

UNIVERZITET U NOVOM SADU PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET DEPARTMAN ZA FIZIKU



Razvoj i implementacija novih senzorskih i biosenzorskih rešenja primenom koncepta Laboratorija-na-čipu

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Dr Vesna Bengin Dr Vasa Radonić Kandidat: Ivana Kundačina

Novi Sad, 2023. godine



UNIVERZITET U NOVOM SADU PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET DEPARTMAN ZA FIZIKU



Razvoj i implementacija novih senzorskih i biosenzorskih rešenja primenom koncepta Laboratorija-na-čipu

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Dr Vesna Bengin Dr Vasa Radonić Kandidat: Ivana Kundačina

Novi Sad, 2023. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Врста рада:	Докторска дисертација		
Име и презиме аутора:	Ивана Кундачина		
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Весна Бенгин, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Др Васа Радонић, научни саветник, Институт Биосенс, Универзитет у Новом Саду		
Наслов рада:	Развој и имплементација нових сензорских и биосензорских решења применом концепта Лабораторија-на-чипу		
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)		
Физички опис рада:	Унети број: Страница 132 Поглавља 3 Референци 263 Табела 9 Слика 52 Графикона / Прилога /		
Научна област:	Физика		
Ужа научна област (научна дисциплина):	Наука о сензорима / Примењена физика		
Кључне речи / предметна одредница:	Лабораторија-на-чипу, микрофлуидика, микроталасни сензор, импедансни сензор, електрохемијски биосензори		
Резиме на језику рада:	У оквиру докторске дисертације развијено је неколико сензорских и биосензорских решења за примене у контроли квалитета хране, животне средине, ћелијској пољопривреди и биомедицини. Развијена је платформа Лабораторија-на-чипу (ЛОЦ) са интегрисаним микроталасним сензором за идентификацију и детекцију мешања јестивих уља на бази таласног феномена дизајнираних површинских плазмонских поларитона. Оптимизација дизајна и јединичне ћелије сензора испитани су применом софтверског алата <i>CST Microwave Studio</i> , а израда сензора урађена применом јефтине, хибридне технологије израде. Валидација сензора одрађена је са узорцима јестивих уља, где је сензор показао добре линеарне карактеристике и велику осетљивост детекције диелектричне пермитивности узорака. Такође, развијена је и ЛОЦ платформа са интегрисаним импедансним сензором за мониторинг раста ћелија унутар микробиореактора. Реализација сензора урађена је применом инкџет штампе, а интеграција		

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

^{56 –} Изјава о ауторству;

⁵в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

⁵г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	у ЛОЦ платформу урађена је комбиновањем поли(метил метакрилата) – ПММА са стакленом подлогом. Валидација детекције урађена је култивацијом сисарских ћелија током 96 сати унутар ЛОЦ платформе, а процена биомасе импедансним приступом упоређена је са приступом обраде микроскопских слика. Предложени импедансни сензор успешно је детектовао све фазе раста ћелија и почетак фазе одумирања. Нова технологија израде електрода предложена је на бази златних листића и примењена за електрохемијску детекцију бактерија <i>E. coli, S.</i> Турhimurium и тумор биомаркера НЕR2. Предложени сензори испитани су у погледу стабилности сигнала, осетљивости и специфичности детекције, а релевантни параметри детекције процењени из модела еквивалентног електричног кола. Електроде реализоване на бази златних
	листина показале су облу осстривост и вспу специфичну површину у поређењу са комерцијалним електродама. Интеграција електрохемијског сензора у ЛОЦ платформу са микрофлуидичним мешачима реализована је за примену у детекцији глукозе. Перформансе мешања микрофлуидичних мешача на бази серпентине испитане су применом софтвера <i>Comsol Multiphysics</i> , а реализација платформе урађена је комбиновањем технологија 3Д штампе и ПММА потпорних слојева. Предложени концепт детекције показан је на примеру концентрације глукозе у ацетатном пуферу и медијуму ћелијске културе.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	8. 7. 2022.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање,	Председник: Др Жељка Цвејић, редовни професор, Природно- математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: Др Горан Стојановић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: Др Весна Бенгин, редовни професор, Природно-математички
институција) Напомена:	факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: Др Васа Радонић, научни саветник, Институт Биосенс, Универзитет у Новом Саду

