelazak na bez-glutenski način ishrane smanjuje mogućnost pojave poremećaja koji su povezani sa CD. Zbog velike zastupljenosti celijakije kao i stanja koja su izazvana njenom kasnom dijagnostikom, nekoliko jednostavnih, jeftinih i brzih imunotestova je napravljeno sa ciljem da se sa uspešnim i ranim otkrivanjem ove bolesti u laboratorijama fizičara<sup>101,102</sup>. Tkivna transglutaminaza (tTG) predstavlja glavni autoantigen koji aktivira dalju proizvodnju antitela. Određivanje koncentracije anti-tTG antitela u serumu, i imunoglobulina IgA i IgG, obezbeđuje moćan alat u dijagnostici ove bolesti<sup>103</sup>. Do danas nijedna serološka metoda nije prihvaćena za svakodnevnu upotrebu, mada je do sada bilo dosta pokušaja da se razvije širok spektar analitičkih metoda uključujući i elektrohemijske<sup>3,22,23,25,57</sup>. Zahvaljujući svojoj uspečnosti na polju seroloških analiza, ECL predstavlja obećavajuću analitičku metodu koja bi mogla uspešno da se koristi za CD skrining<sup>104</sup>.

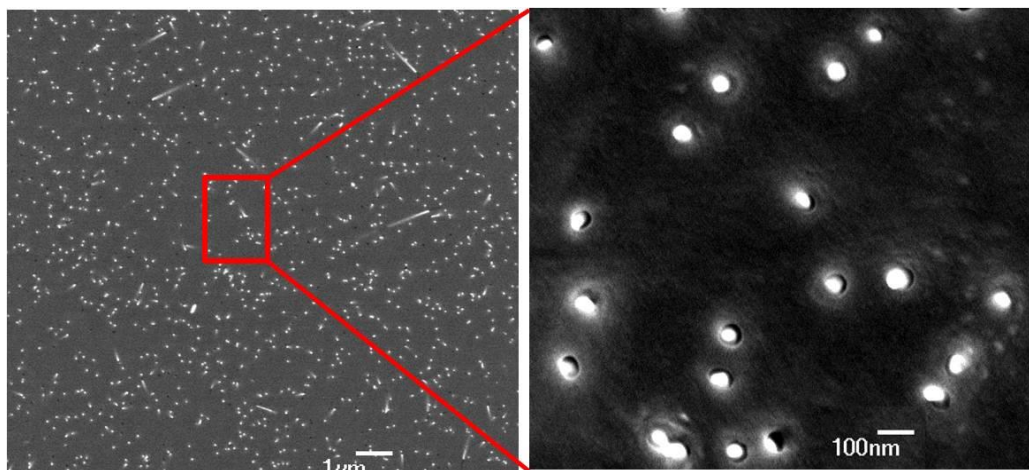
Način na koji ECL može da se koristi kao metod detekcije željenih analita (npr. anti-tTG) u kombinaciji sa NEE prikazan je na **Slici 12**. Prvo, vezujući agent tTG je imobilizovan napovršinu PC/NEE tako da prilikom inkubacije reagovati sa uzorkom, potencijalno prisutnim i ciljanim anti-tTG analitom. Bio-prepoznavajući lanac se nastavlja u reakciji sabiotinilovanim sekundarnim antitelom (sec-Ab-Bt) koje se vezuje za anti-tTG. Konačno, streptavidin Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>derivat(SA-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>), se koristi kao ECL marker koji će se vezati za senzor u slučaju pozitivnog analitičkog odgovora. ECL emisija je aktivirana dodatkom koreaktanta, TPrA. Zahvaljujući optimizovanoj arhitekturi biosenzora, osidovani TPrA deluje kao korekatant i redoks medijator istovremeno. Oksidovani radikali koji su generisani na elektrodama(TPrA<sup>•+</sup> i TPrA<sup>•</sup>) difunduju ka PC delu NEE senzora, kako bi obezbedili *in fine* ECL signal u reakciji sa nedifundujućim rutenijum centrima.



**Slika 12.** Shematski prikaz mehanizma detekcije anti-tTG. Vezujući agent, tTG, je prvo imobilizovan na površinu PC kako bi ostvario vezivanje sa željenim anti-tTG (plavo antitelo). Biotinilovano sekundarno antitelo (sec-Ab-Bt, ljubičasto antitelo) se vezuje za analit i u narednom stupnju streptavidin modifikovanim  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ( $\text{SA-Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) koji služi kao ECL marker.

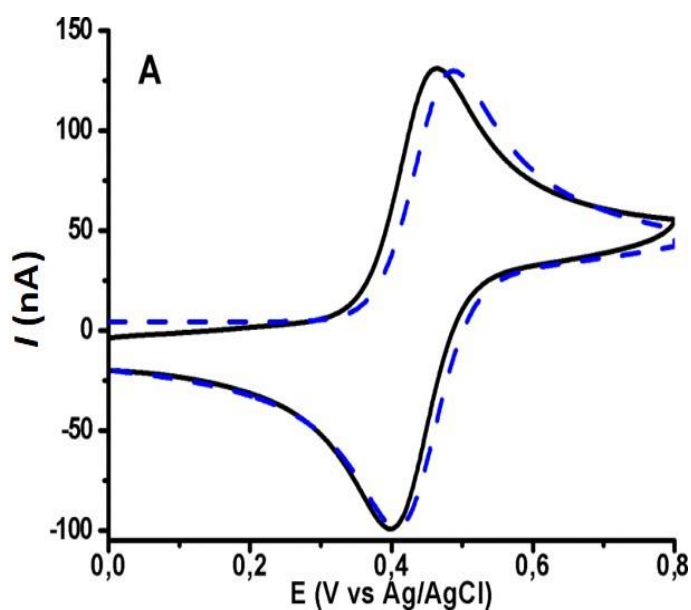
### 3.2.7. NEE karakterizacija

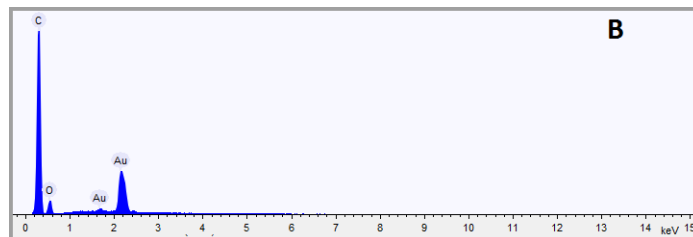
Karakterizacija NEE je prethodila njihovoj upotrebi za imunosenzore. FE-SEM slike NEE koje su pripremljene bez-elektrodnom depozicijom zlata u pore track-etched PC membrane kao osnove su prikazane na **Slici 13.**<sup>31,44-46</sup> NEEs su naravnjene kao što je prethodno opisano u poglavlju 4.2. od strane H. Habtamu i M. Ongaro sa Univerziteta Ca' Foscari u Veneciji. Pore PC templata su ispunjene nano-žicama od zlata čiji gornji sloj u obliku diska ( $r \approx 50$  nm), „izranja” iznad površine PC osnove.



**Slika 13.** Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja (*eng. Field emission scanning electron microscopy -FE-SEM*) NEE snimljenim na različitim uvećanjima.

Udaljenost između nano-elektroda varira između 100 i 400 nm. Gustina nano-elektroda dobijena jena osnovu više različitih FE-SEM slika I iznosi  $5 \times 10^8$  elektroda  $\text{cm}^{-2}$ . Svi ovi morfološki podaci se pokalapaju sa ranijim izveštajima<sup>71</sup>. Karakterizacija NEE izvršena je metodom ciklične voltametrijue 0,1 mM (ferocenilmetil)-trimetilamonijum heksafluorofosfatu ( $\text{FA}^+$ ,  $\text{PF}_6^-$ ). Dobijeni rezultati su u saglsnosti sa teorijskim očekivanjima za NEE. To znači da NEE funkcioniše u uslovima potpuno-preklopljenih difuzionih slojeva pojedinačnih nanoelektroda kao što je očekivano<sup>31</sup> (**Slika 14a**). Rezultati prikazani na slici 14B jasno pokazuju da na površini NEE nema prisutnih nečistoća.

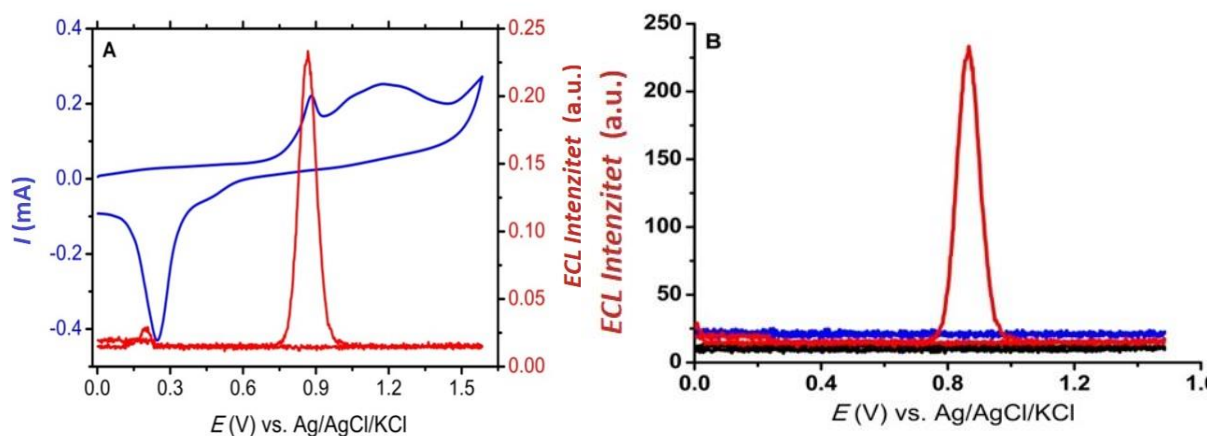




**Slika 14.** A) Eksperimentalni (puna linija) i simulirani (isprekidana linija) ciklični voltamogrami snimljeni u  $100\mu\text{MFA}^+\text{PF}_6^-$ ,  $0.05\text{M}$  fosfatnom puferu pH 6.8 pri brzini skeniranja od  $50\text{mV/s}$ ,  $A_{\text{geom}}$  od  $0.07\text{ cm}^2$  upotrebom NEE. Dodatni parametri korišćeni za digitalnu stimulaciju:  $E^\circ = 0.44\text{ V}$ ,  $k^\circ = 0.007$  i  $D = 4 \times 10^{-6}\text{ cm}^2\text{ sec}^{-1}$  gde  $E^\circ$  je formalni potencijal,  $k^\circ$  je standardna heterogenakonstanta brzine elektronskog transfera i  $D$  je difuzioni koeficijent. B) Rezultati površinske analize hemijskog sastava NEEs metodom skenirajuće elektronske mikroskopije sa disperzijom energije X-zraka (SEM-EDS)

### 3.2.8. Voltametrijska i ECL karakterizacija imunosenzora

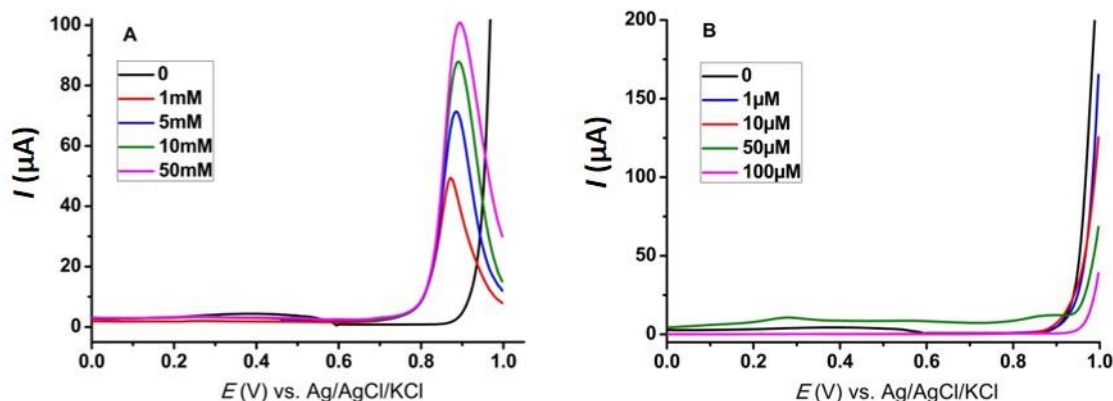
Shematski prikaz načina na koji senzor funkcioniše dat je na **Slici 12**. U prvom koraku, tTG anitgen je imobilizovana na PC komponentu NEE putem formiranja amidne veze između molekula proteina i karboksilne grupe na površini PC<sup>18,20,45</sup>. tTG-NEE je u narednom koraku blokiran pomoću 1%-tnog rastvora goveđeg serum albumina (BSA) kako bi se izbegla nespecifična vezivanja na slobodnim vezujućim mestima PC i Au. Blokiran tTG-NEE je nadalje inkubiran u rastvoru uzorka koji sadrži anti-tTG. Nakon koraka pranja sa PBS-Tween puferom (*eng. phosphate buffered saline*), vezano primarno antitelo je kuplovano sa biotinirovanim kozjim anti-mišijim (ili anti-ljudskim) sekundarnim antitelom. Konačno, Ru(bpy) kompleks je inkorporiran preko biotin-streptavidin afinitetnog vezivanja sa ciljem detekcije i kvantifikacije analita. Nakon dodavanja TPrA u rastvor elektrolita, ECL odgovor je dobijen skeniranjem potencijala između 0 V i 1,6 V nasuprot Ag/AgCl elektrode pri brzini skeniranja od  $100\text{mV/s}$ . Ciklični voltamogrami i ECL kriva za anti-tTG su prikazani na **Slici 15**.



**Slika 15.** A) ciklični voltamogram (plava kriva) snimljen pri brzini skeniranja od  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  i odgovarajući ECL signal (crvena kriva) anti-tTG imunosenzora u  $0,1\text{M}$  PBS rastvoru ( $\text{pH}=7,4$ ) koji sadrži  $0,1\text{M}$  TPrA; B) ECL krive samog NEE u pomoćnom elektrolitu (crna kriva), negativna kontrolna proba bez dodatog anti-tTG (plava kriva) i imunosenzor (crvena kriva) u rastvoru kao na slici A.

ECL kriva na **Slici 15A**, pokazuje prisustvo jednog intenzivnog ECL pika, detektovanog na elektrodnom potencijalu od  $+0,87\text{ V}$  (*vs.* Ag/AgCl) tokom anodnog skeniranja. Ovaj ECL signal je emitovan na anodnom oksidacionom potencijalu poznatim za TPrA daleko ispred oksidacionog potencijala  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+105}$ . Može se uočiti da se pik ECL krive preklapa sa dobro definisanim oksidacionim pikom na cikličnom voltamogramu na  $0,9\text{ V}$ . Takođe se može uočiti širok sekvencijalni pik koji se pojavljuje na  $+1,17\text{ V}$  u blizini potencijala na kome se dešava oksidacija rutenijuma. U odsustvu odgovarajuće ECL emisije na potencijalu pojavljivanja drugog pikana cikličnom voltamogramu može se zaključiti da je oksidacija korekatanta jedini proces koji doprinosi nastanku ECL signala. Pri radu sa NEE napravljenim od zlata, ovaj pik se može pripisati procesu formiranja površinskog sloja oksida zlata<sup>43,72</sup>.

Sa ciljem da se potvrdi ECL signal snimljen na potencijalu oksidacije TPrA i napravi jasna slika po pitanju pojave drugog pika (koji može poticati od nespecifičnog vezivanja rutenijum-markera ili od formiranja oksida zlata) izvedeno diferencijalno-pulsno voltametrijsko (DPV) snimanje datog sistema. Set eksperimenata je urađen sa čistom NEE urastvorima TPrA ili  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  različitih koncentracija.



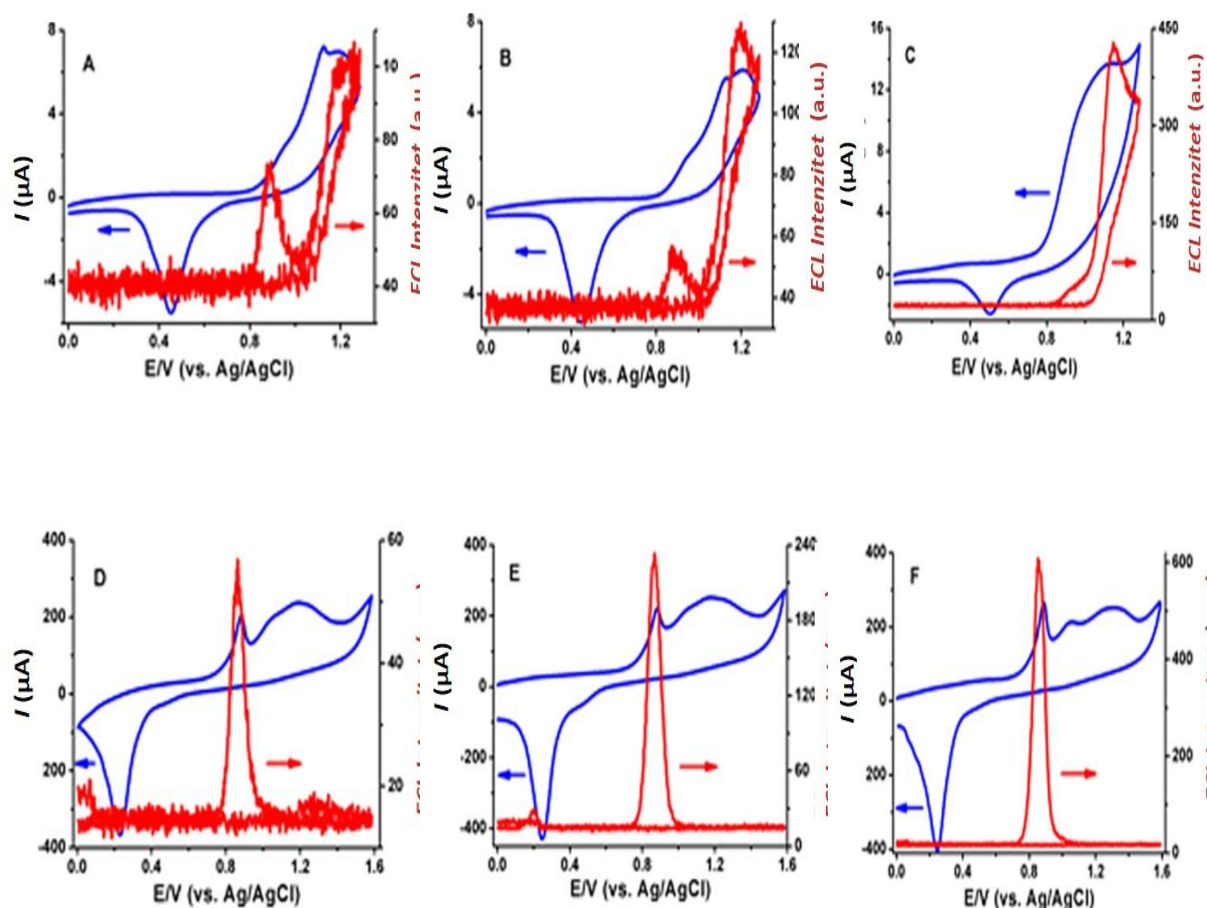
**Slika 16.** Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni na nemodifikovanom NEE u 0.1MPBS, pH 7.4 kojije sadržao TPrA (A) i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (B) u različitim koncentracijama.

Diferencijalno-pulsna voltametrija je bolja tehnika u odnosu na cikličnu voltametriju u cilju razdvajanja eventualno preklapljenih pikova koji potiču od oksidacije rutenijumovog kompleksa i zlata. Detektovanje pika koji odgovara direktnoj oksidaciji TPrA izvedeno je DPV tehnikom na nemodifikovanom NEE u rastvoru TPrA. **Slika 16A** pokazuje da se intenzitet pika koji se pojavljuje na 0,9 V (mereno u odnosu na Ag/AgCl) u opsegu koncentracija od 1-50 mM TPrA progresivno povećavaju sa povećanjem koncentracije TPrA, kao što je i očekivano. DP voltamogrami snimljeni u prisustvu rastvora  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  različitih koncentracija bez dodatka TPrA takođe potvrđuju pretpostavku da se oksidacija rutenijumovog<sup>106</sup> kompleksa ne dešava na toj vrednosti elektrodnog potencijala (**Slika 16B**). Povećanje intenziteta anodne strujenelektrodnom potencijalu većem od 0.9 V je uočeno na nemodifikovanim NEE u rastvoru osnovnog elektrolita (crna kriva) i iz toga možemo da zaključimo da je oksidacija zlata proces koji se dešava na tom elektrodnom potencijalu. Svi rezultati potvrđuju da elektrodni proces oksidacije koji se dešava na 0.9 V odgovara direktnoj oksidaciji TPrA. Odustvo merljivih ECL talasa na potencijalu većem od +1,0 V pri ponovljenim merenjima ukazuje da se direktna oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na površini nano-elektroda ne dešava.

Svi prethodno navedeni podaci navode na zaključak da elektrohemijska oksidacija TPrA na nanoelektrodi obezbeđuje fluks oksidacionih produkata, odnosno  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  radikal-katjona, koji difunduju od površine elektrode. Sve dok uslovi totalnog preklapanja difuzionih slojeva važe, fluks reagensa i produkta od i ka površini elektrode, respektivno, će prekriti celokupnu geometrijsku površinu NEE. Dok difunduju od površine nanoelektroda,  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  se deprotonuje formirajući  $\text{TPrA}^{\bullet}$  radikal. Obe radikalske vrste su uključene u stvaranje ECL signala prema

„revidiranom” putu koja se odvija na malim operativnim potencijalima (*eng. low operating potential* -LOP)<sup>10,11,62</sup>. Konačno, ECL signal je dobijen preko posredne oksidacije Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>centara vezanih za bio-prepoznavajući lanac pomoću oksidovanih produkata TPrA.

Kako bismo pokazali uticaj koncentracije luminofore na ECL odogovor, izveden je eksperiment sa imobilizovanim kompleksom rutenijuma kao i sa rutenijumom slobodnim u rastvoru u prisustvu osnovnog elektrolita. Povećanje koncentracije luminofore u imobilizovanoj fazi rezultiralo je u odgovarajućem povećanju intenziteta pika ECL krive na LOP-u. Nasuprot tome, povećanje koncentracije luminofore u rastvoru dovodi do povećanja intenzitet drugog ECL pika smanjujući u isto vreme intenzitet ECL pika na LOP (**Slika 17**). Gubitak prvog ECL pika još jednom potvrđuje da su pri visokim koncentracijama luminofore dominantni mehanizmi generisanja ECL putem njene direktne oksidacije i katalitičkim putem, dok pri niskim koncentracijama „revidiran” put ima ključnu ulogu.