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF SCIENCES

Document type:	Doctoral dissertation	
Author:	Ivana Kundacina	
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Vesna Bengin, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad Dr. Vasa Radonic, principal research fellow, BioSense Institute, University of Novi Sad	
Thesis title:	integrated into Lab-on-Chip concept	
Language of text (script):	Serbian language (latin)	
Physical description:	Number of: Pages 132 Chapters 3 References 263 Tables 9 Illustrations 52 Graphs / Appendices /	
Scientific field:	Physics	
Scientific subfield (scientific discipline):	Sensing technology / Applied physics	
Subject, Key words:	Lab-on-a-chip, Microfluidics, Microwave sensor, Impedimetric sensor, Electrochemical biosensor	
Abstract in English language:	In this doctoral dissertation, several sensor and biosensor solutions were developed for applications in food quality control, environmental monitoring, cellular agriculture and healthcare. Lab-on-a-chip (LOC) platform with an integrated microwave sensor was developed for the identification and detection of mixing of edible oils based on the wave phenomenon of spoof surface plasmon polaritons. Optimization of sensor configuration and unit cells were investigated using the CST Microwave Studio software tool, and sensor fabrication was performed using low-cost, hybrid fabrication technology. The validation of the sensor was done with samples of edible oils, where the sensor showed good linear characteristics and high sensitivity in detecting the dielectric permittivity of the samples. In addition, a LOC platform with an integrated impedimetric sensor was developed for cell growth monitoring inside the microbioreactor. The sensor was realized using inkjet printing, and the integration into the LOC platform was done by combining poly(methyl methacrylate) - PMMA with a glass substrate. Validation of the detection was done by cultivation of mammalian	

KEY WORD DOCUMENTATION²

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

^{56 -} Statement on the authority,

⁵B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

⁵r – Statement on copyright licenses. The paper and e-versions of Statements are held at he faculty and are not included into the printed thesis.

	cells for 96 hours inside the LOC platform, and biomass estimation using an impedance approach was compared with an image processing approach. The proposed impedance sensor successfully detected all phases of cell growth. A novel fabrication technology for electrode fabrication was proposed based on gold leaves and applied for the electrochemical detection of bacteria <i>E. coli, S.</i> Typhimurium, and cancer biomarker HER2. The proposed sensors were tested for signal stability, sensitivity, and specificity, and the relevant detection parameters were estimated from the equivalent electric circuit model. Finally, gold leaf electrochemical sensor into the LOC platform with microfluidic mixers was realized for application in glucose detection. The mixing performance of serpentine-based microfluidic mixers was tested using Comsol Multiphysics software, and the platform was realized by combining 3D printing technologies and PMMA support layers. The proposed detection concept is demonstrated for the detection of glucose in acetate buffer and cell culture medium.
Accepted on Scientific Board on:	July 8, 2022
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Dr. Zeljka Cvejic, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Goran Stojanovic, full professor, Faculty of Technical Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Vesna Bengin, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Vasa Radonic, principal research fellow, BioSense Institute, University of Novi Sad
Note:	

Najveću zahvalnost za realizaciju doktorske disertacije dugujem mentoru, dr Vasi Radoniću. Hvala Vam na neizmernom strpljenju, pruženim prilikama za sticanje znanja i usavršavanje, kao i na ukazanom poverenju.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Sanji Kojić, dr Nikolini Janković i prof. dr Bojanu Petroviću, čija su podrška, korisni saveti i pruženo znanje bili od velikog značaja tokom master i doktorskih studija.

Takođe, zahvalna sam i kolegama iz Centra za senzorske tehnologije i Centra za biosisteme instituta Biosens. Hvala vam što ste uvek bili tu za mene. Raditi zajedno s vama je veliko zadovoljstvo.

Zahvalna sam i prof. dr Željki Cvejić i Katedri za opštu fiziku na nesebičnom deljenju znanja, korisnim savetima i podršci tokom celog školovanja.

Na kraju, zahvalila bih se i prof. dr Vesni Bengin na prilikama da učim i usavršavam se radeći sa modernom opremom i s vrhunskim stručnjacima iz oblasti koje me interesuju.

Ovaj rad posvećujem suprugu, porodici i prijateljima. Vaša podrška mi je bila glavna inspiracija.

Ivana Kundačina

Sadržaj

Uv	vod			1
1	Sen	zor na l	bazi dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona za ultrao-	_
	setlj	ivu det	ekciju dielektrične permitivnosti	5
	1.1	Teorijs	ki uvod	6
	1.2	Pregle	d relevantnih istraživanja	11
	1.3	Senzoi	r na bazi SSPP za ultraosetljivu detekciju dielektrične permitivnosti	12
		1.3.1	Disperzione krive jediničnih ćelija periodičnih struktura metal-	12
		132	Optimizacija dimenzija i broja jediničnih ćelija	15
		133	Hibridna tehnologija izrade SSPP senzora	19
		1.3.4	Eksperimentalna validacija performansi SSPP senzora	20
	1.4	Diskus	sija i zaključak	22
2	100	[•] nlatfo	rma kao mikrohioreaktor sa integrisanim impedansnim senzorom	
4	72 m	onitori	ing rasta ćelija	25
	2 a n	Progla	d relevantnih istraživanja	25
	2.1	Teorije		20
	2.2	2.2.1	Kriva disperzije bioloških materijala	27
		2.2.2	Princip detekcije impedansnog senzora	29
	2.3	Realiza	acija LOC platforme za monitoring rasta ćelija	30
		2.3.1	Struktura LOC platforme	30
		2.3.2	Priprema MRC-5 ćelija za kultivaciju unutar LOC platforme	31
		2.3.3	Karakterizacija senzora i rezultati merenja impedanse	32
	2.4	Poređe	enje izmerenih rezultata, modela ekvivalentnog kola i rezultata	
		obrade	e slike	36
		2.4.1	Obrada mikroskopskih slika	36
		2.4.2	Fitovanje rezultata ekvivalentnim električnim kolom	38
	2.5	Diskus	sija i zaključak	40
3	Nov	e tehno	logije realizacije elektrohemijskih biosenzora	42
	3.1	Teorijs	ki uvod	43
		3.1.1	Elektrohemijski procesi na površini elektrode	44

SADRŽAJ

	3.1.2	Potencijal na razdelnoj površini elektrode i tečne faze	45
	3.1.3	Ciklična voltametrija	47
	3.1.4	Elektrohemijska impedansna spektroskopija	51
	3.1.5	Hronoamperometrija	54
3.2	Pregle	ed relevantnih istraživanja	55
3.3	Tehno	ologija izrade elektroda na bazi zlatnih listića	57
3.4	Karak	terizacija elektroda na bazi zlatnih listića	58
	3.4.1	Skenirajuća elektronska mikroskopija i energetska disperzivna	
		spektroskopija	59
	3.4.2	Optička profilometrija	60
	3.4.3	Planarni dvoelektrodni sistem na bazi zlatnih listića	61
3.5	Bioser	nzor za detekciju <i>E. coli</i> na bazi zlatnih listića	63
	3.5.1	Funkcionalizacija elektroda za detekciju <i>E. coli</i>	65
	3.5.2	Karakterizacija koraka funkcionalizacije	67
	3.5.3	Elektrohemijska detekcija <i>E. coli</i>	68
	3.5.4	Diskusija i zaključak	70
3.6	Bioser	nzor za detekciju <i>S</i> . Typhimurium na bazi zlatnih listića	73
	3.6.1	Funkcionalizacija elektroda za detekciju S. Typhimurium	74
	3.6.2	Karakterizacija koraka funkcionalizacije	74
	3.6.3	Elektrohemijska detekcija <i>S</i> . Typhimurium	75
	3.6.4	Diskusija i zaključak	77
3.7	Bioser	nzor za detekciju tumor biomarkera HER2 na bazi zlatnih listića	80
	3.7.1	Ispitivanje uticaja tehnologije izrade i geometrije na performanse	
		senzora	81
	3.7.2	Funkcionalizacija elektroda za detekciju HER2	86
	3.7.3	Flourescentni test	87
	3.7.4	Raman spektroskopija površine biosenzora	88
	3.7.5	Elektrohemijska detekcija HER2	90
	3.7.6	Detekcija HER2 u ćelijskom medijumu	93
	3.7.7	Diskusija i zaključak	95
3.8	LOC	platforma za monitoring glukoze u realnom vremenu u tečnim	
	analit	ima	98
	3.8.1	Mikrofluidika i tehnologije izrade mikrofluidičnih čipova	99
	3.8.2	Elektrohemijsko-enzimsko određivanje koncentracije glukoze	100
	3.8.3	Teorijska i numerička analiza	101
	3.8.4	Optimizacija performansi mešanja primenom softera Comsol Mul-	
		<i>tiphysics</i>	103
	3.8.5	Izrada i karakterizacija LOC platforme	105