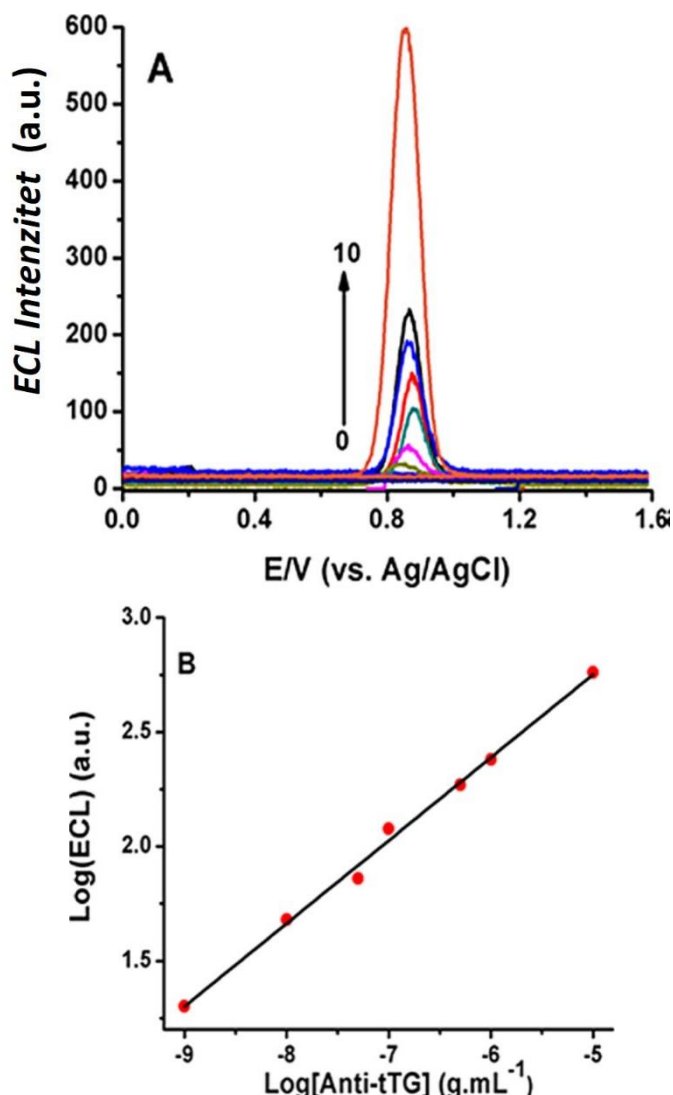


**Slika 17.** Uticaj koncentracije rutenijuma u rastvoru i imobilizovanog na intenzitet ECL i potencijal emisije u 0.1MPBS(pH= 7.4)kojisadrži 0.1MTPPrA; a-c) nemodifikovane NEE nakon dodatka a) 0,5, b) 1,0, c) 10  $\mu\text{MRu}(\text{bpy})_2^{2+}$  u rastvoru; d-f) na imunosenzoru koji sadrži d) 0,5, e) 1, f) 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-tTG.

### 3.2.9. Studija analitičkih karakteristika imunosenzora

Kako je standard čovečijeg anti-tTG nedostupan na tržištu, performanse razvijenog imunosenzora koji se bazira na ECL inicijalno su evaluirane pomoću standardne serije rastvora mišijeg anti-tTG IgG antitela. ECL spektar za koncentracioni opseg od 1ng/ml do 10  $\mu\text{g/ml}$  je prikazan na **Slici 18A**. Intenzitet pika ECL se progresivno povećavao sa povećanjem koncentracije anti-tTG. Standardna kalibraciona kriva na **Slici 18B** je dobijena korišćenjem srednje vrednosti ECL uzasopna tri merenja u različitim rastvorima za svaku koncentraciju.





**Slika 18.** A) ECL odgovor u funkciji koncentracije anti-tTG (0.00, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 $\mu$ M); B) Kalibraciona kriva dobijena izračunavanjem srednje vrednosti intenziteta ECL pikova (n=3). Eksperimentalni uslovi su isti kao na oni u eksperimentu čiji su rezultati prikazani na **Slici 15**.

Logaritam ukupne ECL amplitude je direktno proporcionalan logaritmu koncentracije anti-tTG sa koeficijentom korelacije od 0,9959. Kriva je linearna u log-log prikazu u širokim opsegu koncentracija (od 1 ng/ml do 10  $\mu$ g/ml) sa jednačinom linerne regresije  $\text{Log}(\text{ECL}) = 0.379\text{Log}C + 1.679$  (C je izražena u g/ml) i limitom detekcije nižim od 1ng/ml. U većini ECL merenja koristeći ovu vrstu ECL baziranog imunosenzora, stabilan ECL signal je dobijen od trećeg uzastopnog merenja.

Prikazani rezultati su pokazali efikasnost predloženog immunosenzora zahvaljujući njegovoj arhitekturi, baziranoj na izgradnji bio-prepoznavajućeg lanca u protokolu detekcije na PC površini i na generisanju ECL na nano-elektrodama. Nadalje, može se očekivati slab ECL signal koji potiče odluminofora u blizini (unutar dometa elektronskog tuneliranja-1-2 nm) površine nanoelektroda. Ovo može biti pripisano jednom ili nekoliko mogućih razloga: (1) proteinski lanackoji je formiran na površini NEE može biti deblji nego maksimalni elektron tunelirajućio pseg, (2) priroda PC u blizini pora može biti izmenjena (npr. mali otvor pora ili veliko udubljenje) tokom procesa proizvodnje NEE tako da biomolekuli ne mogu da se imobilizuju. Na drugoj strani, potpuno odsustvo ECL-a na oksidacionom potencijalu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  potvrđuje odsustvo nespecifičnog vezivanja na površini nano-diskova od zlata što bi u kao krajnji rezultat imalo ECL emisiju na potencijalima većim od 1.0 V. Ova činjenica dodatno potvrđuje stabilnost čitave platforme pri uzastopnim merenjima. Takođe, to dodatno potvrđuje rezultate istraživanja koja se tiču stabilnosti TPrA radikal-katjona tj. Njegovog vremena poluživota koje je dovoljno dugo dabi se odigrala deprotonizacija u revidiranom putu. Utvrđenoje da  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  može da difunduje do 3  $\mu\text{m}$  od mesta formiranja i daje njegovo vreme poluživota iznosi 0,2ms<sup>29,66</sup>. U našoj imunosenzorskoj platformi, maksimalna distanca na kojoj luminofore smeju da se nađu, a da pri tome može da se odigra ECL odogovara zbiru vektora distance kojom je tTG je vezan za površinu Au uz dodavanje doprinosa proteinskog lanca formiranog tokom fabrikovanja immunosenzora. Kako je prosečna udaljenost ivica nanodiskova oko 170 nm, biomolekul lociran tačno između dva Au nanodiska tj. Na 85 nm se nalazina najvećoj lateralnoj udaljenosti od površinenano-elektrode. Zahvaljujući optimalnoj udaljenosti luminofore od površine nanodiska i prekomerne proizvodnje katjon radikala na granici faza, dovoljna količina dva radikala je dostupna na mestu ECL emisije. Kao što je naznačeno na **Slici 15B**, činjenica da nemodifikovan NEE uronjena u PBS pufer koji sadrži 0,1M TPrA nije pokazao nikakvu ECL implicira da sam TPrA kao nikomponente puferskog sistema nisu odgovorni za indukovanje ECL emisije. Takođe, odsustvo ECL u negativnom kontrolnom eksperimentu (imunosenzor napravljen bez prisustva analita anti-tTG) ukazuje na odsustvo nespecifičnog vezivanja kako na polikarbonatnom delu platforme tako i na površini nanodiskova. To takođe potvrđuje efektivnost koraka koji je za cilj imao blokiranje nespecifične adsorpcije pomoću 1% BSA i ispiranjem sistema pomoću 0,05% rastvora Tween 20 surfaktanta pre inkubacije sa biotinilovanim sekundarnim antitelom.

Smanjenje konvencionalnog ECL detekcionog oksidativnog elektrodnog potencijala  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA sistema zaoko 300mV donosi sledeće prednosti. Prvo, značjano su smanjene

moгуća interferiranja sporednih reakcija tokom isitivanja uzoraka sa kompleksnim matriksom kao što je krv. Interferencije mogu u krjanjem slučaju dovesti do povećanja intenziteta pozadinske emisije ili u potpunosti stopirati ECL. Drugo, smanjuje se intenzitet pozadinskog ECL signala koji se javlja usled reakcije između  $\text{Ru}(\text{bpy})^{2+}_3$  i hidroksilnih jona u vodenim sistemima<sup>107</sup>. Treće, u razvoju i upotrebi biosenzora, to minimalizuje električno oštećenje elektro-susceptibilnih biomolekula i oligonukleotidne sekvence. Konačno, redukuje formiranje sloja oksida na površini elektrode od zlata ili platine koji su poznati kao uzročnici loše analitičke reproduktivnosti. Korišćenje elektro-neprovodnih polimera NEE kao platforme za biosenzor bioprepoznatljivih elemenata omogućava druge prednosti pored visokog odnosa signala i šuma. Kod ovakvog pristupa nisu potrebne duge i komplikovane modifikacije površine elektrode kako bi se ostvarila uspešna imobilizacija bioprepoznatljivih elemenata.

### 3.2.10. Zaključak

U ovom poglavlju, mi smo razvili novi senzitivni i specifični anti-tTG ECL imunosenzor za dijagnostiku CD sa limitom detekcije nižim od 1 ng/ml, koristeći novuanalitičku strategiju. Iskoristili smo revidirani ECL put sa TPrA kao koreaktantom, koji omogućuje generisanje ECL na mikrometarskoj udaljenosti sa površine elektrode na LOP. Koristeći ovaj pristup, lokalizacija početnog elektrohemijskog koraka (tj. oksidacija TPrA) je odvojena od bioprepoznavajućeg lanca i ECL markera koji su imobilizovani na elektro-neprovodnoj površini NEE. Prema tome električna oštećenja na veoma osetljivim biomolekulima i oligonukleotidnim sekvencama je smanjena. Takođe, rad na niskom oksidacionom potencijalu dozvoljava redukciju mogućih interferencija od strane sporednih reakcija koje se mogu javiti prilikom rada sa kompleksnim uzorcima kao što je krv, čineći ovu metodu veoma pogodnom za serološko skeniranje.

## 3.3. Elektrogenisani hemiluminiscentni plivači pokretani pomoću bipolarne elektrohemije

### 3.3.1. Uvod

Dizajn i proučavanje objekata koji se mogu kretati na kontrolisan način i obavljaju zadatke malog obima je od ključne važnosti u mnogim oblastima u kojima mogu pronaći potencijalnu primenu počev od mikro-motora do nano-medicine<sup>108</sup>. Mikro-motori predstavljaju uređaje mikrometarskih dimenzija čiji dizajn omogućava izvršavanje određenih mehaničkih operacija (rotacija, kotrljanje, prebacivanje, isporučivanje) kao odgovor na zadati stimulus<sup>108</sup>.

Intezivna istraživanja su vršena na polju sinteze „molekulskih motora“<sup>109</sup> i „mikro- i nanomotor“<sup>110</sup> sa ciljem imitiranja načina rada biomotora<sup>111,112</sup>. Generalno, prema vrsti primenjene energije koju koriste, postoje tri načina pomoću kojih može da se izazove kretanje ovih objekata: 1) biohemijско gorivo koje se zasniva na funkcionalizaciji mikro-objekta pomoću sloja odgovarajućeg enzima. Na taj način je moguće ostvariti pretvaranje hemijske energije prirodnih goriva u kinetičku energiju<sup>113,114</sup>; 2) Putem strategije koja se zasniva na katalitičkom razlaganju vodonik-peroksida na vodu i kiseonik pomoću katalizatora koji ulaze u sastav strukture i dizajna mikro-objekta<sup>115</sup>; 3) Fizičko napajanje sistema upotrebom spoljašnjeg električnog<sup>116</sup> ili magnetnog polja<sup>117</sup>.

Bipolarna elektrohemija (BE), kao pokretačka snaga za pokretanje objekta je komplementarni pristup fizičkim gorivima<sup>118</sup>. Primena električnog polja dovodi do pojave elektrohemijskih reakcija na indukovanim polovima (tzv. bipolarnim elektrodama - BPE) elektroprovodnog objekta koji se nalazi unutar sistema bez upotrebe direktonog omskog kontakta između objekta i generatora električnog polja<sup>119</sup>. Preciznije, kada se primeni spoljašnje električno polje odgovarajuće jačine na elektrolit u koji je uronjena BP elektroda, potencijalna razlika između BPE i rastvora dovodi do istovremene oksidacije i redukcije<sup>120</sup>. Ovaj bežični pristup omogućava kreiranje sistema sa pokretnim elektrodama - tzv. mikro-plivačima koji su sposobni da se slobodno kreću kroz rastvor i stvarujući na taj način asimetričnu reaktivnost na površini. U svom radu, Kuhn i saradnici su koristili BE da demonstriraju translaciju, rotaciju i levitaciju mikro-plivača<sup>121-124</sup>. Ipak, posmatranje ovakvih plivača generalno predstavlja izazov zbog njihovih neretko malih dimenzija i zahteva upotrebu veoma efikasnih mikroskopskih tehnika<sup>125</sup> ili plivače označene fluorescentnim reagensom<sup>19,20</sup> koji svojim prisustvom olakšava praćenje kretanja mikro-plivača. U tom kontekstu se nameće zaključak da bilo bi korisno konstruisanje plivača koji bi u isto vreme bio i izvor svetlosti i čija bi emisija mogla da posmatra kao putanja njegovog kretanja. Široko korišćeni optičko-elektrohemijski proces koji ima prednost da ne zahteva postojanje pobudnog izvora svetlosti, ECL predstavlja obećavajućeg kandidata za kuplovanje sa BE<sup>126-128</sup>. Kombinacija ECL i bipolarnе elektrohemije je pronašla svoju primenu u analitičke svrhe<sup>119</sup>. Manz i saradnici istražili su generisanje ECL na anodnom polu bipolarnе elektrode za detekciju amina<sup>129</sup>. Crooks i saradnici<sup>130-132</sup> su dalje razvili ovaj koncept za mnoge analitičke svrhe.

Ovde predlažemo originalni pristup, prvi primer pogonskog mehanizma za pokretanje plivača tokom koje dolazi do istovremene emisije svetlosti zahvaljujući sinergetskom delovanju

BE i ECL<sup>133</sup>. Osim toga koncept plivača je proširen razvijanjem ECL-emisionih bioplivača za enzimsko određivanje glukoze prisutne u sistemu<sup>134</sup>. Uzročno-posledična oksidacija luminofore i enzimsko stvaranje nikotinamidadenin dinukleotida (NADH) dovodi do ECL emisije putem klasične koreaktantskog puta<sup>30,31</sup>. U ovom sistemu je pokazano da je koncentracija glukoze proporcijalna intenzitetu emitovane svetlosti. Zbog zavisnosti ECL intenziteta od koncentracije glukoze, ovaj pristup je takođe odgovarajući za praćenje prostorno-promenljive glukozne koncentracije.

### 3.3.2. Bipolarna hemija

### 3.3.3. Definicija bipolarne elektrode

Iako je koncept bipolarne elektrohemije poznat još od 1960-e godine, do sada je poznata njegova upotreba samo za nekoliko industrijskih primena<sup>135</sup>. Najpoznatija primena BE u industrijskim razmerama je na polju elektrosinteze, razlaganja vode (*eng. water splitting*) kao i za unapređenje performansi gorivnih ćelija<sup>136-138</sup>. U ovoj deceniji, BE otkriva privlačne mogućnosti za svoju primenu na polju nauke o materijalima i analize generalno, posebno za površinsku modifikaciju objekata submikrometarskih dimenzija i za merenje u mikrofluidnim sistemima<sup>139</sup>. Koristeći bipolarne elektrode, upotreba minijaturnih sistema za analitičko odvajanje i detekcija postaje moguća<sup>119</sup>. Termin bipolarna elektroda je korišćen za bilo koji elektro-provodan objekat na kome se istovremeno dešavaju reakcije oksidacije i redukcije. Drugim rečima BPE istovremeno predstavlja anodu i katodu<sup>118,120</sup>, za razliku od konvencionalnih elektrohemijskih sistema u kojima katoda i anoda nisu u međusobnom fizičkom kontaktu. BP elektrode mogu biti provodnici koji poseduju hemijsku anizotropiju dizajniranu sa ciljem da omoguće oksidacione i redukcionne reakcije u isto vreme kada su izložene spoljašnjem električnom polju<sup>140</sup>.

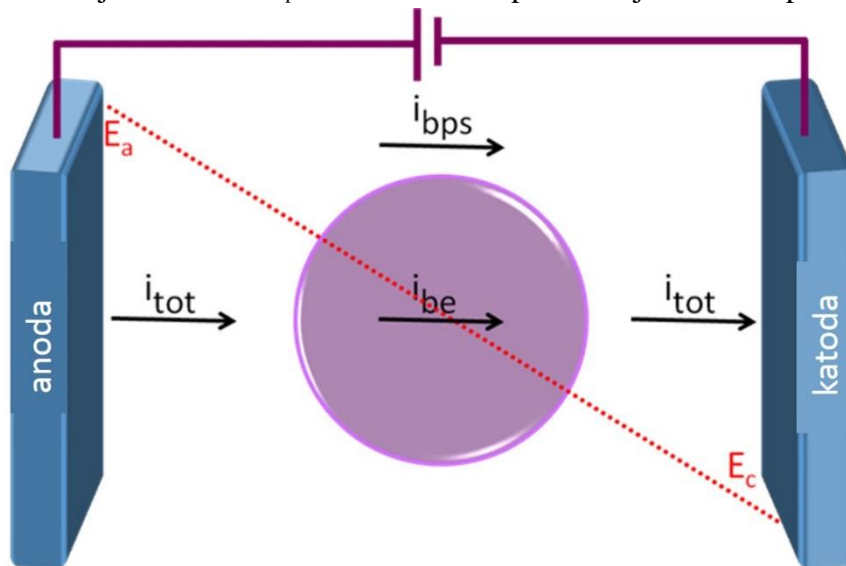
### 3.3.4. Polarizovanje provodnih objekata u uslovima otvorene konfiguracije

Da bismo predstavili osnovni koncept BE, razmotrićemo situaciju predstavljenu na **Slici 1**, gde je provodnik uronjen u homogeni rastvor elektrolita izloženog spoljašnjem električnom polju<sup>118</sup>. U ovom slučaju električno polje se indukuje između dve sporedne elektrode koje se zovu napajajuće elektrode (*eng. feeder electrodes*). Struja koja protiče kroz rastvor u blizini BPE je podeljena na dva segmenta. Deo struje,  $I_{bps}$ , tzv. zaobilazeća struja će proticati kroz rastvor putem migracije jona, dok će deo struje,  $I_{be}$ , proticati kroz BPE zbog električne

provodljivosti samog objekta i u svojoj suštini ona predstavlja faradejsku struju. Shodno tome možemo pisati sledeću jednačinu:

$$I_{be} = I_{tot} - I_{bps} \quad (1)$$

Iz ovoga sledi da je odnos  $I_{be}/I_{bps}$  korelisana sa otporom objekta  $R_e$  i otporom rastvora  $R_s$ <sup>119</sup>.



**Slika 1.** Shema sferne bipolarnе elektrode u rastvoru pod uticajem spoljašnjeg električnog polja.  $E_a$  je potencijal anode,  $E_c$  je potencijal katode,  $I_{tot}$  je struja koja protiče kroz rastvor pre i posle površine BPE,  $I_{bps}$  je struja koja prolazi kroz rastvor zaobilazeći BPE (tzv. zaobilazeća struja) i  $I_{be}$  je struja koja protiče kroz BPE (tzv. faradejska struja).

Zbog toga, rad sa rastvorima male provodljivosti i sa visoko provodnim objektom rezultuju minimumom  $I_{bps}$  struje. Dakle, skoro sva struja koja protiče kroz rastvor će proći kroz elektro-provodni objekat. Kako su  $E_a$  i  $E_c$  potencijali napajajućih elektroda vrednost izloženom električnom polju  $\mathcal{E}$  može biti izračunato kao:

$$\mathcal{E} = (E_a - E_c) / L \quad (2)$$

gde  $L$  predstavlja rastojanje između napajajućih elektroda. Nametnuti potencijal polarizacije  $E = (E_a - E_c)$ , dat je razlikom potencijala između rastvora i provodnog objekta i linearno opada kroz rastvor elektrolita. To znači da dve napajajuće elektrode imaju istu geometriju i da je distorzija električnog polja kao posledica elektrohemijskih reakcija koje se dešavaju na njima zanemarljiva. Na **Slici 2** je prikazana distribucija potencijala rastvora u kome se nalaze uronjena dva objekta različite morfologije, linearne i sferne, respektivno.

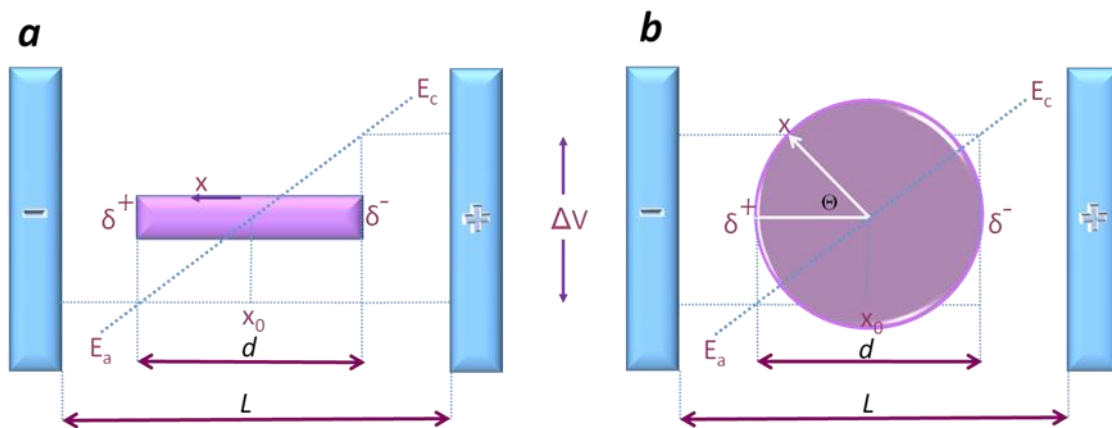
Podrazumevajući konstanto električno polje - EF, vrednost E varira duž provodnik/rastvor kontaktne površine i na prikazanoj poziciji  $x$  može biti izračunata kao:

$$\mathcal{E} = Ex \quad (3)$$

u slučaju linearnog objekta (**Slika 2a**).

Za objekat sfernog oblika važi sledeća relacija:

$$\mathcal{E} = Ed/2\cos\theta \quad (4)$$



**Slika 2.** Shema polarizacije linearnog i sfernog objekta lokalizovanog između dve napajajuće elektrode unutar generisanog električnog polja.  $L$  je rastojanje između elektroda,  $d$  je prečnik,  $x_0$  je sredina BPE,  $\delta^-$   $\delta^+$  katodni i anodni pol BPE, respektivno.

Iz ovoga sledi da se polarizaciona razlika potencijala javlja između krajeva objekta i rastvora, i raste počevši od mesta  $x_0$  prema oba kraja dostižući svoj maximum na krajevima BPE kao što je prikazano na slici 2a i b. Maximum potencijalne polarizacione razlike je dat sledećom jednačinom:

$$\Delta V = \mathcal{E}d \quad (5)$$

Ako je maximum polarizacije ( $\Delta V$ ) dovoljno visok, oksidacija i redukcija se mogu odigrati na odgovarajućim polovima što se uopšteno može prikazati kao:

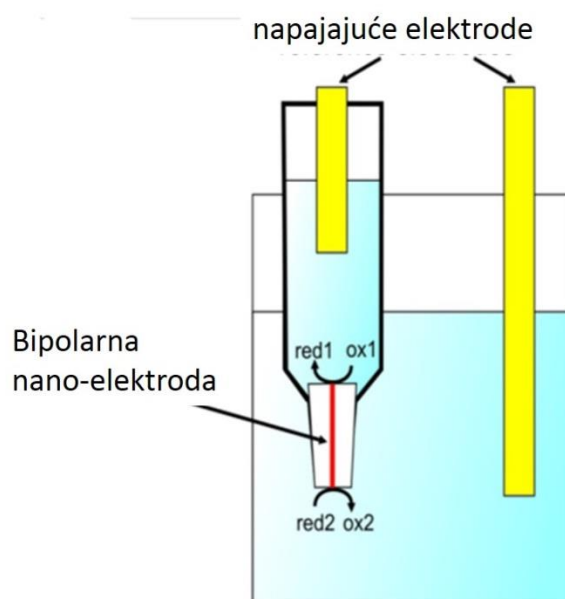


$n_1$  i  $n_2$  predstavljaju broj elektrona uključenih u svaku elektrohemijsku reakciju dva redoks para  $\text{red}_1/\text{ox}_1$  i  $\text{red}_2/\text{ox}_2$  sa standardnim potencijalima  $E_1^0$  i  $E_2^0$ , respektivno. Stoga, asimetrična reaktivnost površine objekta opravdava naziv BPE.

$\Delta V$  kvantifikuje pokretačku snagu na krajevima objekta. Jasno je da je minimalna vrednost potencijala neophodna kako bi se odigrale oksidacija i redukcija na krajevima objekta. Teoretska granična vrednost je jednaka razlici standardnih elektrodnih potencijala  $|E_1^0 - E_2^0|$  redoks parova od interesa koji su prisutni u sistemu. Dakle, dobra kontrola lokalizacije elektrohemijske reakcije duž BE površine omogućena je podešavanjem EF kao parametra koji je relativno lako kontrolisati.

### 3.3.5. Slučaj zatvorene bipolarne elektrohemije

BPE može biti bilo koji provodni materijal koji poseduje pogodnu dimenziju i geometriju. Ipak, važno je napomenuti da manji objekti zahtevaju jače spoljašnje električno polje kako bi bili dovoljno polarizovani sa ciljem da se izazovu redoks reakcije. Takođe treba istaći da se opisani sistem odnosi na tzv. otvorenu BE konfiguraciju gde struja može da protiče i kroz elektrolit i kroz BPE. Međutim u nekoliko radova se opisuje upotreba konfiguracije zatvorenog tipa, gde je rastvor koji dodiruje BPE podeljen na dva nezavisna dela, fizički razdvajajući napajajuću katodu od anode<sup>135</sup>. Jedini put struje između ova dva, prethodno spomenuta, odeljka je kroz BPE.



**Slika 3.** Shema bipolarne nanoelektrode u slučaju zatvorene bipolarne konfiguracije<sup>141</sup>.

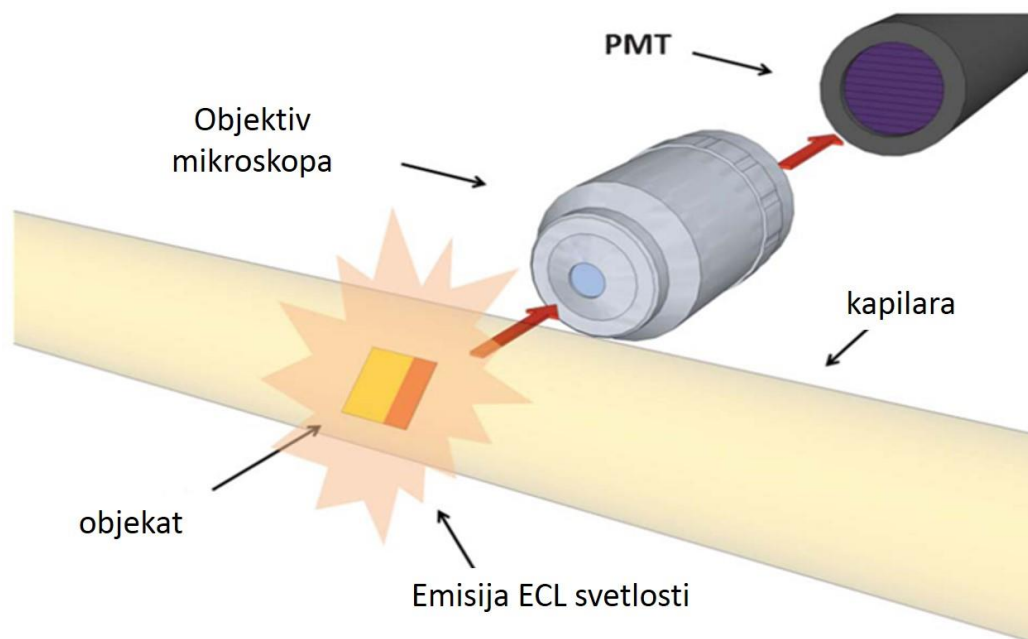


Na **slici 3** je prikazan primer zatvorene BPE opisane od strane Zhang i saradnika<sup>141</sup>. Oni su pokazali da određeni tipovi elektroda od ugljeničnih vlakana, koje su u čestoj upotrebi na polju bioelektrohemije, kao i mikro-žice dobijene zatapanjem u staklenu kapilaru<sup>142</sup>, zapravo funkcionišu kao zatvorene BPE. U ovom slučaju elektrohemijaska struja prolazi kroz BPEs i može se direktno meriti zbog odsustva jonske struje, pružajući na taj način informacije o brzini faradejskog procesa<sup>142</sup>.

### 3.3.6. Primena bipolarnе elektrohemije kombinovane sa ECL

ECL se naširoko koristi kao analitička tehnika zbog svoje visoke specifičnosti, osetljivosti i visokog odnosa signala i šuma<sup>128</sup>. Direktno optičko očitavanje se može jednostavno izvršiti pomoću CCD kamere, čineći ovu tehniku jednom od najboljih za prikupljanje informacija o procesima koji se dešavaju na BPE. ECL/BE je korišćena za mapiranje električnog polja<sup>143</sup>, u integrisanim mikrofluidnim kolima<sup>144</sup> i u analitici<sup>132,145,146</sup>. Prvi koji su radili na sistemima za detekciju baziranim na primeni kombinovane ECL/BE bili su Manz i saradnici<sup>129</sup>. Oni su koristili fabričke BPE mikro-elektrode od platine u obliku slova U međusobno odvojene u kanalu staklenog čipa. Na jednom kraku Pt elektrode se odvijala redukcija kiseonika ili vode, dok je anodna strana Pt služila za detekciju rutenijumskog kompleksa u  $\mu\text{M}$  opsegu koncentracija. Produkti nastali kao posledica elektrohemijskih reakcija i ovom sistemu su odvajani elektroforetski. Nadalje, odvajanje i detekcija tri amino kiseline iz smeše, koje su imale ulogu koreaktanata za uspešno generisanje ECL je izvedeno primenom ove tehnike. Slični pristup je korišćen od strane Wu i saradnika pri osetljivoj analizi ćelija koristeći indijum-titanijum-oksidi (ITO) BPE kao platformu za detekciju receptora folata na ćelijskim membranama<sup>147</sup>. FR je tumor marker eksprimiran na ćelijama tumora u visokoj koncentraciji sa ulogom da omogući transport folne kiseline u ćeliju. Rad senzor se bazira na visokom afinitetu prema folnoj kiselini i inhibiciji ECL signala na anodnom delu BPE što dovodi do smanjenja ECL signala. Isti autori su izvestili i o ultrasetljivom ECL biosenzoru za detekciju nukleinskih kiselina u ćelijama tumora pri femtomolarnoj koncentraciji<sup>147</sup>.

Jusková i saradnici su opisali generisanje ECL upotrebom 50  $\mu\text{M}$  suspenzije pločica zlata u staklenoj kapilari<sup>148</sup>. Kao što je prikazano na **Slici 4** ECL signal se može izmeriti i u sistemima u kojima je bipolarnе elektrode nalaze u pokretu.

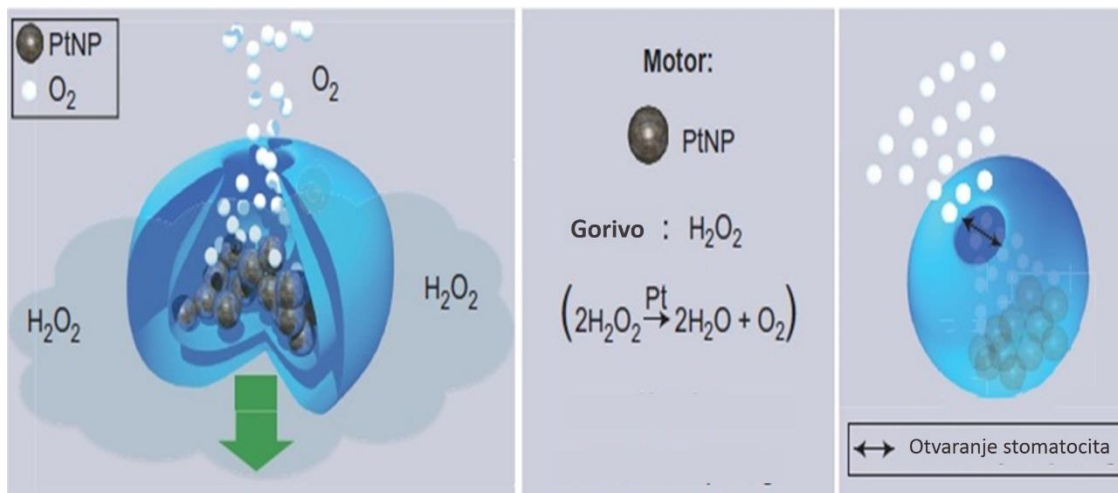


**Slika 4.** Shematski prikaz detekcionog sistema. Mikro-pločie zlata ( $50\mu\text{M}$  suspenzija) je pozicionirana unutar providne staklene kapilare ispunjene ECL reaktantima. Primena električnog polja duž kapilare, rezultuje emisijom svetlosti čiji se intenzitet meri pomoću fotomultiplikatorske cevi<sup>148</sup>.

### 3.3.7. Bipoalrna elektrohemija za indukovanje kretanja

Prostorna selektivnost koju obezbeđuje BE, se od skora primenjuje u analitičkoj hemiji<sup>12,36</sup>, nauci o materijalima<sup>149-153</sup> i za indukovanje kretanja „plivača“<sup>123</sup>. Prednost ove tehnike u primeni na polju motora je kontrola pokreta omogućena jačinom i usmerenošću električnog polja kao i njegovom raznovrsnošću zbog činjenice da svaki provodni objekat teorijski može biti plivač<sup>140</sup>. Dizajn objekata koji mogu da oponašaju pogon bioloških sistema<sup>109,154-156</sup> u veštačkom i prirodnom okruženju postavljen je kao jedan od prioritarnih zadataka u daljim istraživanjima na polju bipolarnih plivača<sup>157-159</sup>. Spontana hidroliza adenozin trifosfata (ATP), koji služi kao izvor energije bioloških motora u prirodnim sistemima služio je kao model za razvoj većine sistema koji obuhvataju generisanje kretanja mikro-objekata<sup>160</sup>. Koncept je zasnovan na korišćenju hemijskih goriva za generisanje auto-elektroforeze ili mehurića<sup>18,62-64</sup>. Najkorišćenije hemijsko gorivo u te svrhe je  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na **slici 5** je prikazano nezavisno kretanje polimera punjenog nano-česticama od platine (*eng.* -Pt-NPs) koji podsećaju na stomatocite<sup>160</sup>.

Katalitičko razlaganje goriva iz zarobljene Pt-NPs generiše mlaz gasovitog vodonika kroz otvor koji se nalazi na stomatocitu i na taj način stvara potisak koji dovodi do kretanja sistema kroz rastvor.



**Slika 5.** Samostalno kretanje veštačkog stomatocita (plavo) postaje moguće zarobljivanjem katalitički aktivnih nanočestičnih materijala (sivo, ovde PtNPs) i dodavanja odgovarajućeg goriva (ovde  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Levi panel-bočni pogled na sistem; srednji panel-analogija sa minijaturnim motorom u vidu jedne nanočestice; desni panel-pogled na otvor na stomatocitu<sup>160</sup>.

U cilju oponašanja biomotora, Mallouk, Sen i saradnici su razvili sistem u kome uspešno oponašaju motore korišćenjem samonapajajućih nanošipki kao nanomotora<sup>161</sup>. Wang-ova grupa je dalje poboljšala efikasnost bimetalnih BPE nanomotora dostižući brzinu kretanja od  $150 \mu\text{m/s}$ <sup>162</sup>. Klasična strategija se zasniva na korišćenju motora sa hemijskim napajanjem<sup>158</sup> i magnetno vođenih motora koji imaju katalitički ili magnetni pol, respektivno<sup>163</sup>. Gorivo izaziva pokretanje objekta prilikom reakcije na tačno definisanom delu površine motora koji je sastavljen of odgovarajućeg katalizatora (npr. platina, nikel, parovi metala ili legure)<sup>164</sup>. Wang-ova grupa je takođe opisala detekciju  $\text{Ag}^+$  jona u rastvoru  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koristeći Au-Pt nano-motore, proširujući na taj upotrebu motora u svrhu senzora<sup>165</sup>.

U sledećem poglavlju biće predstavljeno kretanje objekta koji pokazuju asimetričnu aktivnost indukovanu pomoću BP.

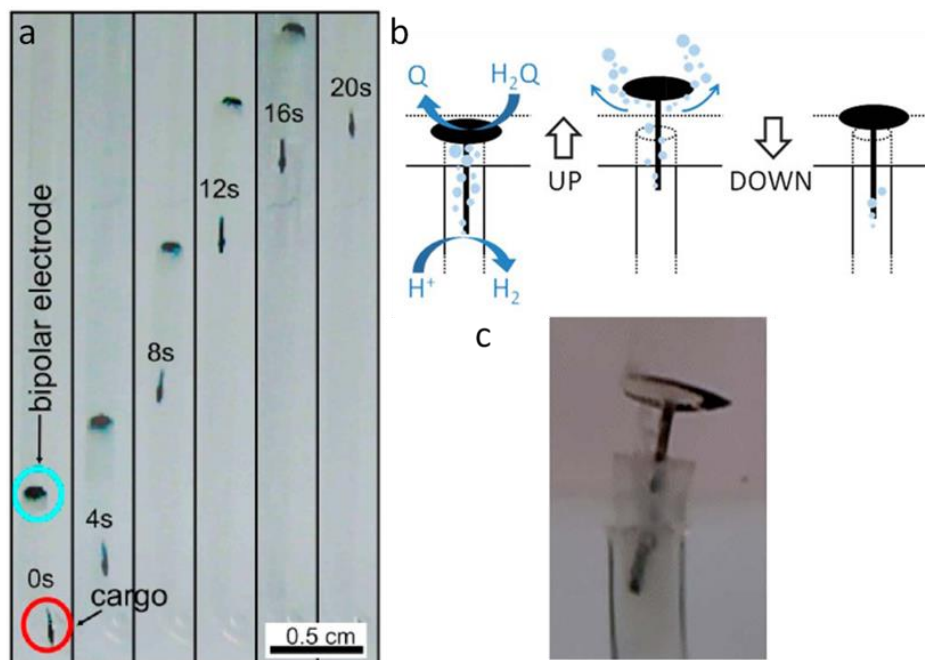
### 3.3.8. Levitacija motora zahvaljujući BE

Zbog raznovrsnosti BE, svaka vrsta provodnog materijala može biti pokrenuta te stoga ne postoji ograničenje u smislu veličine i oblika motora<sup>139</sup>. S obzirom da omogućava direktno

elektrohemijsko narušavanje simetrije, BP elektrohemija predstavlja alternativnu metodu drugim mehanizmima koji se koriste za pokretanje motora.

U svom radu, Kuhn i saradnici su opisali levitaciju sfera u kapilari<sup>16</sup>. Da bi se indukovala levitacija provodne sfere, spoljašnje napajajuće elektrode su polarizovane na ulazu u kapilaru indukujući na taj način električno polje koje dovodi do redukcije vode na BPE (sfera od staklastog ugljenika)<sup>121</sup>. Na taj način dolazi do akumulacije mehurića  $H_2$  sa donje strane sfere. Posledica je da je pokret generisan u smeru suprotnom od smera izdvajanja mehurova vodonika. Nadalje, BPE sfera je korišćena kao nosilac tereta male mase. Zanimljivo je da korišćenjem kapilare konusnog oblika za posledicu ima periodično akumuliranje i otpuštanje mehurića što rezultuje tzv. jo-jo efektom umesto kontinuiranim kretanjem.

Bouffier i Kuhn su takođe pokazali da BPE može da posluži i kao bežična poklopac, gde elektrogenerisani mehuri  $H_2$  uzrokuju da se poklopac podigne i otvori (slika 6b i c)<sup>122</sup>. Moguće je zamisliti primenu ovih motora u minijaturnim sistemima za detekciju i u laboratorijama na čip uređajima (eng. *lab-on-a-chip*).



**Slika 6.** a) Serija optičkih mikrografa koji pokazuju kako se teret polimerne kapsule podiže pomoću bipolarnе elektrode tokom levitacije.<sup>16</sup> b) Shematski prikaz mehanizma u tri koraka koji dovodi do pokreta zajedno sa odgovarajućim optičkim mikrografom za dati trenutak (c).<sup>122</sup>

### 3.3.9. Osvetljavanje bipolarnim plivačima

Unutrašnja redoks asimetrija dobijena pomoću BE čini ovaj elektrohemijski metod pogodnim za kretanje elektroprovodnih čestica i perli generisanjem mehurova gasa. Ipak, praćenje ovakvih pokretnih objekata u realnom vremenu i dalje predstavlja izazov te se stoga ulažu ogromni napori da se dizajniraju čestice sa posebnim optičkim i u mnogim slučajevima fluorescentnim osobinama<sup>166</sup>. Ovde ćemo predstaviti originalan pristup nezavisnog kretanja pokretnih objekata praćenih emisijom svetlosti koja je dobijena putem generisane ECL. U ovom slučaju, BE nije samo asimetrična pokretačka snaga za pogon čestica, već je i odgovorna za emisiju svetlosti, kombinujući na sinergetski način obe redoks reakcije na površini istog objekta<sup>133</sup>.

Kao i u prethodnim slučajevima, pokret je izazvan oslobađanjem mehura H<sub>2</sub>, usled redukcije vode na katodnom polu bipolarnog plivača<sup>121,123</sup>, što je prikazano sledećom jednačinom:



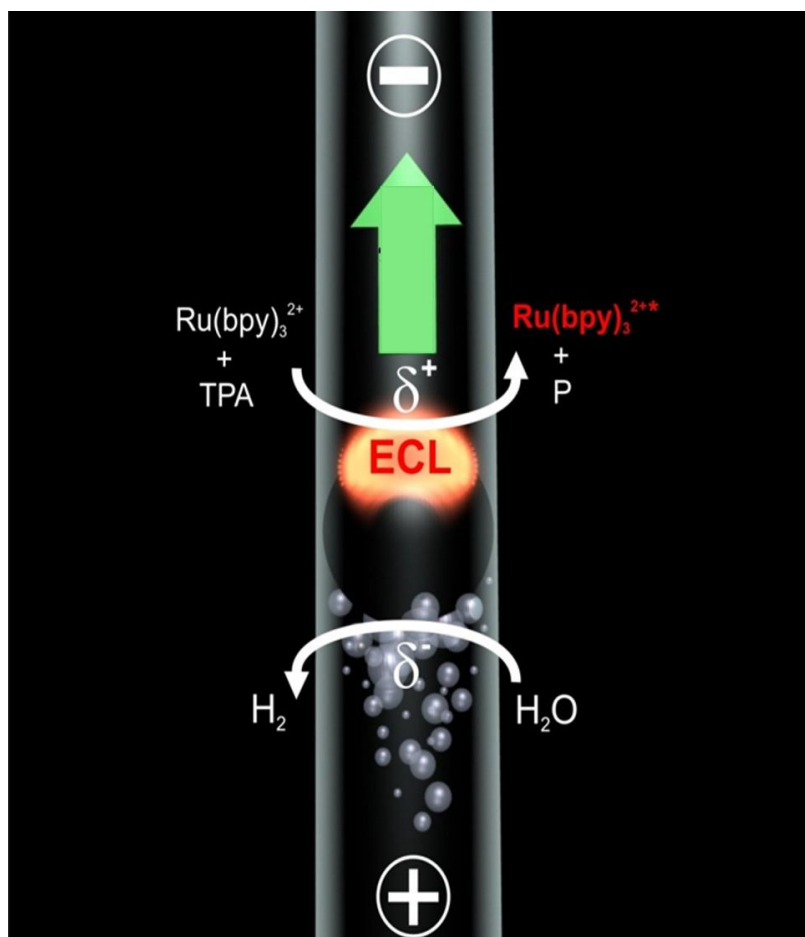
Zbog elektroneutralnosti tokom izvođenja BE eksperimenta, voda ili drugi žrtvujući (*eng. sacrificial*) molekul kao što je hidrohion, mora biti simultano oksidovan na anodi, generišući produkte oksidacije kao što su O<sub>2</sub> ili benzohion. U smislu pogona ove anodne reakcije ne doprinose kretanju plivača i stoga mogu biti zamenjene elektrohemijskim reakcijama koje dovode do pojave ECL emisije. Kao što je spomenuto u opštem delu, ECL je elektrohemijski proces u kome se proizvodi svetlost i koji može biti aktiviran na anodnom elektrodnom potencijalu. ECL mehanizam modela TPrA/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> zavisi od više eksperimentalnih parametara kao što hidrofobnost površine objekta<sup>167</sup>, vrsta materijala od koga je elektroda sačinjena, odnos koncentracije, pH i prisustvo surfaktanta<sup>168</sup>. Ukratko, ECL baziran na koreaktantu može se predstaviti u dve sledeće reakcije:



Formirani reaktivni radikal-katjon TPrA<sup>•+</sup> podleže brzom reakciji deprotonovanja pri čemu se formira reaguju sa kompleksom rutenijuma pri čemu dolazi do emitovanja svetlosti<sup>169</sup>. Kao što je prikazano na **slici 7** sinergija redukcije vode na katodnom polu i pojednostavljeni

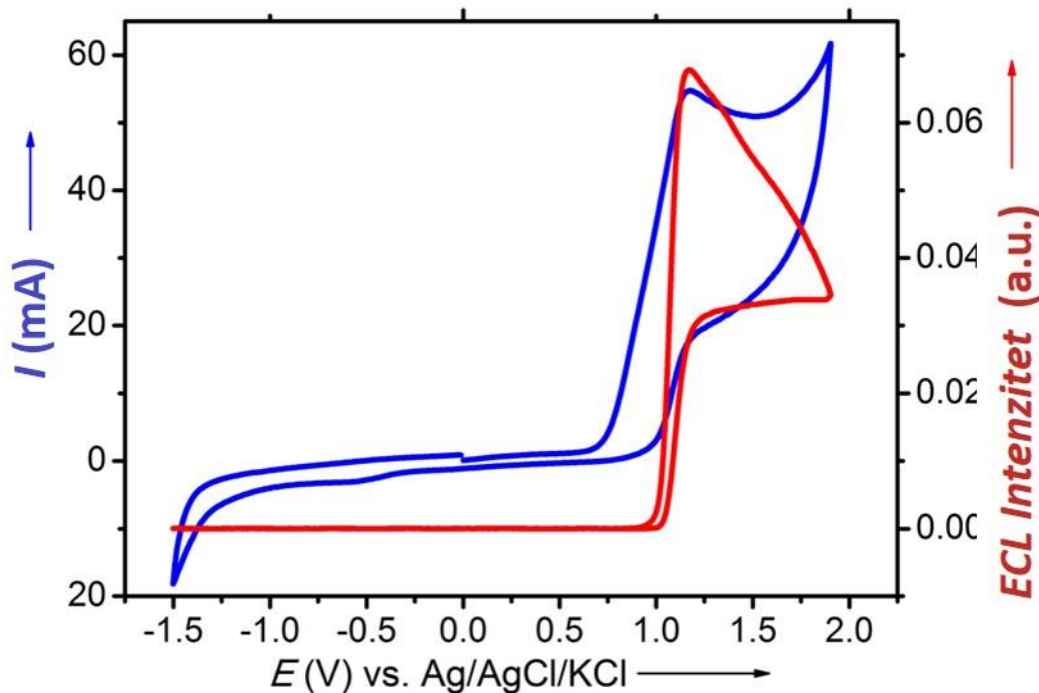
mehanizam oksidativne ECL na anodnom polu može dovesti do istovremenog indukovanja kretanja provodnog plivača koje je praćeno simultanom emisijom svetlosti.

Da bi se procenila minimalna vrednost  $\Delta V$  koja je potrebna za istovremeno generisanje mehura vodonika i ECL, odgovarajuće redoks reakcije su prvo karakterisane cikličnom voltametrijom. Troelektrodni sistem se sastoji od ručno napravljene elektrode od staklenog ugljenika (GC) kao radne elektrode (elektroda je sastavljena od istog materijala kao i plivač), Ag/AgCl (3 M KCl) referentne elektrode i platinske žice koja je imala ulogu pomoćne elektrode. GC je izabran za materijal plivača zbog svoje male gustine ( $1.4 \text{ gcm}^{-3}$ ) u poređenju sa drugim provodnim materijalima kao što su metali. Ovo umanjuje intenzitet sile koju je neophodno primeniti na plivača kako bi se prevazišao efekat gravitacije.