SADRŽAJ

3.8.6 3.8.7	Rezultati detekcije glukoze	.06 .09
Zaključak	1	11
Bibliografija	1	13

Apstrakt

U okviru doktorske disertacije razvijeno je nekoliko senzorskih i biosenzorskih rešenja za primene u kontroli kvaliteta hrane, životne sredine, ćelijskoj poljoprivredi i biomedicini.

Razvijena je platforma Laboratorija-na-čipu (LOC) sa integrisanim mikrotalasnim senzorom za identifikaciju i detekciju mešanja jestivih ulja na bazi talasnog fenomena dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona. Optimizacija dizajna i jedinične ćelije senzora ispitani su primenom softverskog alata *CST Microwave Studio*, a izrada senzora urađena primenom jeftine, hibridne tehnologije izrade. Validacija senzora odrađena je sa uzorcima jestivih ulja, gde je senzor pokazao dobre linearne karakteristike i veliku osetljivost detekcije dielektrične permitivnosti uzoraka.

Takođe, razvijena je i LOC platforma sa integrisanim impedansnim senzorom za monitoring rasta ćelija unutar mikrobioreaktora. Realizacija senzora urađena je primenom inkdžet štampe, a integracija u LOC platformu urađena je kombinovanjem poli(metil metakrilata) – PMMA sa staklenom podlogom. Validacija detekcije urađena je kultivacijom sisarskih ćelija tokom 96 sati unutar LOC platforme, a procena biomase impedansnim pristupom upoređena je sa pristupom obrade mikroskopskih slika. Predloženi impedansni senzor uspešno je detektovao sve faze rasta ćelija i početak faze odumiranja.

Nova tehnologija izrade elektroda predložena je na bazi zlatnih listića i primenjena za elektrohemijsku detekciju bakterija *E. coli, S.* Typhimurium i tumor biomarkera HER2. Predloženi senzori ispitani su u pogledu stabilnosti signala, osetljivosti i specifičnosti detekcije, a relevantni parametri detekcije procenjeni iz modela ekvivalentnog električnog kola. Elektrode realizovane na bazi zlatnih listića pokazale su bolju osetljivost i veću specifičnu površinu u poređenju sa komercijalnim elektrodama, što je od suštinskog značaja za biosenzorske primene.

Integracija elektrohemijskog senzora u LOC platformu sa mikrofluidičnim mešačima realizovana je za primenu u detekciji glukoze. Performanse mešanja mikrofluidičnih mešača na bazi serpentine ispitane su primenom softvera *Comsol Multiphysics*, a realizacija platforme urađena je kombinovanjem tehnologija 3D štampe i PMMA potpornih slojeva. Predloženi koncept detekcije pokazan je na primeru koncentracije glukoze u acetatnom puferu i medijumu ćelijskom medijumu.

Abstract

In this doctoral dissertation, several sensor and biosensor solutions were developed for applications in food quality control, environmental monitoring, cellular agriculture and healthcare.

Lab-on-a-chip (LOC) platform with an integrated microwave sensor was developed for the identification and detection of mixing of edible oils based on the wave phenomenon of spoof surface plasmon polaritons. Optimization of sensor configuration and unit cells were investigated using the CST Microwave Studio software tool, and sensor fabrication was performed using low-cost, hybrid fabrication technology. The validation of the sensor was done with samples of edible oils, where the sensor showed good linear characteristics and high sensitivity in detecting the dielectric permittivity of the samples.