**Slika 7.** Emisija svetlosti sa površine elektrohemijskog plivača. Sinergijska redukcije  $\text{H}_2\text{O}$  na bipolarnoj katodi (dno sfere) i simultani oksidativni ECL mehanizma na anodi (vrh sfere) istovremeno izaziva kretanje i emisiju svetlosti<sup>133</sup>.

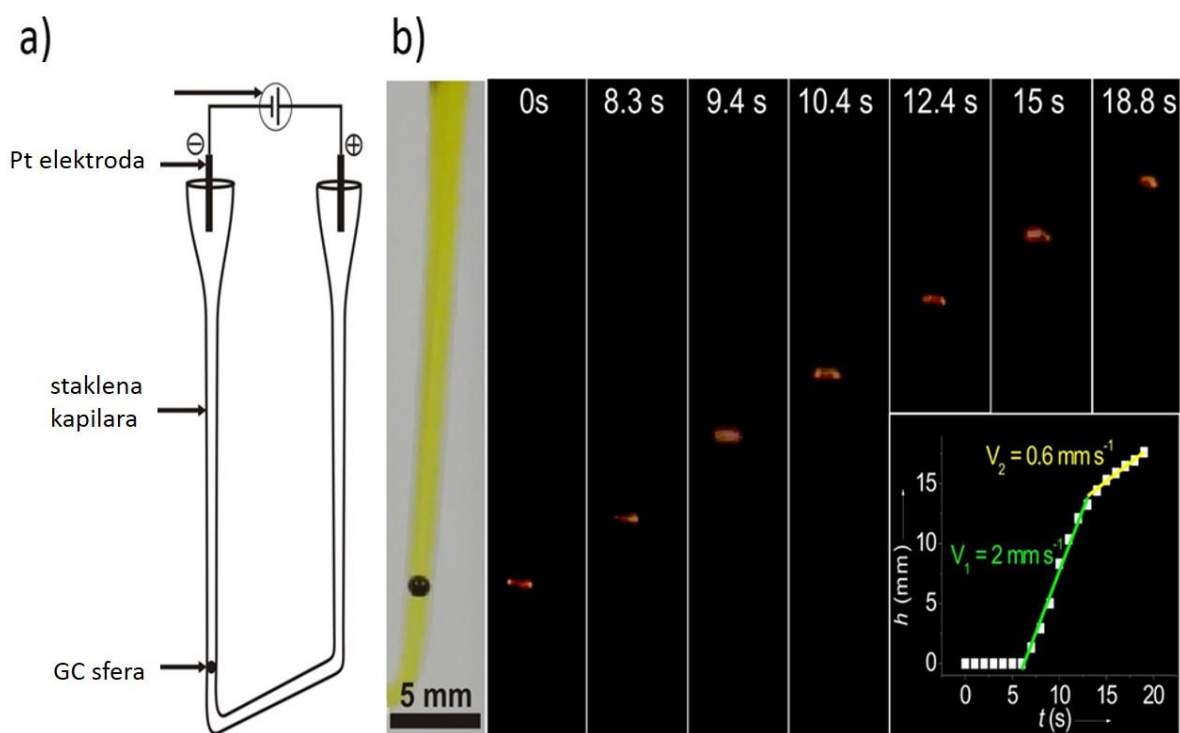
Ovo elektrohemijsko merenje je kombinovano sa istovremenim praćenjem intenziteta generisane ECL korišćenjem fotomultiplikatorske cevi. Na **Slici 8** je prikazan tipičan voltamogram i ECL kriva sistema koji se sastoji 0.5 mM tris- (2,2'-bipiridil)dihlororutenijum(II), 100mM TPrA kao koreaktanta rastvorenih u 100 mM rastvoru fosfatnog pufera (pH= 7,4). Sa ovih krivih se lako mogu dobiti podaci o elektroodnom potencijalu na kome se različite redoks reakcije odigravaju na površini plivača. On se za redukciju vode se nalazi na -1.1 V mereno prema Ag/AgCl (3 M KCl) dok se emisija ECL javlja na +1V. Na osnovu ovih eksperimentalno određenih vrednosti može se zaključiti da je kombinovanje redukcije vode i ECL emisije na reaktivnim polovima BPE moguće samo kada razlika potencijala između krajeva BPE iznosi najmanje  $\Delta V_{min} = 2.1$  V. Primenom jedančine 5 može se lako izračunati da u slučaju BPE prečnika  $d$  oko 1 mm intenzitet električnog polja u prvom redu aproksimacije mora iznositi najmanje  $21 \text{ Vcm}^{-1}$ .



**Slika 8.** Ciklični voltamogram (plavo) i ECL signal (crveno) 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u prisustvu 100 mM TPrA u 100 mM fosfatnom puferu (pH= 7.4) na ručno pravljenoj elektrodi od staklastog ugljenika pri brzini promene potencijala radne elektrode od  $100 \text{ mV/s}$ <sup>28</sup>.

Bipolarni eksperimenti levitacije su izvedeni u staklenoj kapilari U oblika (slika 9a) koje su ručno izrađene od komercijalnih Pasterovih pipeta. Pažljivo je dodato nekoliko kapi

surfaktanta u ćeliji kako bi se izbeglo formiranje vazdušnog mehura. Ćelija je postavljena u vertikalni položaj a potom je sfera od staklastog ugljenika prečnika  $d \approx 1$  mm ubačena u jedan od dva kraka U-ćelije. Generatorske elektrode (Pt žice) su uvedene u sistem kroz gornji deo ćelije i polarizovane na takav način da je  $H_2$  generisan ispod sfere, što je prikazano na slikama 7 i 9a. ECL je snimana korišćenjem digitalne kamere (SONY, Cyber-shot). Dužina U ćelije je bila 9.8 cm dok je primenjena razlika potencijala između dve elektrode iznosila 250 V. Pod ovakvim eksperimentalnim uslovima generisano je električno polje intenziteta  $E = 25.5 \text{ Vcm}^{-1}$ . Ova vrednost jačine polja je viša od teoretske granične vrednosti od  $21 \text{ Vcm}^{-1}$  koja je prethodno izračunata i stoga vodi do kuplovanja dva efekta, levitacije plivača i generisanja ECL kao što je prikazano na slici 9b.



**Slika 9.** a) Shema postavke za statične i levitacione eksperimente. b) Levitacija GC sfere uz simultanu emisiju svetlosti. Serija otičkih mikrografa koji pokazuju levitaciju GC perle u U ćeliji ispunjenoj rastvorom  $0.5 \text{ mM Ru(bpy)}_3^{2+}$ ,  $100 \text{ mMTPrA}$  u  $100 \text{ mM PBS}$  i nekoliko kapi surfaktanta. Na sistem je primenjeno električno polje od  $25.5 \text{ Vcm}^{-1}$ . Levi mikrograf predstavlja poziciju perle pod belom svetlošću dok su ostali mikrografi snimljeni u mraku. Prikazani grafik predstavlja evoluciju visine  $h$  u funkciji vremena  $t$ <sup>133</sup>.

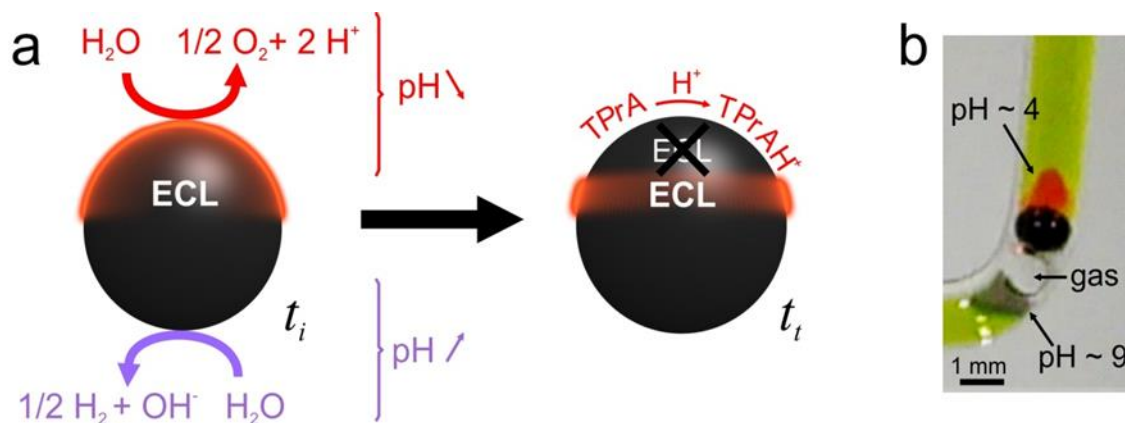
Leva strana slike 9b, snimljena pod ambijentnim svetlom, prikazuje GC sferu u kapilari. Oblik perle je potpuno sferan, ali usled optičkog efekta nastalog zbog zakrivljenosti zida kapilare perla izgleda izduženo duž ekvatorijalne ose.



Svetlo je potom ugašeno i električno polje je nametnuto. ECL je generisana na anodnom polu BE, koja lako mogla biti uočena makroskopskim posmatranjem perle golim okom (slika 9b). Početno vreme  $t=0$  je definisano kao vreme nakon fokusiranja kamere na ECL signal, što omogućava njegovu pravilnu vizualizaciju. Potrebno je 6s za stvaranja mehura  $H_2$  ispod perle, nakon čeha počinje da se dešava levitacija, fenomen koji bi inače bio jasno uočljiv pod ambijetalnim svetlom. Surfaktant je dodat rastvoru kako bi proizveo homogeno formiranje mehurova  $H_2$  i olakšao njihovo kontinuirano oslobađanje sa površine perle uzrokujući njeno uniformno kretanje<sup>170</sup>.

Grafik na slici 9b prikazuje visinu evolucije perle  $h$  tokom vremena  $t$ . Visina  $h$  je definisana kao rastojanje između ekvatorijalne ose imobilizovane perle na slici levo i centra ECL smitujuće oblasti. Ova kriva se može podeliti na tri posebna dela iz kojih dobija podatak o brzini kretanja perle na osnovu nagiba krive. U prvom delu krive sfera se ne kreće. Ovaj deo odgovara periodu akumulacije mehurića ispod perle za stvaranje dovoljno velike sile potiska koja može po svom intenzitetu da nadvlada gravitaciju. Posle ove početne faze, promena u visini je linearna tokom sedam sekundi pri brzini od  $v_1 = 2 \text{ mm s}^{-1}$  tj. približno dve dužine sfere po sekundi. Na kraju, zbog koničnog oblika elektrohemijske ćelije, prostor između perle i staklenih zidova postaje veći kako visina na kojoj se perla nalazi raste pri čemu dolazi do oslobađanja mehurića ispod perle što rezultuje u smanjenju brzine tokom treće faze ( $v_2 = 0.6 \text{ mm s}^{-1}$ ). Lebdenje je zaustavljeno isključivanjem generatora električnog polja. Ovo dovodi do propadanja kuglice pod uticajem gravitacije. Novo podizanje perle može biti izazvano ponovnom primenom spoljašnjeg električnog polja. Prema Slici 9b, profil ECL<sup>123</sup> bi trebalo da prati oblik anodnog pola što bi teorijski trebalo da rezultuje u osvetljavanju gornje hemisfere GC perle. To je bio slučaj u pojedinim momentima eksperimenta, međutim tokom rada je primećeno formiranje ECL regiona prstenastog oblika. Da bi se razumele ove promene, dodatno smo ispitivali parametre koji utiču na ECL profil na GC perli.

Dodatna istraživanja su pokazala da je pH sistema ključni parametar za indukovanje ECL mehanizma. Poznato je da je ECL mehanizam efektivan na  $\text{pH} > 5.5$ , sa maksimumom intenziteta na  $\text{pH} = 7.5$ . TPrA je nerastvoran na višim pH i protonovan na nižim pH (kao i TPrA<sup>•+</sup>) što inhibira ECL mehanizam<sup>83</sup>. To je razlog korišćenja PBS pufera u eksperimentima, koji obezbeđuje konstantnu vrednost pH od 7.4 pod normalnim uslovima. Međutim, u zavisnosti od primenjenog potencijala, voda takođe može biti oksidovana na anodnoj hemisferi sfere sledećom reakcijom:



**Slika 10.** Kontrola oblika ECL emisionne zone pomoću pH rastvora a) Mehaniizam odgovoran za oblik ECL – emitujuće oblasti na perli b) Optički mikrograf GC perle u U – ćelji ispunjene 100mM PBS koji sadrži 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , 100 mM TPrA i univerzalni indikator. Sistem je izložen spoljašnjem električnom polju od 25.5 V  $\text{cm}^{-1133}$ .

Oksidacioni pik koji odgovara ovoj reakciji se može uočiti na Slici 8. Oksidacija vode počinje na znatno višem anodnom potencijalu (oko 1,5 V mereno u odnosu na Ag/AgCl (3 M KCl)) u odnosu na ECL reakciju. Teorijski napon polarizacije neophodan za postizanje istovremene redukcije vode (reakcija 8) na katodnom polu i ECL emisije i oksidacije vode (reakcija 11) na anodnom polu odgovara zbiru potencijala na kome se dešavaju oksidacija i redukcija vode tj. 1.5 V + 1.1 V = 2.6 V. Ova vrednost odgovara vrednosti  $\Delta V$  primenjenoj na Slici 9b. Prethodno navedeno ukazuje na to da se oksidacija vode odvija na samom vrhu perle gde je potencijal polarizacije najviši, indukujući stoga lokalni pad pH.

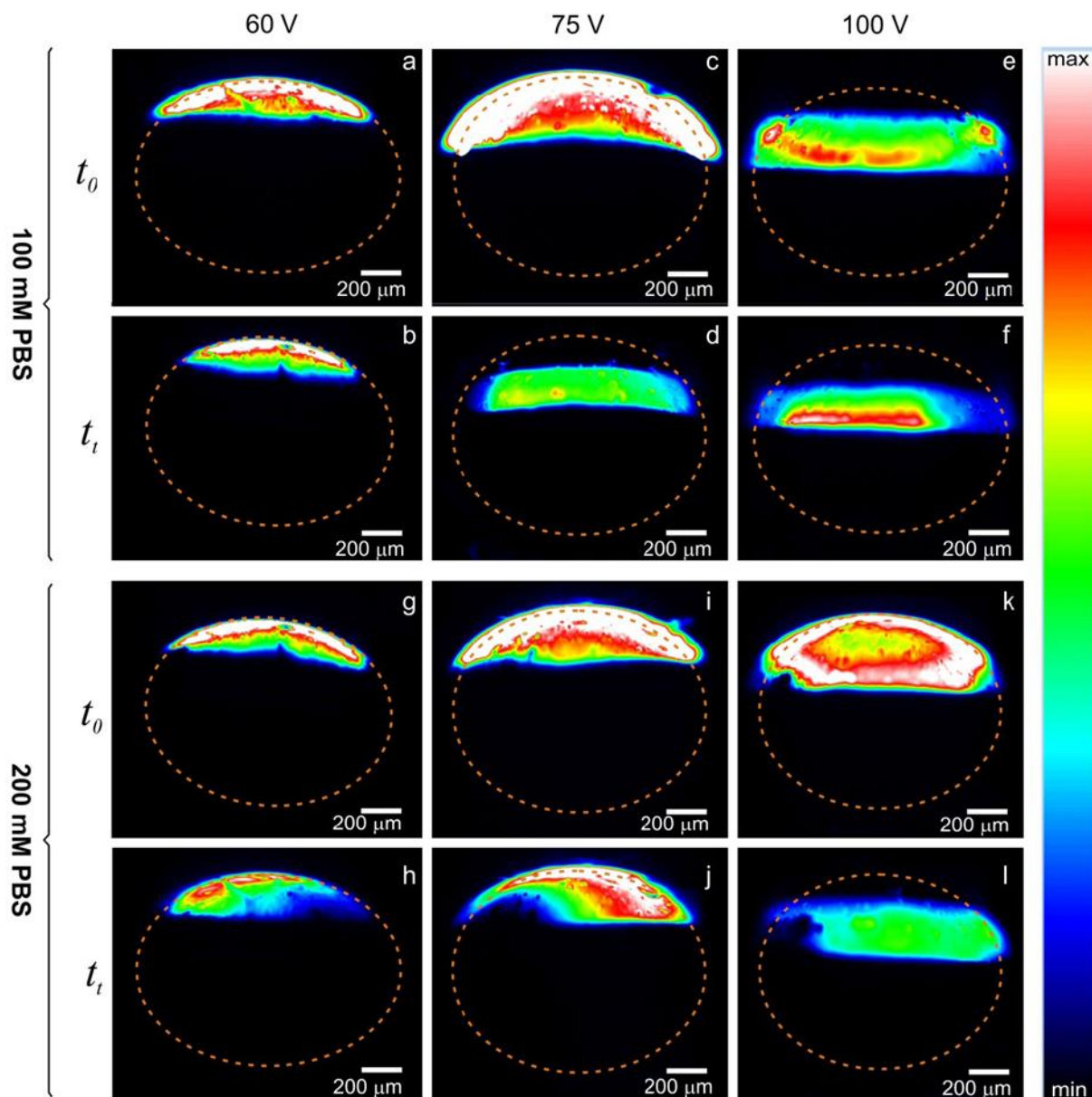
Da bi se proverila ovakva variranja pH, eksperimenti su izvođeni u prisustvu pH indikatora. Na GC perlu je primenjeno električno polje istog intenziteta kao što je ranije navedeno. Rastvor koji je korišćen u ovom slučaju je skoro identičan po sastavu prethodno korišćenom rastvoru s time što je u ovom posebnom slučaju izostavljen surfaktant uz dodatak nekoliko kapi univerzalnog pH indikatora. Slika 10b jasno pokazuje da se variranje pH vrednosti, tokom eksperimenta, dešava na reaktivnim polovima BE. Zaista, može se zaključiti, kao što je i očekivano, da redukcija vode uz izdvajanje gasovitog vodonika dovodi do povećanja

pH vrednosti ( $\text{pH} \approx 9$ , reakcija 8) u okolini katodnog pola sfere. Važno je napomenuti da je u ovom konkretnom slučaju odsustvo surfaktanta izazvalo stvaranje velikog mehura  $\text{H}_2$  koji se može uočiti na dnu perle. Na vrhu perle, pH dostiže vrednost od oko 4 pH jedinice, potvrđujući na taj način da se oksidacija vode (reakcija 11) dešava na anodnom polu. Ovaj eksperiment navodi na zaključak da su oksidacija vode i ECL reakcije u kompeticiji na anodnom polu perle. Kao je prikazano na Slici 10a, ova reakcija direktno utiče na ECL proces s obzirom na to da indukuje lokalni pad pH, dovodeći na taj način do protonovanja TPrA, što u krajnjem slučaju ima za posledicu gašenje ECL na gornjem delu sfere, čime se stvara ECL u obliku prstena umesto očekivanog hemisfernog oblika.

Da bismo precizno snimili ECL profil oko GC perle tokom BE, izvedeni su dodatni eksperimenti sa BPE pozicioniranom ispred mikroskopa (objektiv x5) opremljenog CCD kamerom. Kako bi se izbeglo kretanje perle koje je beskorisno u ovoj vrsti eksperimenta izostavljen je surfaktant. Istraživali smo uticaj parametara kao što su primenjeni napon, kapacitet pufera koji direktno utiču na pH gradijent oko perle, a time i na ECL profil. Iznenađujuće, ECL niskog intenziteta je bio primetan pri električom polju kao što je  $6.2 \text{ V cm}^{-1}$ . Razlog za indukovanje ECL električnim poljem niskog intenziteta leži u činjenici da, u ovom konkretnom slučaju, perla dodiruje zidove kapilare ostavljajući veoma tanak sloj tečnosti u prostoru između svoje površine i površine stakla. Ovde prisutna konfiguracija predstavlja prelaz između klasičnih slučajeva otvorenog i zatvorenog sistema BE, koje su prethodno diskutovane u delovima 5.3.2 i 5.3.3. Električni otpor tankog tečnog sloja je mnogo veći od otpora rastvora u ostatku kapilare, što dovodi do lokalnog povećanja pada napona koji je neophodan za odvijanje reakcija oksidacije i redukcije.

Tokom ovih eksperimenata, vrednost primenjenog napona dovodi do pojave početnog oblika ECL. Kao što se može videti sa Slike 11, ECL – emitujuća zona se ne širi na rastvor koji okružuje perlu i ostaje isključivo ograničena na površinu perle zahvaljujući visokoj koncentraciji TPrA koja je inače odgovorna za ograničavanje debljine reakcionog ECL sloja. Ovaj početni oblik se brzo menja u prelaznom stanju (tipično posle nekoliko sekundi). Dva vremena se sada smatraju reprezentativnim jer odgovaraju karakterističnim ECL oblicima. Prvo je početno vreme  $t_0$  koje odgovara početnom ECL obliku kada se postigne željeni napon. Drugi,  $t_t$ , odgovara prelaznom obliku. Slike dobijene na  $t_0$  i  $t_t$  za dve koncentracije pufera pod primenjenim naponima od 60 V, 75 V i 100 V su prikazane na Slici 11. Kao što je očekivano, direktna posledica povećanja potencijala između napajajućih elektroda je pomeranje ECL zone

prema ekvatorijalnoj osi sfere. U stvari, područje u kome je vrednost anodnog potencijala dovoljno velika da indukuje generisanje ECL širi se ka sredini perle. Na Slici 11a, c, g i i, se može videti da hemisferni ECL oblici nastaju u početnoj fazi  $t_0$  u datim eksperimentalnim uslovima: 100 mM PBS,  $E = 60$  V ili 75 V. Na vrednosti primenjenog napona od 60 V, ovaj oblik ostaje relativno isti tokom celog eksperimenta dok je na 75 V uočena brza promena morfologije ECL prstena što se može videti sa Slike 11d.



**Slika 11.** CCD slike prikazuju intenzitet ECL profila snimljenog na GC perili u U – ćeliji ispunjenom 100 mM rastvorom PBS koji sarži 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  i 100 mM TPrA, na  $t = t_0$  primenom 60 V, 75 V i 100 V između napajajućih elektroda. Šest slika koje su prikazane u prva dva reda su dobijene korišćenjem 100 mM koncentracije PBS dok je ostatak dobijen upotrebom 200 mM koncentracije PBS<sup>133</sup>.

Takvo ponašanje sistema se može objasniti pomoću mehanizma koji je prethodno razmotren i prikazanog na Slici 9b. Zaključeno je da razlika potencijala od 60 V ne predstavlja dovoljnu pokretačku snagu za stvaranje značajne promene pH što dovodi do toga da je ECL oblik hemisferičan. Nasuprot tome, spoljni napon od 75 V je dovoljno visok da izazove formiranje protona na anodnom polu dovoljnom brzinom i na taj način smanji pH vrednost posle datog vremena ( $t_i$ ) u 100 mM PBS rastvoru. Stoga, formiranje elektrognerisanog pH gradijenta ograničava ECL zonu na oblik prstena. Ovaj opšti trend je potvrđen Slikom 11e, koja ukazuje na to da primenom napona od 100 V dolazi do trenutnog generisanja prstena na vremenu  $t_0$ . Uticaj kapaciteta pufera na ove eksperimente je takođe ispitivan. Upotrebom pufera višeg kapaciteta (200 mM PBS), ECL oblik ostaje hemisferičan sve do napona od 75 V, čak i nakon nekoliko sekundi (Slika 11j).

Pod ovim uslovima, nije primećen ECL prsten jer je kapacitet pufera dovoljno jak da onemogući protonovanje TPrA, promovišući emisiju ECL preko površine celog anodnog pola. Takođe, na ovoj koncentraciji pufera, početni ECL oblik (na  $t_0$ ) korišćenjem 100 V je hemisferičan (Slika 16k), što nije bio slučaj u 100 mM PBS (Slika 11e). Ovi rezultati još jednom potvrđuju da je ECL mehanizam zavistan od pH.

Eksperimenti jasno pokazuju da oblik ECL-emitujuće zone na BPE u uslovima statičkog eksperimenta može biti fino podešavan korišćenjem parametara koji se lako mogu kontrolisati (npr. jačina električnog polja ili koncentracija pufera). U tom slučaju, ECL prsten idealno odgovara području anodnog pola gde je napon polarizacije dovoljno snažan da generiše ECL emisiju, ali gde je u isto vreme brzina oksidacije vode nedovoljno efikasna da izazove protonovanje TPrA ili njegovih radikala. U slučaju kretanja plivača situacija postaje komplikovanija, zbog difuzije protona, konvekcije usled formiranja mehura i samim tim kretanja bipolarnog plivača ima snažan uticaj na gradijente koncentracije vrsta koje učestvuju i na taj način na konačni oblik ECL emisije. Ipak, mehanizam koji indukuje promene ECL oblika, od hemisferičnog do oblika prstena, može se objasniti lokalnom varijacijom pH vrednosti koje se javljaju u blizini samog plivačau toku njegovog kretanja.

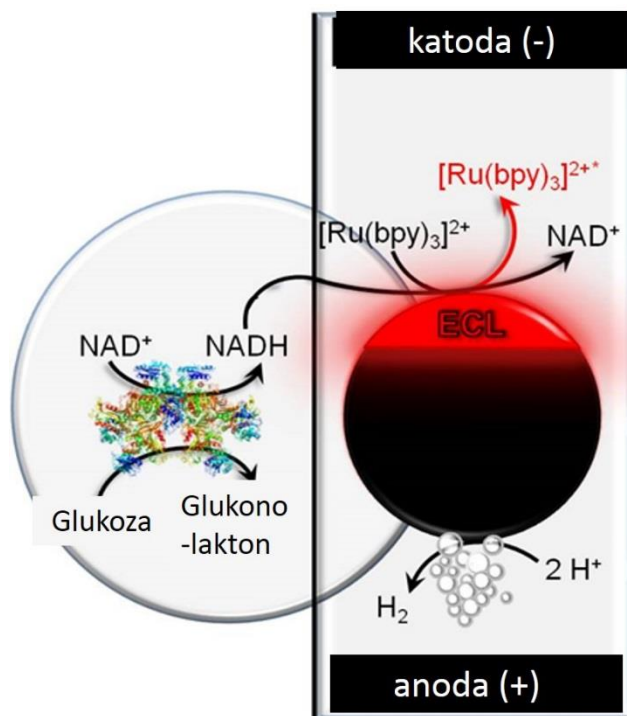
Ovaj rad prezentuje prvo kuplovanje bipolarne elektrohemije uz simultano generisanja ECL, što vodi prvom primeru plivača koji je u suštinskoj sprezi sa hemijskim izvorom svetlosti.

ECL omogućava direktan monitoring kretanja BPE, što je veoma važno kod autonomnih plivača.

### 3.3.10. Plivači kao emiteri svetlosti za enzimsku detekciju glukoze

Bipolarna elektrohemija nudi mogućnost dizajniranja plivača pomoću jednostavne primene spoljašnjeg električnog polja kroz rastvor što dovodi do lokalizovanog izdvajanja kiseonika i vodonika koji u sistemima ove vrste mogu biti iskorisćeni za pokretanje objekata malih dimenzija<sup>121-124</sup>. Asimetrična redoks aktivnost indukovana na BPE može se takođe koristiti za aktiviranje drugih funkcija kao što je gore predstavljena ECL emisija. Pošto je ECL emisija veoma osetljiva analitička metoda zbog različitih prednosti od kojih je najbitniji izuzetan odnos signala i šuma<sup>127</sup>, praćenje intenziteta ECL tokom kretanja plivača može se iskoristiti kao koristan analitički signal. U model sistemu  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$  jedino se ECL luminofora regeneriše tokom procesa, dok se koreaktant troši elektrohemijom reakcijom<sup>133</sup>.

Ipak ECL obezbeđuje visoku osetljivost i selektivnost detekcije sa širokim linearnim dinamičkim opsegom za brojne koreaktante. Milutinović i saradnici su dizajnirali senzor zasnovan na elektro-nataloženim ECL redoks hidrogelu koji je izložen koristeći glukoza dehidrogenazu kao model sistem<sup>61</sup>. Pokazali su da se ECL intenzitet redukcije  $\beta$ -nikotinamid adenine dinukleotida (NADH) nastalog enzimskom aktivnošću menja sa promenom koncentracijom supstrata. U dehidrogenaznom tipu enzimski katalizovane reakcije, dodavanje  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) je neophodno. On ima ulogu kofaktora u enzimskoj reakciji<sup>171,172</sup>. Pri oksidaciji substrata,  $\text{NAD}^+$  se istovremeno redukuje do NADH koji se ponaša kao ECL koreaktant. Postoje brojni primeri sistema sa ECL detekcijom koji se baziraju na aktivnosti alcohol-dehidrogenaze<sup>173-175</sup> i glukoza-dehidrogenaze<sup>171,176</sup>. ECL emisija svetlosti je dragocen analitički signal iz razloga što  $\text{NAD}^+$  nije u stanju da igra ulogu koreaktanta u ECL mehanizmu za razliku od njegovog redukovanog oblika NADH (u slučaju istovremenog prisustva enzima i njegovog substrata). Važno je napomenuti da se NADH koji se koristi kao koreaktant za ECL regeneriše enzimskom reakcijom. Ovde predstavljamo ECL bioplivača za detekciju glukoze putem simultane oksidacije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  enzimski proizvedenog NADH<sup>177</sup>.



**Slika 12.** Shematski prikaz enzimske vođene ECL posmatrane na površini bipolarnog plivača. Glukoza je oksidovana do glukonolaktona pomoću glukoza-dehidrogenaze (GDH) uz prisustvo  $\text{NAD}^+$  kao koenzima. Enzimski nastali NADH se ponaša kao *in situ* koreaktant za generisanje ECL<sup>94</sup>.

Na Slici 12 je prikazan princip plivača koji generiše ECL emisiju samo u prisustvu glukoze. Dizajniranje sistema za bipolarne elektrohemijske eksperimente ove vrste je postignut korišćenjem sličnog protokola kao za levitaciju rutennijumovih ili luminol ECL plivača (Slika7). GC perla prečnika  $d \approx 1$  mm je ubačana u jedan krak U- kapilare. Pogonski mehanizam je zasnovan na nastanku  $\text{H}_2$  mehurića na katodi (reakcija 8). U odsustvu glukoze, jedine reakcije koje se dešavaju na anodnom polu pivača su oksidacija kompleksa rutenijuma kao i vode prema reakcijama 10 i 11, respektivno. Dakle, oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ne generiše ECL s obzirom na to da kofaktor ostaje u ECL neaktivnom  $\text{NAD}^+$  obliku. Prema tome, do ECL emisije dolazi kada je enzimski sistem uključen substrat (glukoza). Kao što je i očekivano, GDH oksiduje glukožu do glukolaktona uz istovremenu konverziju  $\text{NAD}^+$  u NADH (Slika 12). U tom slučaju, reakcije transfera elektrona (ET) koje se dešavaju na anodnom BPE polu su mono-elektronska oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (reakcija 10) i NADH u odgovarajući katjon radikal (reakcija 12), koji mogu podstaknuti celu sekvencu reakcija koje dovode do emisije ECL:

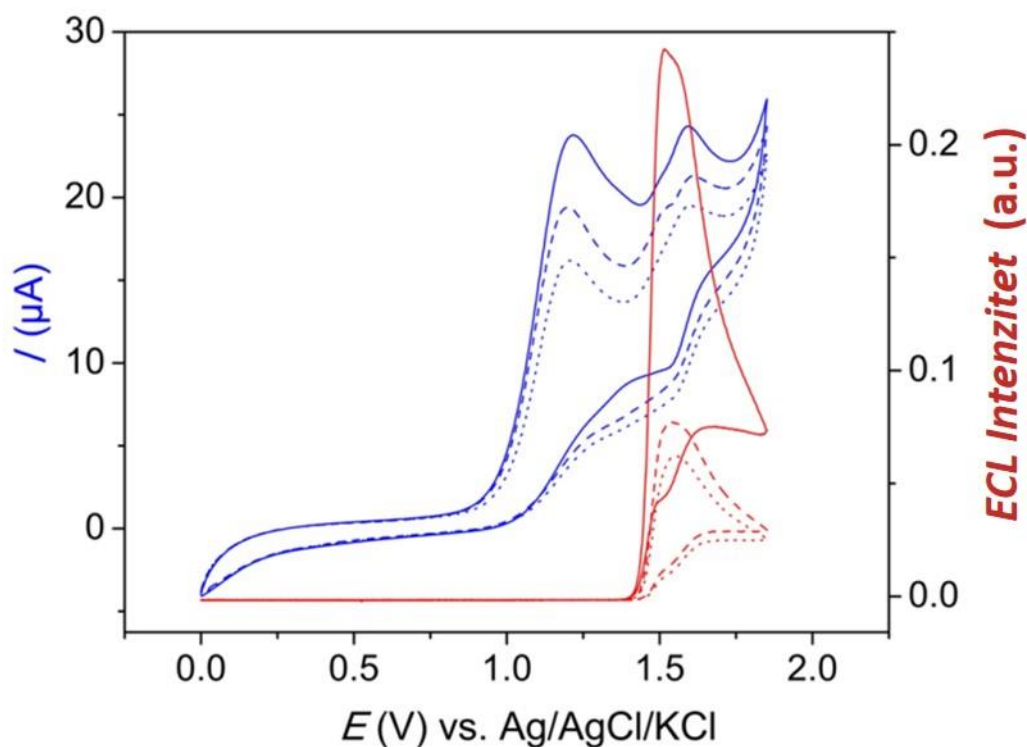




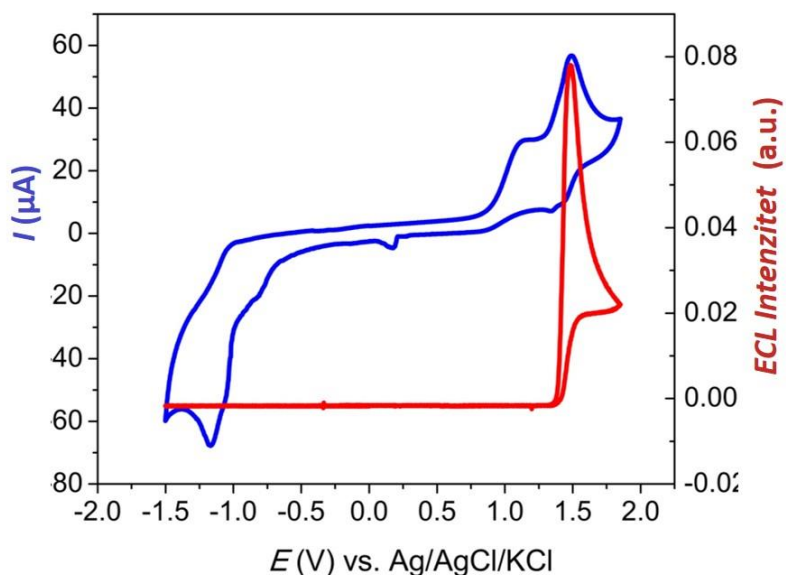
Budući da se  $\text{NAD}^+$  regeneriše na kraju ECL mehanizma, otuda je dostupan za ponovno učešće u enzimski katalizovanoj reakciji. Zbog toga, praćenje promene koncentracije glukoze tokom enzimski katalizovane oksidacije bi se moglo izvršiti pomoću ECL tehnike.

Slika 13 predstavlja ciklične voltamogramme (plave linije) i odgovarajuće ECL intenzitete (crvene linije) različitih serija rastvora koje sadrže različite koncentracije glukoze. Ovi podaci su zabeleženi 30 minuta nakon mešanja GDH,  $\text{NAD}^+$  i glukoze u 100 mM PBS rastvoru (pH 7.4). Oksidacija NADH se prva dešava i ET je nepovratna reakcija sa anodnim pikom centriranim na  $\sim 1.2\text{V}$  (mereno nasuprot  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  (3 M  $\text{KCl}$ )). Oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  se odvija na nešto višim anodnim potencijalima ( $\sim 1.55\text{ V}$ ). Pažljivim tumačenjem snimljenih ECL signala i cikličnih voltamograma može se uočiti savršeno poklapanje emisije sa pikom na kome se dešava oksidacija  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . ECL mehanizam uključuje reakcije između obe intermedijerne vrste koje se formiraju oksidacijom NADH i  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Povećanje koncentracije glukoze sa 5 na 40 mM rezultuje porastom koncentracije NADH u rastvoru. Ovaj porast se može pratiti merenjem ECL intenziteta pomoću fotomultiplikatorskom cevi. Kao što je pretpostavljeno, dobijeni rezultati ukazuju na to da intenzitet ECL zavisi od početnog sadržaja glukoze.



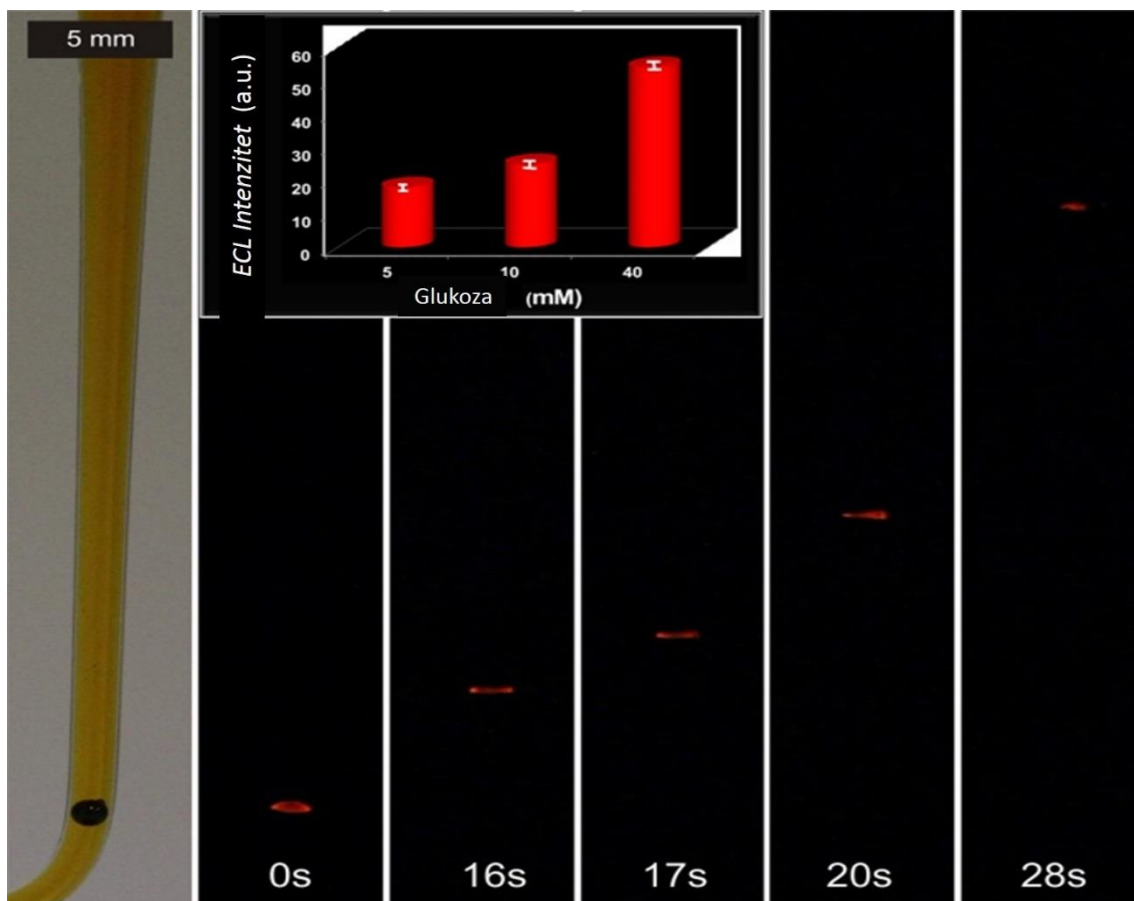


**Slika 13.** Ciklični voltamogrami (plave linije) i ECL signali (crvene linije) 1.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u prisustvu  $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  GDH,  $10 \text{ mM NAD}^+$  i različitih koncentracija glukoze (5 mM, tačkaste linije, 10 mM, isprekidane linije i 40 mM, pune linije) u  $100 \text{ mM PBS}$  rastvoru (pH 7.4). GC elektroda (od istog materijala kao i plivač) je korišćena za snimanje obe struje i ECL. Brzina snimanja je iznosila  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .<sup>177</sup>



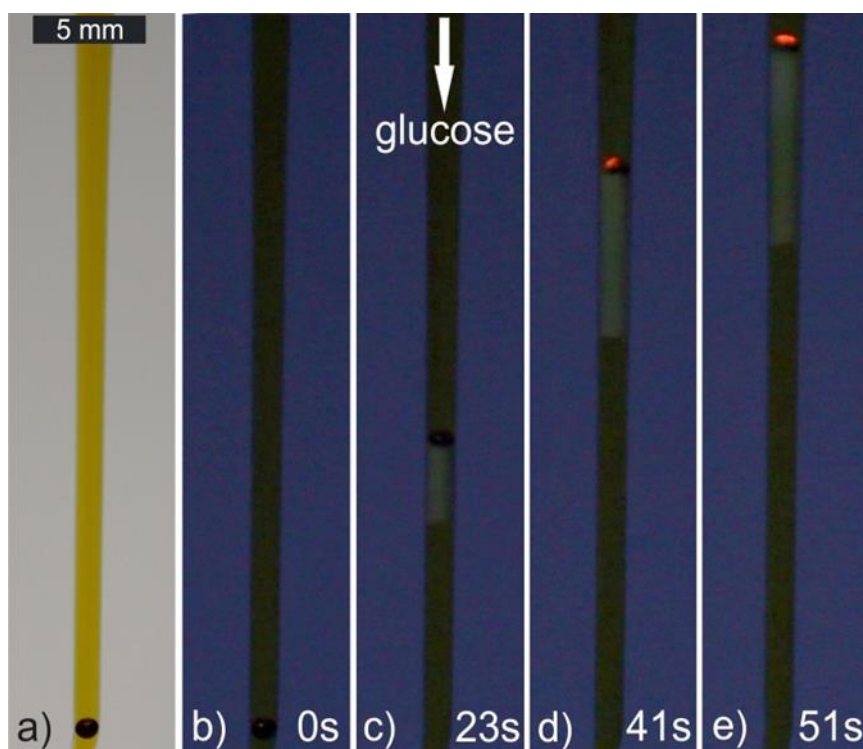
**Slika 14.** Ciklični voltamogram (plavi) i ECL signal (crven) snimljeni u  $100 \text{ mM}$  rastvoru PBS (pH= 7.4) koji sadrži  $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  GDH, 1.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , 10 mM  $\text{NAD}^+$ , 10 mM glukoze i nekoliko kapi surfaktanta. Ovaj eksperiment je izveden uz upotrebu ručno pravljenе GC elektrode pri brzini promene elktrodnog potencijala radne elektrode od  $50 \text{ mVs}^{-1}$ .

Minimalna  $\Delta V$  koju je potrebno primeniti kako bi došlo do odvijanja željenih redoks reakcije dešavaju na površini plivča može se izračunati pomoću jednačine 5. Podaci potrebni za ovu vrstu izračunavanja mogu se dobiti iz istovremeno snimljenog cikličnog voltamograma i ECL emisije na ručno pravljenoj GC elektrodi (Slika 14). Redukcija vode se odvija na  $-0.75$  V u odnosu na Ag/AgCl (3 M KCl) dok se ECL emisija dešava na  $1.55$  V. Električno polje  $\mathcal{E}$  mora, u prvom redu aproksimacije, iznositi najmanje  $21.7$  Vcm<sup>-1</sup> koristeći izračunati polarizacioni potencijal od  $\Delta V_{\min} = 2.3$  V za perlu prečnika  $1$  mm.



**Slika 15.** ECL određivanje koncentracionog profila glukoze tokom kretanja plivača. Serija optičkih mikrografa koji pokazuju GC perlu koja emituje ECL u različitim periodima tokom svog kretanja. GC perla se nalazi u ćeliji u obliku slova U koja je ispunjena  $100$  mM rastvorom PBS (pH 7.4) u kome se nalazi  $10$  U.mL<sup>-1</sup> GDH,  $1.5$  mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>,  $10$  mM NAD<sup>+</sup>,  $40$  mM glukoze i nekoliko kapi surfaktanta u električnom polju od  $23$  V cm<sup>-1</sup>. Leva slika je snimljena pod belom svetlošću dok su druge snimljene u mraku. Grafik pokazuje zavisnost ECL signala od koncentracije glukoze.

Slika 15 pokazuje indukovanu levitaciju ECL bioplivača. Primena odgovarajućeg električnog polja pokreće asimetrične elektrohemijske reakcije na oba pola perle. ECL se generiše na anodnom polu plivača, i njena emisija je jasno vidljiva golim okom u prisustvu glukoze (položaj perle se može snimiti pomoću standardne kamere tokom uspona plivača). Negativan kontrolni eksperiment je snimljen bez prisustva glukoze u rastvoru pri čemu nije bilo moguće detektovanje ECL emisije, kao što je očekivano u slučaju odsustva supstrata. Takav pristup, koji se naziva još i fotoskopija, postaje sve popularniji jer se lako izvodi i jeftin je<sup>178,179</sup>. ECL intenzitet koji se prati na vrhu perle je proporcionalna koncentraciji glukoze što se može videti na Slici 13. Kao što je navedeno iznad, primećeno je da se morfologija ECL emisije menja sa vremenom. Međutim, sveukupni intenzitet je analiziran (Image J softverom) na osnovu čega je zaključeno da postoji direktna zavisnost između koncentracije glukoze i relativnog signala luminiscencije.



**Slika 16.** Slika ilustracije uključivanja ECL tokom kretanja plivača u vertikalnom gradijentu koncentracije glukoze. U- ćelija je ispunjena 100 mM PBS rastvora (pH 7.4) koji sadrži 2.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ,  $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  GDH i 10 mM  $\text{NAD}^+$ . Isti rasvor u koji je dodato 40 mM glukoze je uveden je na vrh kapilare. Uspostavljeni vertikalni koncentracioni gradijent otkriven je ECL-om. Leva slika (a) je snimljena pod ambijentalnom svetlošću pre primene električnog polja. Slike b-e su snimljene primenom električnog polja od  $23 \text{ V cm}^{-1}$  pod niskim intenzitetom spoljašnje bele svetlosti sa ciljem da se snimi kretanje perle tokom ECL detekcije glukoze<sup>177</sup>.

Zaista, ECL intenzitet odražava lokalnu koncentraciju NADH što je u direktnoj vezi sa enzimskom aktivnošću a samim tim i sa promenom koncentracije supstrata. Zbog toga u ovom slučaju, ECL plivač je dinamičan „izvestilac“ lokalne koncentracije glukoze. Zbog zavisnosti intenziteta ECL od koncentracije glukoze, ovaj pristup je pogodan i za praćenje prostorne distribucije variranja koncentracije glukoze. Drugim rečima, ako se plivač kreće u nehomogenom medijumu, onda će se ECL aktivirati samo na mestima gde je prisutan analit. Da bismo demonstrirali sposobnost uključivanja ECL, GC perla je pozicionirana u kapilari ispunjenoj rastvorom PBS-a koji sadrži ECL „izvestioca“, enzim i koenzim. Drugi rastvor sadrži glukozu koja se na samom vrhu kapilare dodaje u kapima (strelica na Slici 16c). Ovo stvara vertikalni koncentracioni gradijent pri čemu se najviša količina glukoze, a samim tim i NADH lokalizuje u gornjem delu. Kao što je ranije rečeno, GC perla se nalazi na dnu kapilare kada se posmatra pod belom svetlošću (Slika 16a). Kada se po uključivanju dostigne dovoljna jačina električnog polja vrši se redukcija protona u delu rastvora koji je smešten ispod BPE. Ovo se jasno vidi na slici 16c gde se kolona mehurića lokalizovana ispod perle kreće nagore. Čim GC perla dostigne mesto gde se nalazi glukoza u rastvoru, ECL se javlja, čime se otvara mogućnost dinamičke detekcije glukoze (Slika 16d). Kako se kretanje plivača kontinuirano nastavlja ka području veće koncentracije glukoze (ka vrhu kapilare) to se njegov ECL intenzitet povećava (Slika 16e). Ovaj eksperiment demonstrira kombinaciju enzimске i ECL osetljivosti izveštaja o analitu u prostoru i vremenu.