In addition, a LOC platform with an integrated impedimetric sensor was developed for cell growth monitoring inside the microbioreactor. The sensor was realized using inkjet printing, and the integration into the LOC platform was done by combining poly(methyl methacrylate) - PMMA with a glass substrate. Validation of the detection was done by cultivation of mammalian cells for 96 hours inside the LOC platform, and biomass estimation using an impedance approach was compared with an image processing approach. The proposed impedance sensor successfully detected all phases of cell growth.

A novel fabrication technology for electrode fabrication was proposed based on gold leaves and applied for the electrochemical detection of bacteria *E. coli*, *S*. Typ-himurium, and cancer biomarker HER2. The proposed sensors were tested for signal stability, sensitivity, and specificity, and the relevant detection parameters were estimated from the equivalent electric circuit model. Finally, gold leaf electrodes (GLEs) showed better sensitivity and bigger specific surface compared to commercial electrodes.

The integration of the electrochemical sensor into the LOC platform with microfluidic mixers was realized for application in glucose detection. The mixing performance of serpentine-based microfluidic mixers was tested using Comsol Multiphysics software, and the platform was realized by combining 3D printing technologies and PMMA support layers. The proposed detection concept is demonstrated for the detection of glucose in acetate buffer and cell culture medium.

Spisak publikacija

M21 – rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

- Podunavac I.; Kukkar M.; Leguillier, V; Rizzotto, F; Pavlovic, Z; Janjusevic, Lj; Costache, V; Radonic, V; Vidic, J. Low-cost goldleaf electrode as a platform for Escherichia coli immunodetection. Talanta 2023, 259, 124557. doi:10.1016/j.talanta.2023.124557
- Podunavac, I.; Knežić, T.; Djisalov, M.; Omerovic, N.; Radovic, M.; Janjušević, L.; Stefanovic, D.; Panic, M.; Gadjanski, I.; Radonic, V. Mammalian Cell-Growth Monitoring Based on an Impedimetric Sensor and Image Processing within a Microfluidic Platform. Sensors 2023, 23, 3748. doi:10.3390/s23073748
- 3. **Podunavac, I.**; Radonic, V.; Bengin, V.; Jankovic, N. Microwave Spoof Surface Plasmon Polariton-Based Sensor for Ultrasensitive Detection of Liquid Analyte Dielectric Constant. Sensors 2021, 21, 5477. doi:10.3390/s21165477
- Djisalov, M.; Knezic, T.; Podunavac, I.; Zivojevic, K.; Radonic, V.; Knezevic, N.Z.; Bobrinetskiy, I.; Gadjanski, I. Cultivating Multidisciplinarity: Manufacturing and Sensing Challenges in Cultured Meat Production. Biology 2021, 10, 204. doi:10.3390/biology10030204

M22 – rad u istaknutom međunarodnom časopisu

 Podunavac, I.; Djocos, M.; Vejin, M.; Birgermajer, S.; Pavlovic, Z.; Kojic, S.; Petrovic, B.; Radonic, V. 3D-Printed Microfluidic Chip for Real-Time Glucose Monitoring in Liquid Analytes. Micromachines 2023, 14, 503. doi:10.3390/mi14030503

M33 – saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

- 1. **Kundacina, I.**; Kukkar, M.; Nastasijevic, I; Mitrovic, R.; Radonic, V. Rapid and cost-effective fabrication of biosensors for Salmonella detection, IEEE Sensors 2023, Vienna, Austria
- Podunavac, I.; Radonic, V.; Bengin, V.; Jankovic, N. Design of Spoof Surface Plasmon Polariton-based Sensor for Low Dielectric Constant Liquid Samplest. 15th International Conference on Advanced Technologies, Systems and Services in Telecommunications (TELSIKS 2021), Nis, Serbia

M34 – saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

- 1. Djisalov, M., **Podunavac, I.**, Radonic, V., Gadjanski, I., Can sensors help in reducing costs associated with cultivated meat production?, Cellular Agriculture Online Symposium, July 2020
- 2. **Podunavac, I.**, Knezic, T., Djisalov, M., Janjusevic, Lj., Radonic, V., Gadjanski, I. Lab-on-a-chip approach for biomass impedance-based sensing in microbioreactors, International Scientific Conference on Cultured Meat (7; Online; 2021)