### 3.3.11. Zaključak

Po prvi put je demonstriran pogonski mehanizam plivača koji je u sprezi sa hemijskim izvorom svetlosti zbog sinergijskog delovanja BE u smislu istovremenog generisanja ECL i nastanka  $H_2$  mehurića razlaganjem vode. Pažljivom kontrolom primenjenog napona, koncentracije surfaktanata i kapaciteta korišćenog pufera, može se izbeći oksidacija vode na anodnom polu i kontrolisati ECL intenzitet upotrebom kompleksa rutenijuma. Nadalje, dizajn dinamičkog sistema vođen BE-om za detekciju glukoze u gradijentu koncentracije ispitivan je ECL plivačem koji je opisan po prvi put. Ovaj doprinos prikazuje da razvoj takvih ECL plivača može voditi u smeru bioanalitičke primene koja omogućava proučavanje lokalno nehomogenih uzoraka. Zbog toga, kombinovanje BE i ECL nudi jedinstvenu analitičku platformu koja se zasniva na dizajnu pametnih dinamičkih sistema za direktno vizuelno očitavanje. Na kraju, takvi ECL plivači liče na biološke sisteme i mogu se smatrati veštačkim analogom bioluminiscentnih riba i drugih morskih stvorenja.

#### 4. EKSPERIMENTALNI DEO

**Materijali.** Sve hemikalije koje su korišćene u ovom radu su analitičke čistoće. Rastvori su pripremljeni rastvaranjem odgovarajuće supstance u Milli-Q vodi ( $R = 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ). Tri-n-propilamine  $\geq 98\%$ , tris(2,2'-bipiridil) dihlrorutenijum(II) heksahidrat, luminol (3-aminofthalohidrazid, 97%), bis(2,2'-bipiridin)-4'-metil-4-carboksibipiridin-rutenijum N-sukcinimidil estar-bis(heksafluorofosfat), dvobazni natrijum-fosfat heptahidrat, monobazni natrijum-fosfat monohidrat, glukoza dehidrogenaza, rastvor univerzalnog indikatora (pH opseg od 3 do 10 pH jedinica), (EC1.1.1.47, iz *Thermoplasma acidophilum*),  $\beta$ - nikotinamid adenin dinukleotid hidrat ( $\text{NAD}^+$ ),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukeotid redukovan dikalijumovom soli ( $\text{NADH}$ ), streptavidin iz *Streptomyces avidinii*, Tween 20, goveđi serum albumin, i biotinirovani kozje anti-humano sekundarno antitelo su nabavljeni od distributera Sigma Aldrich. D-(+)-anhidrovana glukoza i rastvor vodonik peroksida (30%) su nabavljeni od distributera Fluka. Natrijum hidroksid je nabavljen od Acros. Antitelo za prepoznavanje specifično je za interleukin 8 (IL-8), komplementarno biotinirovano antitelo za detekciju i IL-8 rekombinantni protein su dobijeni od R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Polistirenske (PS) perle naručene su od Kisker Biotech GmbH & Co. Korišćen je Gojo NXT surfaktant. Perle od staklastog ugljenika (Sferični prah 630–1000 nm, tip 2) su nabavljene od kompanije Alfa Aesar<sup>®</sup>. Rastvor za bezelektrodnu depoziciju zlata (Oromerse Part B, Technic Inc.) i hidrofilni track-etched PC filter membrane (prečnika 47 mm, debljine 6  $\mu\text{m}$ ) sa prečnikom pore od 30 nm, gustine pora  $6 \times 10^8$  pora/ $\text{cm}^2$  su korišćene za proizvodnju NEE- ova.

**Aparatura.** Svi elektrohemjski i ECL eksperimenti su izvedeni pomoću  $\mu$ -Autolab Tip III I PGSTAT30 elektrohemjskim stanicama. Intenzitet ECL je meren korišćenjem Hamamatsu fotomultiplikatorske cevi R4632. Instrumenti za slikanje su epifluorescentni mikroskop Olympus BXFM-ILHSPU opremljen EM-CCD kamerom (eng. *Electron Multiplying Charge Coupled Device*) Kamerom (Hamamatsu, 9100-13). Pokreti perili su snimani pomoću komercijalnih digitalnih kamera (Sony, Cyber-shot and Canon60 D). Električno polje generisano pomoću dva generator napona: Electrometer 6517B proizvođača Keithley i Elektroforetskog mikrokompijutera sa direktnim izvorom jednosmerne struje E862 proizvođača Consort.

## Poglavlje 3.1.

### 3.1.1. Imunotestovi sa PS perlama prečnika 3 $\mu\text{m}$

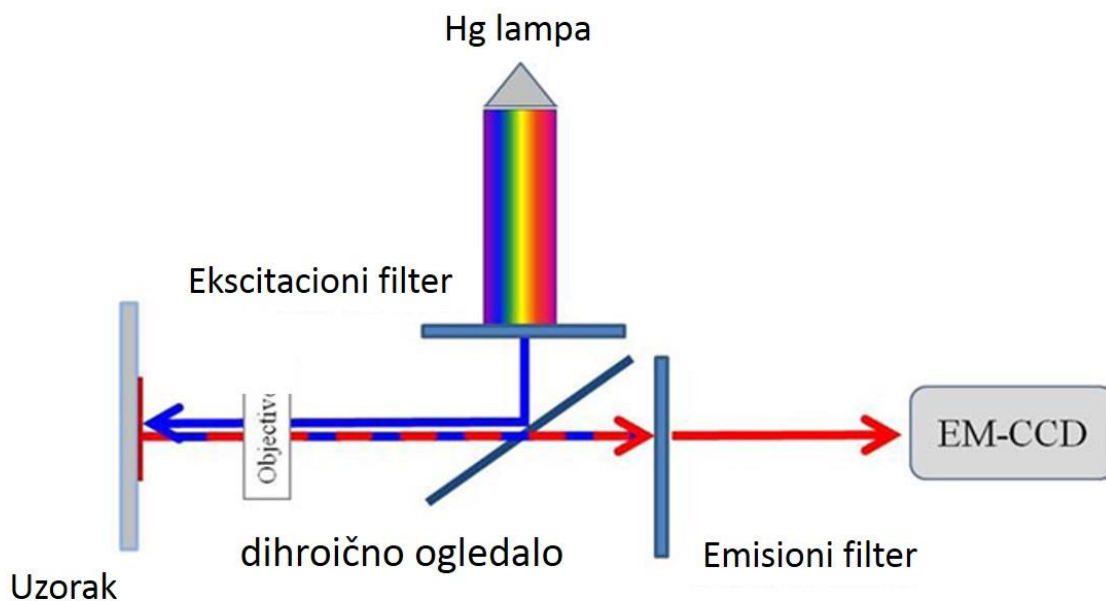
Alikvoti za skladištenje antigena su pripremljeni u PBS 1x/BSA0.1% dok su alikvoti za skladištenje antitela za detekciju su pripremljeni u slanom astvoru tris-pufera (TBS StartingBlock). Svaki korak pranja je izveden pomoću 100  $\mu\text{l}$  TBS-om sa 1% Tween 20. Test je izveden dvočasovnim inkubiranjem mikroperli funkcionalizovanim sa antitelom za prepoznavanje (anti-IL-8) uzorka koji sadrži antigen (razblažen do odgovarajuće koncentracije sa PBS StartingBlock) i ispiranjem u narednom koraku. Zatim su tako pripremljene perle inkubirane 30 min u 50  $\mu\text{l}$  rastvora detekcionog antitela (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antitela u PBS) posle čega je usledio ispiranje sistema. Perle su potom inkubirane u rastvoru biotinizovanog detekcionog antitela i ponovo isprane. Na kraju, ECL marker je prikazan za formirani imunokompleks uvođenjem perli u rastvor koji sadrži  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  kompleks modifikovan streptavidinom. Kompleks rutenijuma modifikovanog streptavidinom, koji se koristi kao marker, se sintetiše postupkom opisanim od strane Deiss i saradnika. Posle zadnjeg koraka ispiranja, perle se su imobilizovane na površini elektrode za ECL snimanje.

### 3.1.2. Funkcionalizacija perli prečnika 12 $\mu\text{m}$ markerom rutenijuma

Površina PS perli sa  $-\text{NH}_2$  površinskim grupama omogućava dalju funkcionalizaciju sa rutenijumskim markerom. 10  $\mu\text{l}$  2,5% suspenzije perli je isprano pomoću rastvora PBS (pH=7.4) a potom su resuspendovane u 1ml PBS-a. Istovremeno, 1mg  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS estera (bis(2,2'-bipiridin)-4'-metil-4-carboksilbipiridin-rutenijum N-sukcinimidil estar-bis(heksafluorofosfat)) je rastvoren u 100  $\mu\text{l}$  dimetil sulfoksida i tako pripremljen rastvor je dodan suspenziji perli. Ova smeša je inkubirana 3 sata na  $+4^\circ\text{C}$  uz kontinualno mešanje. Posle inkubacije perle su višekratno (10-15 puta) ispirane rastvorom PBS-om pri čemu je svaki ciklus ispiranja praćen desetominutnim centrifugiranjem na 10000 obrtaja/s kako bi se perle odvojile od supernatanta. Konačno, ovako modifikovane perle su resuspendovane u 1 ml PBS-a i čuvane na  $4^\circ\text{C}$  do upotrebe.

### 3.1.3. PL i ECL snimanje

PL u ECL snimanja su izvedena upotrebom epifluorescentnog mikroskopa. Slika 1 predstavlja shematski prikaz korišćenog epifluorescentnog mikroskopa.

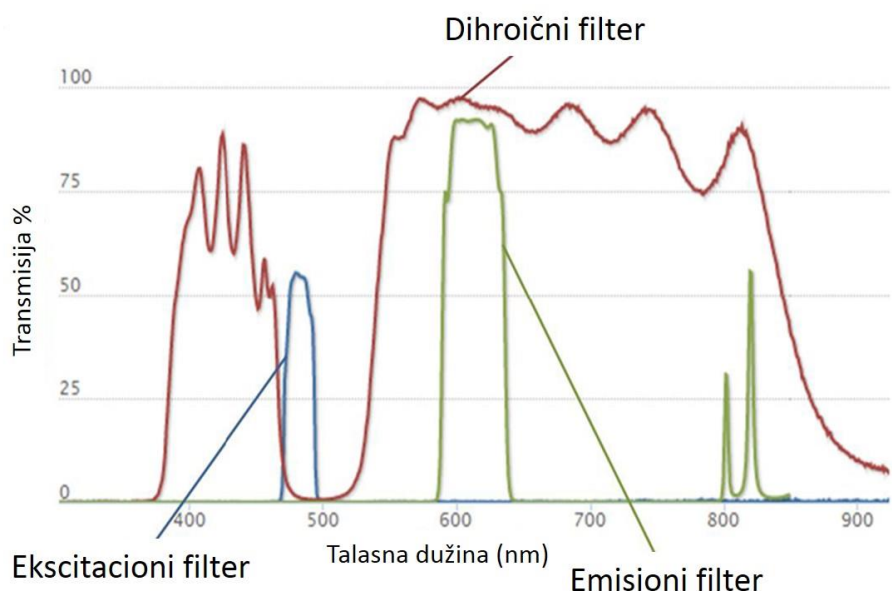


**Slika 1.** Shema epifluorescentnog mikroskopa

Mikroskop je opremljen živinom lampom. Specifični set filtera je korišćen za odabir talasne dužine pobuđivanja i emisije  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -fluorofore. Samo zraci talasne dužine koji odgovaraju ekscitaciji luminofore prole kroz i reflektuju se od dihroičnog ogledala prema uzorku. Dihroično ogledalo reflektuje zrake svetlosti niže talasne dužine dok u isto vreme omogućava prolaz zraka većih talasnih dužina. Ono je neophodno iz razloga što se objektiv ponašao i kao kondenzator sočiva (ekscitovana svetlost) i kao sočivo objektivna (emisiona svetlost) i stoga razdvajač zraka (*eng. beam splitter*) izoluje emitovanu svetlost od ekscitacione talasne dužine. Talasna dužina na kojoj razdvajač zraka omogućava višim talasnim dužinama da prođu mora biti postavljen između ekscitacione i emisione talasne dužine tako da se ekscitovana svetlost reflektuje dok je emisionoj svetlosti dozvoljen prolaz (**Slika 2**). U svim eksperimentima set filtera koji su korišćeni odgovaraju kompleksu rutenijuma kao luminofore. Komponente seta i transmisioni spektar filtera su prikazani u Tabeli 1 kao i na Slici 2 respektivno.

**Tabela 1.** Set filtera za PL snimanje kompleksa rutenijuma

Tip filtera	Oznaka	Talasna dužina
ekscitacioni	485DF22	485 nm
Dihroični	540DRLP	540 nm
emisioni	605DF50	605 nm

**Slika 2.** Transmisioni spektar seta filtera za fluoroforu kompleksa rutenijuma (preuzeto sa web stranice: [www.omegafilters.com](http://www.omegafilters.com)).

Mikroskop je opremljen sa 5x, 10x, 20x i 100x (Olimpus) objektivima od kojih poslednja tri objektiva rade na velikoj udaljenosti. Detekcija je izvršena pomoću CCD kamere (Hamamatsu EM-CCD digitalna kamera).

PL snimanja su često obavljena neposredno pre ECL slikanja (kako bi se omogućilo poređenje ove dve slike) tako da je postavka eksperimenta ista. Ručno pravljeni tro-elektrodna napravljena ćelija sa transparentnim prozorom je postavljena ispred objektiva mikroskopa. TPrA je rastvoren u PBS uz dodatak  $H_3PO_4$  (da bi se pH vrednost podesila na 7.4). Tako dobijeni rastvor je deaerisan tokom 30 min. pomoću argona<sup>2</sup>.



Elektrode su povezane sa potenciostat/galvanostat. Za PL snimanja nije primenjen potencijal. Nasuprot tome, za ECL snimanja nije potreban izvor svetlosti, ali je potrebna primena elektrodnog potencijala. ECL reakcija je generisana na konstantnom potencijalu od 1.2 V mereno u odnosu na Ag/AgCl (3 M KCl) i emitvana svetlost je detektovana pomoću EM-CCD kamere. Pri ovoj vrsti snimanja nije korišćen filter za umanjenje gubitka emitovane svetlosti. Za ECL eksperiment, celokupna oprema, uključujući mikroskop i kameru, je smeštena u tamnu kutiju kako bi se izbegao uticaj ambijentne svetlosti, čiji intenzitet može biti veći od ECL emisije. Takođe, da bi se proverio uticaj pozadinske svetlosti izvršeno je snimanje bez primene elektrodnog potencijala.

## Poglavlje 3.2.

### 3.2.1. Označavanje Streptavidina pomoću Ru(bpy)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> (SA-Ru)

Modifikacija je izvršena na način koji je opisan od strane Deiss i saradnika<sup>1</sup>. Kratak opis postupka modifikacije streptavidina: 1 mg streptavidina je rastvoren u 1 ml Milli-Q vode. 100 µl ovog rastvora je dodato u 810 µl vode i 90 µl 1xPBS (pH= 7.4). U tako dobijenu smešu je dodat 1 mg rutenijumskog kompleksa (Bis(2,2'-bipiridin)-4'-metil-4-carboksibipiridin-rutenijum N-sukcinimidil estarbis(heksafluorofosfatom), koji je rastvoren u 100 µl anhidrovanog DMSO. Smeša je kontinualno mešana tokom 4 sata na temperaturi od 4 °C. Potom je product reakcije prečišćen šesnaestočasovnom dijalizom nasuprot rastvora PBS (1x) (u ove svrhe je korišćena semipermeabina membrane sledeće specifikacije: *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 10kDa* od Thermo Scientific). Ru – SA kompleks je čuvan na +4°C do korišćenja.

### 3.2.2. Proizvodnja NEEs

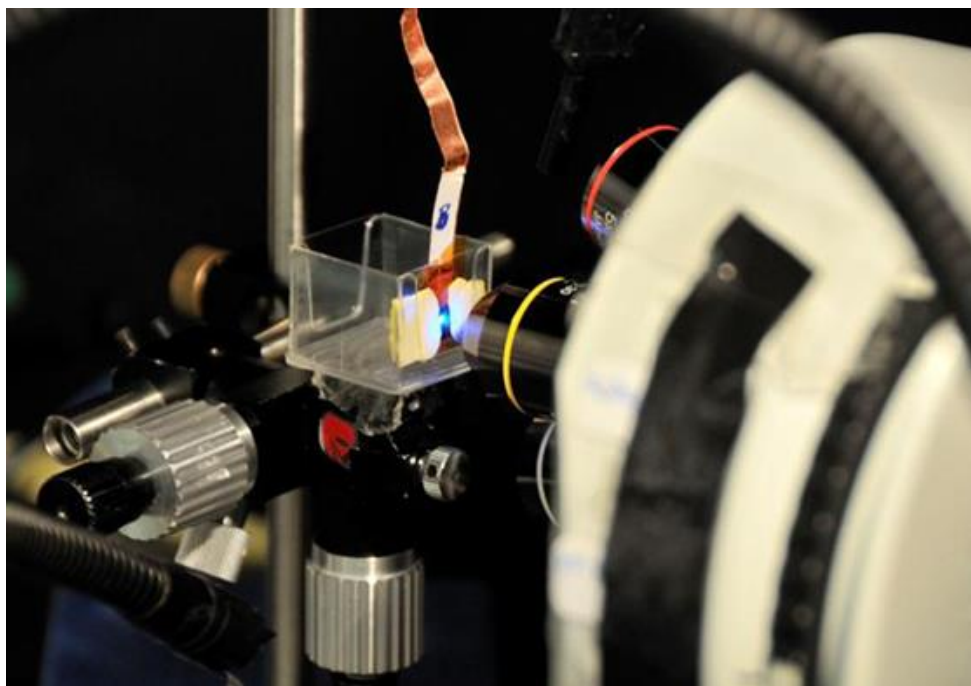
Au NEEs su pripremljeni bezelektrodom depozicijom zlata u poroznu strukturu *track-etched* polikarbonatne membrane koja je imala ulogu template. U ovom konkretnom radu, korišćena je membrane sa prosečnom gustinom pora od 6x10<sup>8</sup> po cm<sup>2</sup> i prosečnim prečnikom pore od 30 nm. Tokom bezelektrodnog taloženja zlata iz rastvora, svaka pora PC membrane je ispunjena metalnom nanožicom čiji je vrh u direktnom kontaktu sa rastvorom elektrolita tako da se površina NEE satoji od velikog broja nasumično raspoređenih nano-diskova. Membranske sa nanodiskovima su iskorišćena za proizvodnju elektrode odgovarajuće geometrije i veličine.

### 3.2.3. Priprema imunosenzora i analitički protokol

10  $\mu$ l Rastvora tTG ( $\gamma$ = 10  $\mu$ g/ml) je ukapano na površinu NEE i inkubirano 2 sata na 25 °C. Površina tTG-NEE je potom blokirana pomoću 1% BSA tokom 30 minuta što je u narednom koraku praćeno inkubacijom sa 10  $\mu$ l standardnog rastvora anti-tTG-a u 1x PBS-u (pH= 7.4) tokom 60 min. Nakon ispiranja rastvorom PBS (1x) (pH= 7.4) koji sadrži 0.05 % Tweena 20, zarobljeno primarno antitelo je kuplovano sa biotinilovanim kozjim anti-mišjim (ili anti-humano) sekundarnim antitelom tokom 60 min. Potom je ovako modifikovan NEE dodatno inkubiran sa rastvorom streptavidina označenim kompleksom rutenijuma tokom 30 min. na +4°C. U svim, do sada opisanim, postupcima, navlaženi filter papir je stavljen u inkubacioni kontejner koji je zapečaćen kako bi se izbeglo isparavanje rastvora. Inkubacija u tako pripremljenom sistemu je vršena na temperaturi od 25 °C izuzev poslednjeg koraka. Svi koraci inkubacije su bili praćene ispiranjem pomoću rastvora fosfatnog pufera. Konačno, biosensor je uronjen u troelektrodnu elektrohemijisku ćeliju koja sadrži 0.1 M TPrA u 0.1 M PBS (pH= 7.4) prethodno deaerisanog 20 minutnim uvođenjem azota<sup>2</sup>. ECL i ciklična voltometrija su snimani istovremeno pri brzini skeniranja od 100 mV/s.

### 3.2.4. PL i ECL Snimanje

PL I ECL snimanja su izvršeni istim epifluorescentnim mikroskopom koji je prethodno opisan. Aparatura koja je korišćena za izvođenje eksperimenata je bila slična aparaturi za snimanje ECL emisije GC perle. Ručno pravljen troelektrodna elektrohemijiska ćelija sa providnim otvorom je postavljena ispred objektiva mikroskopa (**Slika 3**) korišćenjem pozicionera sa submikronskom preciznošću (MDT616, Thorlabs) i mogućnošću poravnjanja po tri ose. ECL snimci uzoraka su snimljeni u PBS rastvoru (pH= 7.4) koji sadrži 1mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  u prisustvu različitih koncentracija koreaktanata. Za izvođenje ove vrste eksperimenata su korišćeni TPrA i DBAE kao koreaktanti. ECL reakcija je inicirana primenom konstantnog potencijala od 1.2 V (mereno u odnosu na Ag/AgCl (3 M NaCl) upotrebom hronoamperometrije dok je emtovana svetlost detektovana pomoću EM- CCD kamere.



**Slika 3.** Slika NEE postavljenog u praznu elektrohemijsku ćeliju. Ćelija je postavljena ispred objektivna mikroskopa za snimanje.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je elektrogenerisana hemiluminiscencija (*eng. Electrogenerated chemiluminescence - ECL*) kao i razvoj novih ECL sistema za bioanalitičku primenu. ECL snimanje na nivou pojedinačne sfere dalo je opšti opis ECL fenomena koji se javlja u ECL biotestovima zasnovanim na perlama.

Ispitivan je mehanizam  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  koreaktant sistema na nivou jedne sfere, sa TPrA ili DBAE, respektivno, tehnikom snimanja koja daje trodimenzionalni prikaz (3D prikaz) distribucije inteziteta svetlosti ECL. Novi pristup snimanja ECL omogućava dešifrovanje mehanističkog puta, testiranje efikasnosti koreaktanta i pokazuje povezane propratne optičke efekte. Mapiranje reaktivnosti demonstrira mehanističku putanju koja vodi do ECL emisije. Maksimalan ECL intenzitet se javlja u mikrometarskom regionu gde su koncentracije  $\text{TPrA}^{\bullet+}$  i  $\text{TPrA}^{\bullet}$  radikala na lokalnom nivou najveće. Samo luminofore koje se nalaze  $3\mu\text{m}$  do elektrode doprinose ECL signalu i ovaj konačni reakcioni sloj definiše optimalnu veličinu funkcionalizovanih perili za biotestove. U poređenju sa situacijom u balku (npr.  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  je prisutan u rastvoru), dodatne termodinamički i kinetičke kriterijumi treba uzeti u obzir da bi se izabrali efikasni koreaktanti u biotestovima zasnovanim na perlama: adekvatni redoks potencijali i odgovarajuće konstante brzine deprotonovanja kako bi se formirali koncentracioni gradijenti oba radikala koji mogu simultano da difunduju preko dovoljno velike razdaljine sa ciljem da pobude  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  - markere koji su udaljeni od elektrode. Takođe, je pokazan efekat sočiva sfere koji koncentruje ECL emisiju i tako daje mogućnost odabira novih koreaktanata sa poboljšanom osetljivošću i doprinosi razvoju novih analitičkih strategija.

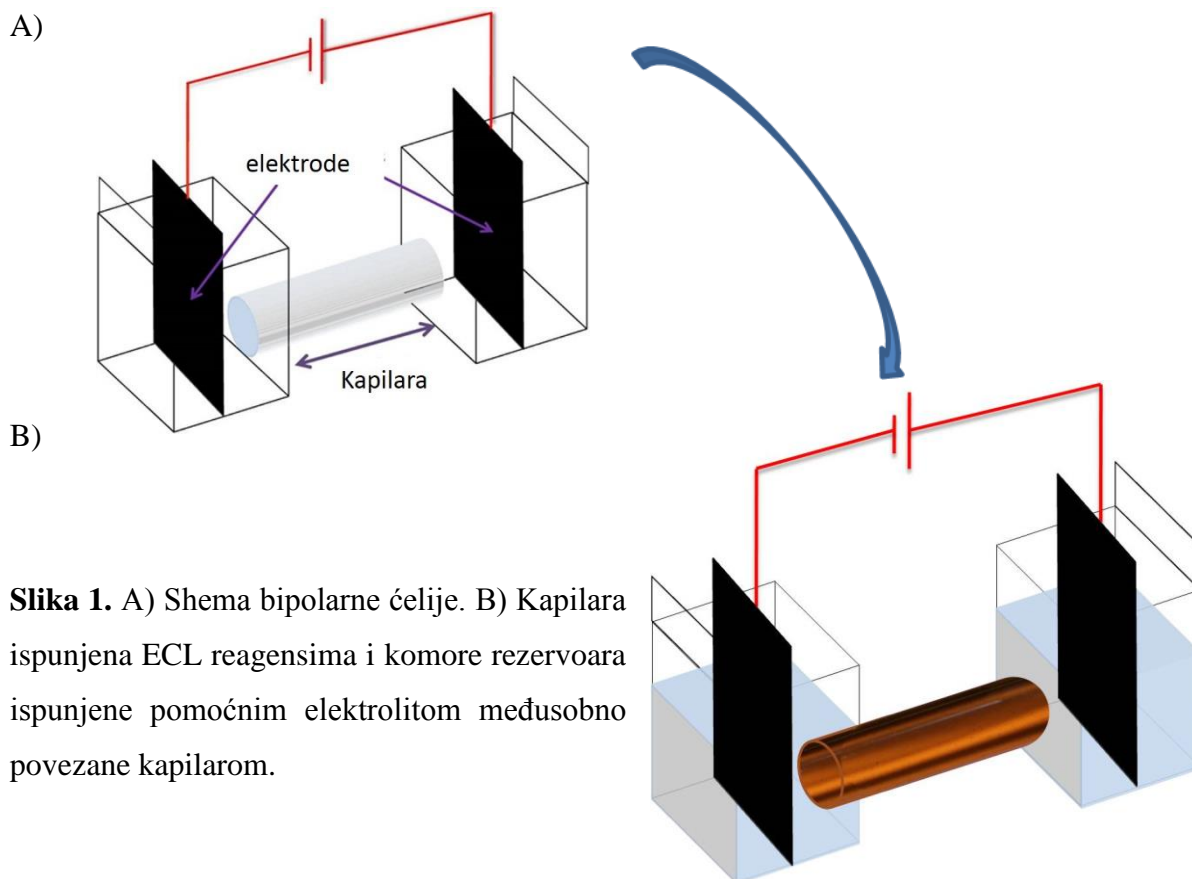
Razvijen je novi senzitivni i specifični anti-tTG ECL imunosenzor za dijagnostiku celijakije sa limitom detekcije nižim od  $1\text{ ng/ml}$ , koristeći novu analitičku strategiju. Iskoristili smo revidirani ECL put sa TPrA kao koreaktantom, koji omogućuje generisanje ECL na mikrometarskoj udaljenosti sa površine elektrode na niskom oksidacionom potencijalu. Koristeći ovaj pristup, lokalizacija početnog elektrohemijskog koraka (tj. oksidacija TPrA) je odvojena od bioprepoznavajućeg lanca i ECL markera koji su imobilizovani na elektro-neprovodnoj površini nasumično uređenih nanoelektrodnih grupa. Prema tome električna oštećenja na veoma osetljivim biomolekulima i oligonukleotidnim sekvencama su smanjena. Takođe, rad na niskom oksidacionom potencijalu dozvoljava redukciju mogućih interferencija od strane sporednih reakcija koje se mogu javiti prilikom rada sa kompleksnim uzorcima kao što je krv, čineći ovu metodu veoma pogodnom za serološko skeniranje.

Zatim, po prvi put je demonstriran pogonski mehanizam za pokretanje plivača tokom kojeg dolazi do istovremene emisije svetlosti zahvaljujući sinergetskom delovanju bipolarne elektrohemije i ECL. Emisija plivača posmatra kao putanja njegovog kretanja se može detektovati golim okom i jeftinim kamerama. Pokretačka snaga za pogon plivača potiče iz nastanka H<sub>2</sub> mehurića razlaganjem vode na njegovom katodnom polu. Pažljivom kontrolom primenjenog napona, koncentracije surfaktanata i kapaciteta korišćenog pufera, može se izbeći oksidacija vode na anodnom polu i kontrolisati ECL intenzitet upotrebom ECL luminofora.

Osim toga koncept plivača je proširen razvijanjem ECL-emisionih bioplivača za enzimsko određivanje glukoze prisutne u sistemu. Uzročno-posledična oksidacija luminofore i enzimsko stvaranje nikotinamidadeninukleotida (NADH) dovodi do ECL emisije putem klasične koreaktantske rute. U ovom sistemu je pokazano da je koncentracija glukoze proporcijalna intenzitetu emitovane svetlosti. Ovaj doprinos prikazuje da razvoj takvih ECL plivača može voditi u smeru bioanalitičke primene koja omogućava proučavanje lokalno nehomogenih uzoraka. Zbog toga, kombinovanje BE i ECL nudi jedinstvenu analitičku platformu koja se zasniva na dizajnu pametnih dinamičkih sistema za direktno vizuelno očitavanje. Na kraju, takvi ECL plivači liče na biološke sisteme i mogu se smatrati veštačkim analogom bioluminiscentnih riba i drugih morskih stvorenja.

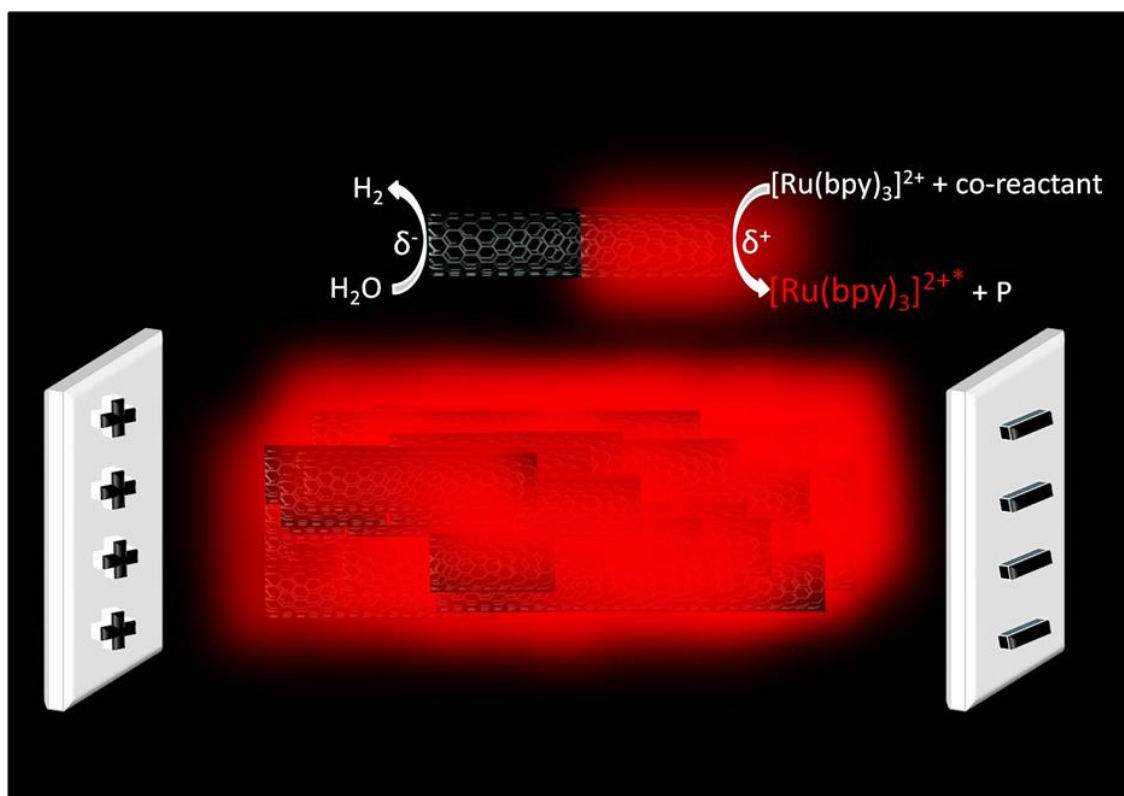
## 6. PREDLOG ZA NASTAVAK ISTRAŽIVANJA

ECL se može lako kombinovati sa drugim tehnologijama s obzirom na to da se direktno optičko očitavanje može izvesti samo pomoću fotomultiplikatorske tube ili komercijalno dostupnim kamerama. Širok izbor mogućnosti može se uzeti u obzir za kuplovanje ECL sa bipolarnom elektrohemijom. Treba naglasiti da bez obzira što je BE fenomen koji je poznat veoma dugo, njena primena je postala popularna tek poslednjih deset godina. BE je zadobila veliku pažnju naročito u oblasti mikro- i nano-nauke. Dakle, u ovoj oblasti istraživanja koja je trenutno u usponu postoji dosta mesta za inovacije, posebno ukoliko se razmatra njeno kuplovanje sa ECL. Koncept ECL-plivača opisan u Poglavlju 3.3., već je proširen na oblast analitičke hemije kao što je to demonstrirano na primeru određivanja koncentracije glukoze. U datom primeru određivanja koncentracije glukoze, staklena kapilara je imala ulogu elektrohemijske ćelije u koju je bio smešten bipolarni plivač. Raznovrsnost BE omogućava nam da zamislimo i izgradimo veoma različite vrste elektrohemijskih ćelija i shodno tome mogućnost upotrebe materijala različite vrste, veličine i oblika za izradu BPE.



**Slika 1.** A) Shema bipolarne ćelije. B) Kapilara ispunjena ECL reagensima i komore rezervoara ispunjene pomoćnim elektrolitom međusobno povezane kapilaram.

Na **Slici 1A** shematski je prikazan jedan tip ručno napravljene elektrohemijske ćelije za BE. Odabir dužine kapilare kao i njen prečnik na prvom mestu zavise od željenih eksperimentalnih uslova. Komore, u koje su uronjene elektrode su međusobno povezane kapilaram. Punjenjem samo kapilare sa ECL reagensom izbegnut je pozadinski signal koji potiče od napajajućih elektroda (**Slika 1B**). Povećanjem veličine bipolarnе ćelije, može se zamisliti više od jedne BPE electrode smeštene u kapilari. Smanjenjem veličine BPE-a i prelazak na mikro i nano-skalu, veliki broj ECL emitujućih provodnih objekata može se smestiti u sistem (**Slika 2**). Shodno tome, smanjenje veličine BPE bi dovelo do povećanja otpora u sistemu kao i do neophodnog električnog polja koje je neophodno za uspešnu ECL emisiju u otvorenoj bipolarnoj konfiguraciji (u dogovoru sa izrazom 3 i 4 u Poglavlju 3.3.). Punjenje pregrada rezervoara agaroznim gelom koji je pripremljen u rastvoru pomoćnog elektrolita može smanjiti omsko zagrevanje sistema i na taj način produžiti reakciono vreme. Iz istog razloga je moguća upotreba različitih koreaktanata. Na primer, za generisanje ECL emisije istog intenziteta može se koristiti rastvor DBAE niže koncentracije od rastvora najčešće korišćenog koreaktanta TPrA. Štaviše, DBAE se oksiduje do radikala na nižem elektrodnom potencijalu u odnosu na TPrA.



**Slika 2.** Shematski prikaz generisanja ECL na površini CNT BE. CNT su polarizovane u električnom polju generisanog između dve pločaste elektrode. ECL emisija je indukovana putem redoks reakcija koje se dešavaju na suprotnim stranama objekta: redukcija kiseonika na katodnom polu (levo) i oksidacija ECL reagenasa na anodnom polu (desno).

Ukoliko je cela kapilara ispunjena sa BPE-ama, mikroperlama ili nano-tubama, pod pretpostavkom da se ECL signal generiše na svakoj pojedinačnoj BPE istovremeno, može se dizajnirati sistema za „3D ECL“ emisiju. Pošto je koncept bioplivača za detekciju enzimske glukoze demonstriran, ova postavka otvara čitav niz mogućnosti novih primena ECL, kao što su visoko-selektivna analiza ili optičko praćenje nano-motora.



## 7. LITERATURA

- 1 Miao, W. Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2506 (2008).
- 2 Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem. Rev.* **104**, 3003 (2004).
- 3 Hu, L. & Xu, G. Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3275 (2010).
- 4 Bard, A. *Electrogenerated Chemiluminescence*. (Maceler Dekker Inc, New York, 2004).
- 5 Leland, J. K. & Powell, M. J. Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reduction Type ECL Reaction Sequence Using Tripropyl Amine. *J. Electrochem. Soc.* **137**, 3127 (1990).
- 6 Bertoncello, P. & Forster, R. J. Nanostructured materials for electrochemiluminescence (ECL)-based detection methods: Recent advances and future perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 3191 (2009).
- 7 Martin, A. F. & Nieman, T. A. Glucose quantitation using an immobilized glucose dehydrogenase enzyme reactor and a tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) chemiluminescent sensor. *Anal. Chim. Acta* **281**, 475-481 (1993).
- 8 Sun, Y., Zhang, Z. & Xi, Z. Direct electrogenerated chemiluminescence detection in high-performance liquid chromatography for determination of ofloxacin. *Anal. Chim. Acta* **623**, 96 (2008).
- 9 Wang, J., Yang, Z., Wang, X. & Yang, N. Capillary electrophoresis with gold nanoparticles enhanced electrochemiluminescence for the detection of roxithromycin. *Talanta* **76**, 85 (2008).
- 10 Li, J., Xu, Y., Wei, H., Huo, T. & Wang, E. Electrochemiluminescence Sensor Based on Partial Sulfonation of Polystyrene with Carbon Nanotubes. *Anal. Chem.* **79**, 5439 (2007).
- 11 Chi, Y., Dong, Y. & Chen, G. Investigation on the electrochemiluminescent behaviors of oxypurinol in alkaline solution using a flow injection analytical system. *Electrochem. Commun.* **9**, 577 (2007).
- 12 Yin, X.-B., Kang, J., Fang, L., Yang, X. & Wang, E. Short-capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection using porous etched joint for fast analysis of lidocaine and ofloxacin. *J. Chromatogr. A* **1055**, 223 (2004).
- 13 Liu, Z., Qi, W. & Xu, G. Recent advances in electrochemiluminescence. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3117-3142 (2015).
- 14 Harvey, N. Luminescence during Electrolysis. *J. Phys. Chem.* **33**, 1456 (1929).
- 15 Dufford, R. T., Nightingale, D. & Gaddum, L. W. Luminescence of grignard compounds in electric and magnetic fields, and related electrical phenomena. *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 1858 (1927).
- 16 Visco, R. E. & Chandross, E. A. Electroluminescence in Solutions of Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5350 (1964).
- 17 Santhanam, K. S. V. & Bard, A. J. Chemiluminescence of Electrogenerated 9,10-Diphenylanthracene Anion Radical1. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 139 (1965).
- 18 Zweig, A., Maricle, D. L., Brinen, J. S. & Maurer, A. H. Electrochemical Generation of the Phenanthrene Triplet. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 473-474 (1967).
- 19 Silverstein, T. P. Marcus Theory: Thermodynamics CAN Control the Kinetics of Electron Transfer Reactions. *J. Chem. Edu.* **89**, 1159-1167 (2012).

- 20 Tokel, N. E. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2862 (1972).
- 21 Chang, M.-M., Saji, T. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 30. Electrochemical oxidation of oxalate ion in the presence of luminescers in acetonitrile solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5399 (1977).
- 22 Noffsinger, J. B. & Danielson, N. D. Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III). *Anal. Chem.* **59**, 865 (1987).
- 23 Montalti, M., Credi, A., Prodi, L. & Gandolfi, T. *Handbook of Photochemistry, Third Edition*. (Taylor & Francis, 2006).
- 24 Roda, A. Chemiluminescence and bioluminescence: past, present and future. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 1457-1458 (2011).
- 25 Haapakka, K. E. & Kankare, J. J. The mechanism of the electrogenerated chemiluminescence of luminol in aqueous alkaline solution. *Anal. Chim. Acta* **138**, 263-275 (1982).
- 26 Miao, W., Choi, J.-P. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA<sup>•+</sup> Cation Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14478 (2002).
- 27 Zanarini, S. *et al.* Ru(bpy)<sub>3</sub> Covalently Doped Silica Nanoparticles as Multicenter Tunable Structures for Electrochemiluminescence Amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2260 (2009).
- 28 Miao, W. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 77. DNA Hybridization Detection at High Amplification with [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>-Containing Microspheres. *Anal. Chem.* **76**, 5379 (2004).
- 29 Sentic, M. *et al.* Mapping electrogenerated chemiluminescence reactivity in space: mechanistic insight into model systems used in immunoassays. *Chem. Sci.* **5**, 2568-2572 (2014).
- 30 Beideman, F. E. & Hercules, D. M. Electrogenerated chemiluminescence from 9,10-diphenylanthracene cations reacting with radical anions. *J. Phys. Chem. A* **83**, 2203 (1979).
- 31 Faulkner, L. R., Tachikawa, H. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. VII. Influence of an external magnetic field on luminescence intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 691 (1972).
- 32 Faulkner, L. R. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. IV. Magnetic field effects on the electrogenerated chemiluminescence of some anthracenes. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 209 (1969).
- 33 Ritchie, E. L., Pastore, P. & Wightman, R. M. Free Energy Control of Reaction Pathways in Electrogenerated Chemiluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 11920 (1997).
- 34 Tachikawa, H. & Bard, A. J. Electrogenerated chemluminescence. Effect of solvent and magnetic field on ECL of rubrene systems. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 246 (1974).
- 35 Yin, X.-B., Dong, S. & Wang, E. Analytical applications of the electrochemiluminescence of tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium and its derivatives. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **23**, 432-441 (2004).
- 36 Rubinstein, I. & Bard, A. J. Polymer films on electrodes. 5. Electrochemistry and chemiluminescence at Nafion-coated electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5007 (1981).
- 37 Kanoufi, F. d. r., Cannes, C. I., Zu, Y. & Bard, A. J. Scanning Electrochemical Microscopy. 43. Investigation of Oxalate Oxidation and Electrogenerated

- Chemiluminescence across the Liquid-Liquid Interface. *J. Phys. Chem. B* **105**, 8951 (2001).
- 38 Rubinstein, I. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 37. Aqueous ecl systems based on tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) and oxalate or organic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 512 (1981).
- 39 Rubinstein, I., Martin, C. R. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescent determination of oxalate. *Anal. Chem.* **55**, 1580 (1983).
- 40 Kanoufi, F. d. r. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 65. An Investigation of the Oxidation of Oxalate by Tris(polypyridine) Ruthenium Complexes and the Effect of the Electrochemical Steps on the Emission Intensity. *J. Phys. Chem. B* **103**, 10469 (1999).
- 41 White, H. S. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 41. Electrogenerated chemiluminescence and chemiluminescence of the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ - $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  system in acetonitrile-water solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6891 (1982).
- 42 Choi, J.-P. & Miao, W. in *Electrogenerated Chemiluminescence* 213-271 (CRC Press, 2004).
- 43 Zu, Y. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 66. The Role of Direct Coreactant Oxidation in the Ruthenium Tris(2,2')bipyridyl/Tripropylamine System and the Effect of Halide Ions on the Emission Intensity. *Anal. Chem.* **72**, 3223 (2000).
- 44 Gross, E. M., Pastore, P. & Wightman, R. M. High-Frequency Electrochemiluminescent Investigation of the Reaction Pathway between Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) and Tripropylamine Using Carbon Fiber Microelectrodes. *J. Phys. Chem. B* **105**, 8732 (2001).
- 45 Kanoufi, F. d. r., Zu, Y. & Bard, A. J. Homogeneous Oxidation of Trialkylamines by Metal Complexes and Its Impact on Electrogenerated Chemiluminescence in the Trialkylamine/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  System. *J. Phys. Chem. B* **105**, 210 (2000).
- 46 Collinson, M. M., Taussig, J. & Martin, S. A. Solid-State Electrogenerated Chemiluminescence from Gel-Entrapped Ruthenium(II) Tris(bipyridine) and Tripropylamine. *Chem. Mater.* **11**, 2594 (1999).
- 47 Smith, P. J. M., C. K. Electrochemical dealkylation of aliphatic amines. *J. Org. Chem.* **34**, 1821-1826 (1969).
- 48 Factor, B. *et al.* Surfactant Chain Length Effects on the Light Emission of Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)/Tripropylamine Electrogenerated Chemiluminescence. *Anal. Chem.* **73**, 4621 (2001).
- 49 Bruce, D., McCall, J. & Richter, M. M. Effects of electron withdrawing and donating groups on the efficiency of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)/tri-n-propylamine electrochemiluminescence. *Analyst* **127**, 125 (2002).
- 50 Zu, Y. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 67. Dependence of Light Emission of the Tris(2,2')bipyridylruthenium(II)/Tripropylamine System on Electrode Surface Hydrophobicity. *Anal. Chem.* **73**, 3960 (2001).
- 51 Workman, S. & Richter, M. M. The Effects of Nonionic Surfactants on the Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Tripropylamine Electrochemiluminescence System. *Anal. Chem.* **72**, 5556 (2000).
- 52 Arora, A., J. de Mello, A. & Manz, A. Sub-microliter Electrochemiluminescence Detector-A Model for Small Volume Analysis Systems. *Anal. Commun.* **34**, 393 (1997).
- 53 Liu, X., Shi, L., Niu, W., Li, H. & Xu, G. Environmentally Friendly and Highly Sensitive Ruthenium(II) Tris(2,2'-bipyridyl) Electrochemiluminescent System Using 2-(Dibutylamino)ethanol as Co-Reactant. *Angew. Chem. Int. Edit.* **46**, 421 (2007).

- 54 Xue, L., Guo, L., Qiu, B., Lin, Z. & Chen, G. Mechanism for inhibition of /DBAE electrochemiluminescence system by dopamine. *Electrochem. Comm.* **11**, 1579-1582 (2009).
- 55 Myung, N., Ding, Z. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe Nanocrystals. *Nano Letters* **2**, 1315 (2002).
- 56 Carter, M. T. & Bard, A. J. Electrochemical investigations of the interaction of metal chelates with DNA. 3. Electrogenerated chemiluminescent investigation of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) with DNA. *Bioconjugate Chem.* **1**, 257-263 (1990).
- 57 [www.roche.com](http://www.roche.com).
- 58 Miao, W., Choi, J.-P. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence 69. The tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) / tri- n-propylamine (TPrA) system revisited. A new route involving TPrA<sup>•+</sup> cation radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14478-14485 (2002).
- 59 Bard, A. J. *Electrogenerated Chemiluminescence*. (M. Dekker, New-York, 2004).
- 60 Kergaravat, S. V. *et al.* Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease. *Biosen. Bioelectron.* **48**, 203-209 (2013).
- 61 Milutinovic, M., Sallard, S., Manojlovic, D., Mano, N. & Sojic, N. Glucose sensing by electrogenerated chemiluminescence of glucose-dehydrogenase produced NADH on electrodeposited redox hydrogel. *Bioelectrochemistry* **82**, 63-68 (2011).
- 62 Zu, Y. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 66. The role of direct coreactant oxidation in the ruthenium tris (2,2') bipyridyl/triethylamine system and the effect of halide ions on the emission intensity. *Anal. Chem.* **72**, 3223-3232 (2000).
- 63 Blackburn, G. F. *et al.* Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin. Chem.* **37**, 1534-1539 (1991).
- 64 Staffilani, M. *et al.* Multimetallic ruthenium (II) complexes as electrochemiluminescent labels. *Inorg. Chem.* **42**, 7789-7798 (2003).
- 65 Wei, H. & Wang, E. Electrochemiluminescence of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium and its applications in bioanalysis: a review. *Luminescence* **26**, 77-85 (2011).
- 66 Miao, W., Choi, J.-P. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA<sup>•+</sup> Cation Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14478-14485 (2002).
- 67 Arrigan, D. W. M. Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications. *Analyst* **129**, 1157-1165 (2004).
- 68 Ongaro, M. & Ugo, P. Bioelectroanalysis with nanoelectrode ensembles and arrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3715-3729 (2013).
- 69 Menon, V. P. & Martin, C. R. Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. *Anal. Chem.* **67**, 1920-1928 (1995).
- 70 Brunetti, B., Ugo, P., Moretto, L. M. & Martin, C. R. Electrochemistry of phenothiazine and methylviologen biosensor electron-transfer mediators at nanoelectrode ensembles. *J. Electroanal. Chem.* **491**, 166-174 (2000).
- 71 Moretto, L. M., Pepe, N. & Ugo, P. Voltammetry of redox analytes at trace concentrations with nanoelectrode ensembles. *Talanta* **62**, 1055-1060 (2004).
- 72 Pereira, F. C., Moretto, L. M., De Leo, M., Zanoni, M. V. B. & Ugo, P. Gold nanoelectrode ensembles for direct trace electroanalysis of iodide. *Anal. Chim. Acta* **575**, 16-24 (2006).