Spisak slika

1.1	(a) p-polarizacija upadnog EM zračenja na razdelnu površinu metal-	
	dielektrik; (b) šema EM talasa i površinskih naelektrisanja na razdelnoj	
	površini metala i dielektrika; intenzitet komponente električnog polja	
	normalan na razdelnu površinu eksponencijalno opada udaljavanjem	
	od razdelne površine	8
1.2	Kriva disperzije SPP talasa.	10
1.3	(a) Predložena jedinična ćelija; (b) Jedinična ćelija češljaste strukture.	13
1.4	Višeslojna struktura SSPP senzora za detekciju dielektrične permitivnosti.	14
1.5	(a) Disperziona kriva češljaste strukture i predložene jedinične ćelije za	
	vrednosti perioda d u opsegu 2,5 - 10 mm; (b) Disperziona kriva če-	
	šljaste i predložene jedinične ćelije za period $d = 7,5$ mm za različite	
	vrednosti dielektrične permitivnosti ε_r u opsegu 1 - 5; (c) Zavisnost uče-	
	stalosti površinskih plazmona od dielektrične permitivnosti za češljastu	
	i predloženu jediničnu ćeliju.	15
1.6	Simuliran odziv senzora za uzorke dielektrične permitivnosti u opsegu	
	1 - 5 za periode jedinične ćelije: (a) $d = 2,5$ mm; (b) $d = 5$ mm; (c) $d = 7,5$	
	mm; (d) $d = 10$ mm. Unutrašnji grafici: Kalibracione krive transmisionih	
	nula u funkciji dielektrične permitivnosti	17
1.7	Odziv mikrotalasnog na bazi SSPP talasa za broj jediničnih ćelija 5, 7 i 9	
	za uzorke dielektrične permitivnosti 1, 3 i 5	18
1.8	Hibridna tehnologija izrade senzorske platforme; (a) Srednji sloj sa ko-	
	morom za fluid izrađen je u PMMA; (b) Lepljenje slojeva omogućeno	
	je obostrano lepljivom 3M trakom; (c) Gornji sloj PVC folije zatvara ko-	
	moru sa gornje strane; (d) Donji sloj PVC folije zatvara komoru sa donje	
	strane; (e) Izgled realizovane senzorske platforme odozgo; (f) Izgled	
	realizovane senzorske platforme odozdo.	19
1.9	Postavka eksperimenta. Vektorski analizator mreže povezan je sa SSPP	
	senzorom u cilju merenja dielektrične permitivnosti jestivih ulja	20
1.10	(a) Rezultati eksperimenata i simulacija za uzorke jestivih ulja; (b) Re-	
	zultati eksperimenata i simulacija za uzorke izmešanog palminog i ri-	
	cinusovog ulja, tabela 1.2; (c) Spektralne pozicije transmisionih nula za	
	sve izmerene uzorke	22

2.1 2.2	Kriva disperzije bioloških materijala	28
	ćelijama	30
2.3 2.4	Višeslojna struktura mikrofluidične platforme sa dimenzijama u mm (a) Inkdžet štampani impedansni senzor na staklu; (b) Slika sa profi- lometra inkdžet štampanih elektroda; (c) SEM slika inkdžet štampanih elektroda pri uvećanju × 3000; (d) Postavka eksperimenta. Portabilni potenciostat PalmSens smešten je unutar CO ₂ inkubatora zajedno sa	31
2.5	mikrobioreaktorom sa impedansnim senzorom	33
2.6	 dardnu devijaciju izračunatu za 8 ponovljenih merenja. (d) Kontrolna merenja. Poređenje između svežeg i medijuma nakon kultivacije, tj. medijuma nakon 96 h kultivacije u pogledu modula impedanse, Re i Im dela. (a) Poređenje rezultata merenja impedansnog senzora sa rezultatima fitovanja ekvivalentnim električnim kolom predstavljenim u unutrašnjosti grafika. (b) Poređenje kapaciteta ćelija iz fitovanog modela i procenta 	35
	pokrivenosti površine senzora ćelija dobijena pomoću obrade mikro- skopskih slika	40
3.1	Šematski prikaz dvosloja na razdelnoj površini između elektrode i tečne	18
3.2	(a) Promena potencijala u toku vremena u cikličnoj voltametriji; (b) Pri- mer cikličnog voltamograma.	49
3.3	(a) Šematski prikaz ekvivalentnog električnog kola i razdelne površine	54
3.4	(a) Zavisnost potencijala od vremena u hronoamperometriji; (b) Zavi-	
3.5	snost struje od vremena u hronoamperometriji	55
3.6	listići laminirani na PVC podlogu posle laserske ablacije	58
3.7	zlatnih listića na PVC podlozi; (b) Dva sloja zlatnih listića na PVC podlozi. (a) Rezultati EDS analize elektrode sa jednim slojem zlatnih listića; (b)	60
	Rezultati EDS analize elektrode sa dva sloja zlatnih listića; (c) Maseni udeo elemenata za elektrode sa jednim i dva sloja zlatnih listića	61