- 73 Silvestrini, M., Fruk, L. & Ugo, P. Functionalized ensembles of nanoelectrodes as affinity biosensors for DNA hybridization detection. *Biosen. Bioelectron.* **40**, 265-270 (2013).
- 74 Silvestrini, M. & Ugo, P. Ensembles of nanoelectrodes modified with gold nanoparticles: characterization and application to DNA-hybridization detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 995-1005 (2013).
- 75 Mucelli, S. P., Zamuner, M., Tormen, M., Stanta, G. & Ugo, P. Nanoelectrode ensembles as recognition platform for electrochemical immunosensors. *Biosen. Bioelectron.* **23**, 1900-1903 (2008).
- 76 Miao, W. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 80. C-Reactive Protein Determination at High Amplification with [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>-Containing Microspheres. *Anal. Chem.* **76**, 7109 (2004).
- 77 Dulay, S., Lozano-Sánchez, P., Iwuoha, E., Katakis, I. & O'Sullivan, C. K. Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry. *Biosen. Bioelectron.* **26**, 3852-3856 (2011).
- 78 Giannetto, M. *et al.* An amperometric immunosensor for diagnosis of celiac disease based on covalent immobilization of open conformation tissue transglutaminase for determination of anti-tTG antibodies in human serum. *Biosens. Bioelectron.* **62**, 325-330 (2014).
- 79 Pividori, M., Lermo, A., Bonanni, A., Alegret, S. & Del Valle, M. Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease. *Anal. Biochem.* **388**, 229-234 (2009).
- 80 Guandalini, S. & Assiri, A. Celiac disease: a review. *JAMA pediatrics* **168**, 272-278 (2014).
- 81 Penner, R. M. & Martin, C. R. Preparation and electrochemical characterization of ultramicroelectrode ensembles. *Anal. Chem.* **59**, 2625-2630 (1987).
- 82 Ugo, P. & Moretto, L. M. in *Handbook of Electrochemistry* (ed Cynthia G. Zoski) 678-XVI (Elsevier, 2007).
- 83 Sandison, M. E. & Cooper, J. M. Nanofabrication of electrode arrays by electron-beam and nanoimprint lithographies. *Lab on Chip* **6**, 1020-1025 (2006).
- 84 Godino, N., Borrisé, X., Muñoz, F. X., del Campo, F. J. & Compton, R. G. Mass Transport to Nanoelectrode Arrays and Limitations of the Diffusion Domain Approach: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. C* **113**, 11119-11125 (2009).
- 85 Henstridge, M. C. & Compton, R. G. Mass Transport to micro- and nanoelectrodes and their arrays: a review. *Chem. Rec.* **12**, 63-71 (2012).
- 86 Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (Wiley, 2000).
- 87 Ugo, P., Moretto, L. M. & Vezzà, F. Ionomer-Coated Electrodes and Nanoelectrode Ensembles as Electrochemical Environmental Sensors: Recent Advances and Prospects. *ChemPhysChem* **3**, 917-925 (2002).
- 88 Penner, R. M., Heben, M. J., Longin, T. L. & Lewis, N. S. Fabrication and Use of Nanometer-Sized Electrodes in Electrochemistry. *Science* **250**, 1118-1121 (1990).
- 89 Mirkin, M. V., Fan, F.-R. F. & Bard, A. J. Scanning electrochemical microscopy part 13. Evaluation of the tip shapes of nanometer size microelectrodes. *J. Electroanal. Chem.* **328**, 47-62 (1992).
- 90 Guo, J. & Lindner, E. Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisk Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment. *Analytical Chemistry* **81**, 130-138 (2009).

- 91 Ugo, P., Moretto, L. M., Bellomi, S., Menon, V. P. & Martin, C. R. Ion-Exchange Voltammetry at Polymer Film-Coated Nanoelectrode Ensembles. *Anal. Chem.* **68**, 4160-4165 (1996).
- 92 Bottari, F., Oliveri, P. & Ugo, P. Electrochemical immunosensor based on ensemble of nanoelectrodes for immunoglobulin IgY detection: Application to identify hen's egg yolk in tempera paintings. *Biosens. Bioelectron.* **52**, 403-410 (2014).
- 93 Tommasini, A. *et al.* Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch. Dis. Child.* **89**, 512-515 (2004).
- 94 Lohi, S. *et al.* Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **26**, 1217-1225 (2007).
- 95 Bianchi, M. & Bardella, M. Bone and celiac disease. *Calcified tissue int.* **71**, 465-471 (2002).
- 96 Bolotin, D. & Petronic-Rosic, V. Dermatitis herpetiformis: part I. Epidemiology, pathogenesis, and clinical presentation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **64**, 1017-1024 (2011).
- 97 Hadjivassiliou, M. *et al.* Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet Neurol.* **9**, 318-330 (2010).
- 98 Lepore, L. *et al.* Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *Jour. Pediatr.* **129**, 311-313 (1996).
- 99 Frustaci, A. *et al.* Celiac disease associated with autoimmune myocarditis. *Circulation* **105**, 2611-2618 (2002).
- 100 Ludvigsson, J. F., Montgomery, S. M. & Ekbom, A. Celiac disease and risk of adverse fetal outcome: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **129**, 454-463 (2005).
- 101 Korponay-Szabó, I. R. *et al.* Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *Bmj* **335**, 1244-1247 (2007).
- 102 Nemeč, G. *et al.* Looking for celiac disease: diagnostic accuracy of two rapid commercial assays. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 1597-1600 (2006).
- 103 Di Simone, N. *et al.* Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2254-2261 (2010).
- 104 [www.roche-diagnostics.com](http://www.roche-diagnostics.com).
- 105 Miao, W., Choi, J.-P. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence 69. The tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) / tri- n-propylamine (TPrA) system revisited. A new route involving TPrA<sup>•+</sup> cation radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14478-14485 (2002).
- 106 Nepomnyashchii, A. B., Kolesov, G. & Parkinson, B. A. Electrogenerated Chemiluminescence of BODIPY, Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, and 9,10-Diphenylanthracene Using Interdigitated Array Electrodes. *ACS Appl. Mater. Inter.* **5**, 5931-5936 (2013).
- 107 Li, M.-J., Chen, Z., Yam, V. W.-W. & Zu, Y. Multifunctional ruthenium (II) polypyridine complex-based core-shell magnetic silica nanocomposites: magnetism, luminescence, and electrochemiluminescence. *ACS nano* **2**, 905-912 (2008).
- 108 Guix, M., Mayorga-Martinez, C. C. & Merkoçi, A. Nano/micromotors in (bio) chemical science applications. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **114**, 6285-6322 (2014).
- 109 Van den Heuvel, M. G. & Dekker, C. Motor proteins at work for nanotechnology. *Science* **317**, 333-336 (2007).
- 110 von Delius, M. & Leigh, D. A. Walking molecules. *Chemical Society Reviews* **40**, 3656-3676 (2011).
- 111 Ebbens, S. J. & Howse, J. R. In pursuit of propulsion at the nanoscale. *Soft Matter* **6**, 726-738 (2010).

- 112 Mallouk, T. E. & Sen, A. Powering nanorobots. *Sci. Amer.* **300**, 74-79 (2009).
- 113 Pantarotto, D., Browne, W. R. & Feringa, B. L. Autonomous propulsion of carbon nanotubes powered by a multienzyme ensemble. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **0**, 1533-1535 (2008).
- 114 Mano, N. & Heller, A. Bioelectrochemical Propulsion. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 11574-11575 (2005).
- 115 Ismagilov, R. F., Schwartz, A., Bowden, N. & Whitesides, G. M. Autonomous Movement and Self-Assembly. *Angewandte Chemie - International Edition* **41**, 652-654 (2002).
- 116 Calvo-Marzal, P. *et al.* Propulsion of nanowire diodes. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **46**, 1623-1624 (2010).
- 117 Chang, S. T., Paunov, V. N., Petsev, D. N. & Velev, O. D. Remotely powered self-propelling particles and micropumps based on miniature diodes. *Nature Materials* **6**, 235-240 (2007).
- 118 Loget, G. & Kuhn, A. Shaping and exploring the micro- and nanoworld using bipolar electrochemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 1691-1704 (2011).
- 119 Mavré, F. *et al.* Bipolar Electrodes: A Useful Tool for Concentration, Separation, and Detection of Analytes in Microelectrochemical Systems. *Analytical Chemistry* **82**, 8766-8774 (2010).
- 120 Fosdick, S. E., Knust, K. N., Scida, K. & Crooks, R. M. Bipolar electrochemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 10438-10456 (2013).
- 121 Loget, G. & Kuhn, A. Electric field-induced chemical locomotion of conducting objects. *Nat. Commun.* **2**, 535 (2011).
- 122 Bouffier, L. & Kuhn, A. Design of a wireless electrochemical valve. *Nanoscale* **5**, 1305-1309 (2013).
- 123 Loget, G. & Kuhn, A. Bipolar electrochemistry for cargo-lifting in fluid channels. *Lab on a Chip* **12**, 1967-1971 (2012).
- 124 Roche, J. *et al.* Wireless powering of e-swimmers. *Sci. Rep.*, 6705 (2014).
- 125 Laocharoensuk, R., Burdick, J. & Wang, J. Carbon-nanotube-induced acceleration of catalytic nanomotors. *ACS Nano* **2**, 1069-1075 (2008).
- 126 Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. *Maceler Dekker Inc, New York* (2004).
- 127 Miao, W. Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications. *Chem. Rev.* **108**, 2506-2553 (2008).
- 128 Liu, Z., Qi, W. & Xu, G. Recent advances in electrochemiluminescence. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3117-3142 (2015).
- 129 Arora, A., Eijkel, J. C., Morf, W. E. & Manz, A. A wireless electrochemiluminescence detector applied to direct and indirect detection for electrophoresis on a microfabricated glass device. *Analytical Chemistry* **73**, 3282-3288 (2001).
- 130 Zhan, W., Alvarez, J. & Crooks, R. M. A two-channel microfluidic sensor that uses anodic electrogenerated chemiluminescence as a photonic reporter of cathodic redox reactions. *Analytical Chemistry* **75**, 313-318 (2003).
- 131 Chow, K.-F., Mavré, F., Crooks, J. A., Chang, B.-Y. & Crooks, R. M. A large-scale, wireless electrochemical bipolar electrode microarray. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 8364-8365 (2009).
- 132 Chow, K.-F., Mavré, F. & Crooks, R. M. Wireless electrochemical DNA microarray sensor. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 7544-7545 (2008).
- 133 Sentic, M., Loget, G., Manojlovic, D., Kuhn, A. & Sojic, N. Light Emitting Electrochemical "Swimmers". *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 11284-11288 (2012).

- 134 Bouffier, L. *et al.* Lighting up redox propulsion with luminol electrogenerated chemiluminescence. *ChemElectroChem* **1**, 95-98 (2014).
- 135 Goodridge, F. Some recent developments of monopolar and bipolar fluidized bed electrodes. *Electrochimica Acta* **22**, 929-933 (1977).
- 136 Fleischmann, M., Ghoroghchian, J., Rolison, D. & Pons, S. Electrochemical behavior of dispersions of spherical ultramicroelectrodes. *Journal of Physical Chemistry* **90**, 6392-6400 (1986).
- 137 Beck, T. R., Rousar, I. & Thonstad, J. Energy efficiency considerations on monopolar vs bipolar fused salt electrolysis cells. *Metallurgical and Materials Transactions B: Process Metallurgy and Materials Processing Science* **25**, 661-668 (1994).
- 138 Yang, J., Zhang, Q., Wang, H. & Liu, Y. Establishment and verification of mathematical model for current leakage in bipolar multi-compartment cell. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **5**, 29-35 (1995).
- 139 Loget, G., Zigah, D., Bouffier, L., Sojic, N. & Kuhn, A. Bipolar Electrochemistry: from materials science to motion and beyond. *Accounts of Chemical Research* **46**, 2513-2523 (2013).
- 140 Loget, G. & Kuhn, A. Bipolar electrochemistry in the nanosciences *Electrochemistry: Nanosystems Electrochemistry*, (Eds.: R. Compton, J. Wadhawan), RSC, Vol. 11 (2012).
- 141 Guerrette, J. P., Oja, S. M. & Zhang, B. Coupled Electrochemical Reactions at Bipolar Microelectrodes and Nanoelectrodes. *Analytical Chemistry* **84**, 1609-1616 (2012).
- 142 Cox, J. T., Guerrette, J. P. & Zhang, B. Steady-State Voltammetry of a Microelectrode in a Closed Bipolar Cell. *Analytical Chemistry* **84**, 8797-8804 (2012).
- 143 Fosdick, S. E., Crooks, J. A., Chang, B.-Y. & Crooks, R. M. Two-Dimensional Bipolar Electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 9226-9227 (2010).
- 144 Chang, B.-Y., Crooks, J. A., Chow, K.-F., Mavré, F. o. & Crooks, R. M. Design and operation of microelectrochemical gates and integrated circuits. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 15404 (2010).
- 145 Zhan, W., Alvarez, J. & Crooks, R. M. Electrochemical Sensing in Microfluidic Systems Using Electrogenerated Chemiluminescence as a Photonic Reporter of Redox Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 13265-13270 (2002).
- 146 Chow, K.-F., Chang, B.-Y., Zaccheo, B. A., Mavré, F. o. & Crooks, R. M. A Sensing Platform Based on Electrodissolution of a Ag Bipolar Electrode. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 9228-9229 (2010).
- 147 Wu, M.-S., Qian, G.-s., Xu, J.-J. & Chen, H.-Y. Sensitive Electrochemiluminescence Detection of c-Myc mRNA in Breast Cancer Cells on a Wireless Bipolar Electrode. *Analytical Chemistry* **84**, 5407-5414 (2012).
- 148 Juskova, P., Neuzil, P., Manz, A. & Foret, F. Detection of electrochemiluminescence from floating metal platelets in suspension. *Lab on a Chip* **13**, 781-784 (2013).
- 149 Ishiguro, Y., Inagi, S. & Fuchigami, T. Gradient doping of conducting polymer films by means of bipolar electrochemistry. *Langmuir* **27**, 7158-7162 (2011).
- 150 Loget, G. *et al.* Versatile procedure for synthesis of Janus-type carbon tubes. *Chemistry of Materials* **23**, 2595-2599 (2011).
- 151 Fattah, Z., Garrigue, P., Lapeyre, V., Kuhn, A. & Bouffier, L. Controlled Orientation of Asymmetric Copper Deposits on Carbon Microobjects by Bipolar Electrochemistry. *Journal of Physical Chemistry C* **116**, 22021-22027 (2012).
- 152 Kumsapaya, C. *et al.* Wireless Electrografting of Molecular Layers for Janus Particle Synthesis. *Chemistry – A European Journal* **19**, 1577-1580 (2013).
- 153 Loget, G. & Kuhn, A. Bulk synthesis of Janus objects and asymmetric patchy particles. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 15457-15474 (2012).
- 154 Schliwa, M. & Woehlke, G. Molecular motors. *Nature* **422**, 759-765 (2003).



- 155 Goel, A. & Vogel, V. Harnessing biological motors to engineer systems for nanoscale transport and assembly. *Nature Nanotechnology* **3**, 465-475 (2008).
- 156 Hess, H., Bachand, G. D. & Vogel, V. Powering Nanodevices with Biomolecular Motors. *Chemistry – A European Journal* **10**, 2110-2116 (2004).
- 157 Dreyfus, R. *et al.* Microscopic artificial swimmers. *Nature* **437**, 862-865 (2005).
- 158 Wang, Y. *et al.* Bipolar electrochemical mechanism for the propulsion of catalytic nanomotors in hydrogen peroxide solutions. *Langmuir* **22**, 10451-10456 (2006).
- 159 Manesh, K. M. *et al.* Template-Assisted Fabrication of Salt-Independent Catalytic Tubular Microengines. *ACS Nano* **4**, 1799-1804 (2010).
- 160 Wilson, D. A., Nolte, R. J. & van Hest, J. C. Autonomous movement of platinum-loaded stomatocytes. *Nat. Chem.* **4**, 268-274 (2012).
- 161 Paxton, W. F. *et al.* Catalytic Nanomotors: Autonomous Movement of Striped Nanorods. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 13424-13431 (2004).
- 162 Demirok, U. K., Laocharoensuk, R., Manesh, K. M. & Wang, J. Ultrafast Catalytic Alloy Nanomotors. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 9349-9351 (2008).
- 163 Paxton, W. F., Sundararajan, S., Mallouk, T. E. & Sen, A. Chemical Locomotion. *Angewandte Chemie - International Edition* **45**, 5420-5429 (2006).
- 164 Fournier-Bidoz, S., Arsenault, A. C., Manners, I. & Ozin, G. A. Synthetic self-propelled nanorotors. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, 441-443 (2005).
- 165 Kagan, D. *et al.* Chemical Sensing Based on Catalytic Nanomotors: Motion-Based Detection of Trace Silver. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 12082-12083 (2009).
- 166 Ghosh, A. & Fischer, P. Controlled propulsion of artificial magnetic nanostructured propellers. *Nano Letters* **9**, 2243-2245 (2009).
- 167 Zu, Y. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 67. Dependence of light emission of the tris (2, 2') bipyridylruthenium (II)/tripropylamine system on electrode surface hydrophobicity. *Anal. Chem.* **73**, 3960-3964 (2001).
- 168 Workman, S. & Richter, M. M. The effects of nonionic surfactants on the tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II)-tripropylamine electrochemiluminescence system. *Analytical Chemistry* **72**, 5556-5561 (2000).
- 169 Miao, W. Electrogenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2506-2553 (2008).
- 170 Loget, G. & Kuhn, A. Bipolar electrochemistry for cargo-lifting in fluid channels. *Lab on a Chip* (2012).
- 171 Martin, A. F. & Nieman, T. A. Glucose quantitation using an immobilized glucose dehydrogenase enzyme reactor and a tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) chemiluminescent sensor. *Anal. Chim. Acta* **281**, 475 (1993).
- 172 Song, L., Ahn, S. & Walt, D. R. Fiber-Optic Microsphere-Based Arrays for Multiplexed Biological Warfare Agent Detection. *Anal. Chem.* **78**, 1023 (2006).
- 173 Zhang, L., Xu, Z., Sun, X. & Dong, S. A novel alcohol dehydrogenase biosensor based on solid-state electrogenerated chemiluminescence by assembling dehydrogenase to Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Au nanoparticles aggregates. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1097 (2007).
- 174 Jia, T.-t. *et al.* Electrogenerated chemiluminescence ethanol biosensor based on alcohol dehydrogenase functionalized Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> doped silica nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 263 (2009).
- 175 Zhang, L., Xu, Z. & Dong, S. Electrogenerated chemiluminescence biosensor based on Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and dehydrogenase immobilized in sol-gel/chitosan/poly(sodium 4-styrene sulfonate) composite material. *Anal. Chim. Acta* **575**, 52 (2006).

- 176 Martin, A. F. & Nieman, T. A. Chemiluminescence biosensors using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) and dehydrogenases immobilized in cation exchange polymers. *Biosens. Bioelectron.* **12**, 479 (1997).
- 177 Sentic, M. *et al.* Electrochemiluminescent swimmers for dynamic enzymatic sensing. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **50**, 10202-10205 (2014).
- 178 Chen, X.-m. *et al.* Recent advances in electrochemiluminescent enzyme biosensors. *Tr. Anal. Chem.* **30**, 665-676 (2011).
- 179 Doeven, E. H. *et al.* Red–Green–Blue Electrogenerated Chemiluminescence Utilizing a Digital Camera as Detector. *Analytical Chemistry* **86**, 2727-2732 (2014).

## **8. BIOGRAFIJA**

Milica Sentić je rođena 29. aprila 1987. godine u Beogradu od oca Novice i majke Lepe. Osnovnu školu i VI Beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu. Osnovne studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, je upisala školske 2006/07. godine. Diplomirala je na smeru Hemija životne sredine 2010. godine sa prosečnom ocenom 8.94. Master rad je odbranila sa prosečnom ocenom 10.00 na Hemijskom fakultetu u Beogradu 2011. godine. Doktorske studije na smeru doktor hemijskih nauka na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala 2011. godine pod nadzorom prof. Dr Dragana Manojlovića.

U toku master i doktorskih studija bila je učesnik 9 konferencija od čega 7 međunarodnog karaktera. Dobitnik je prve nagrade za najbolju poster prezentaciju na internacionalnoj elektrohemijskoj konferenciji Elecnano 2013 (Bordo, Francuska). Takođe, dobitnik je nagrade za najbolju poster prezentaciju od strane Internacionalnog elektrohemijskog društva na 65. godišnjoj konferenciji 2014. godine (Lozana, Švajcarska).

Francusko bioelektrohemijsko društvo („Groupe Français de Bioélectrochimie”) joj je 2013. godine dodelilo novčanu nagradu za odlazak na međunarodnu elektrohemijsku konferenciju u Bohum organizovanu od strane Internacionalnog elektrohemijskog društva („International Society of Electrochemistry”, ISE).

Aktivni član Srpskog hemijskog društva, Francuskog hemijskog društva („French Chemical Society”) i Internacionalnog elektrohemijskog društva („International Society of Electrochemistry”).

Od 2013. član rukovodstva omladinske podružnice Francuskog hemijskog društva za regiju Akitan („Young French Chemical Society region Aquitaine”).

Govori i piše tri strana jezika: engleski, španski, francuski.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Milica N. Sentić

број индекса DH 04/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

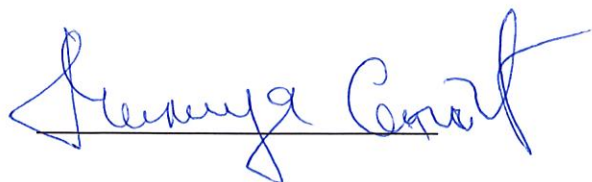
Elektrogenerisana hemiluminiscencija: ispitivanje mehanizma i njena primena u bioanalitici

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду,

07/03/2016



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Milica N. Sentić \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ DH\_04/2011 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Doktor hemije \_\_\_\_\_

Наслов рада Elektrogenerisana hemiluminiscencija: ispitivanje mehanizma i njena primena u bioanalitici

Ментор dr Dragan Manojlović

Mentor dr Neso Sojic

Потписани/а \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_



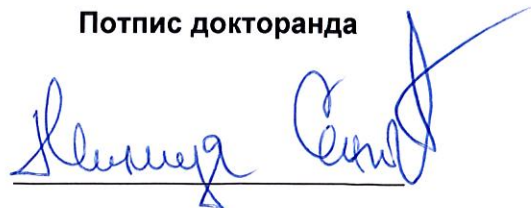
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 07/03/2016

Потпис докторанда



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Elektrogenerisana hemiluminiscencija: ispitivanje mehanizma i njena primena u bioanalitici

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

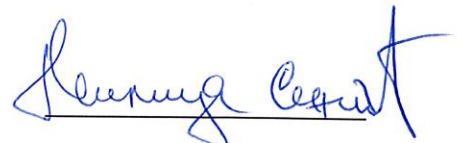
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 07.03.2016

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.