3.8	(a) Površina zlatnih elektroda snimljena optičkim profilometrom; (b) 3D	
	prikaz elektroda snimljen pomoću optičkog profilometra	62
3.9	(a) Dimenzije planarnog dvoelektrodnog sistema na bazi zlatnih listića;	
	Dimenzije na slici predstavljene su u mm; (b) Postavka eksperimenta sa	
	eksternom Ag/AgCl referentnom elektrode; (c) Postavka eksperimenta	
	za dvoelektrodni sistem; (d) Postavka eksperimenta	63
3.10	Karakterizacija elektroda na bazi zlatnih listića; (a) CV u 0,5 M sumpor-	
	noj kiselini za brzinu skeniranja od 0,5 V/s; (b) CV u 10 mM kalijum	
	fero/fericijanida u PBS puferu tokom 25 ciklusa; (c) Nikvistov dijagram	
	za 10 mM fero/fericijanida u PBS puferu za 5 različitih elektroda; (d)	
	Procena ponovljivosti izrade elektroda pomoću parametra otpora pre-	
	nosu naelektrisanja.	64
3.11	(a) CV u 10 mM fero/fericijanidu u PBS puferu za brzine skeniranja u	
	opsegu 0,1 do 1 V/s; (b) Zavisnost pikova oksidacije i redukcije 10 mM	
	fero/fericijanida u PBS puferu od korena brzine skeniranja; (c) Nikvi-	
	stovi dijagrami za različite koncentracije fero/fericijanida u PBS puferu;	
	(d) Modul impedanse na 1 Hz i 100 kHz za različite koncentracije fe-	
	ro/fericijanida u PBS puferu u opsegu 0,001 mM - 0,1 mM i 0,1 mM - 10	
	mM, respektivno.	65
3.12	Šematski prikaz slojeva funkcionalizacije površine zlatne radne elektro-	
	de za specifičnu detekciju <i>E. coli</i> .	66
3.13	(a) SEM slika površine zlatne elektrode sa obeleženim organskim ma-	
	terijalom na površini; (b) SEM slika površine zlatne elektrode sa MPA	
	i obeleženim organskim materijalom na površini; (c) Kontaktni ugao	
	površine radne elektrode na bazi zlatnih listića; (d) Kontaktni ugao po-	
	vršine radne elektrode na bazi zlatnih listića modifikovane sa MPA	67
3.14	(a) Nikvistovi dijagrami nakon svakog od koraka funkcionalizacije bio-	
	senzora. Unutrašni grafik: Ekvivalentno električno kolo korišćeno za	
	fitovanje rezultata; (b) Otpor prenosu naelektrisanja za različite korake	
	funkcionalizacije.	68
3.15	(a) Rezultati detekcije <i>E. coli</i> za koncentracije u opseg 10^1 - 10^7 cfu/mL;	
	(b) Rezultati fitovanja ekvivalentnim električnim kolom: Otpor preno-	
	su naelektrisanja u funkciji koncentracije bakterija. Unutrašnji grafik:	
	Ekvivalentno električno kolo korišćeno za fitovanje rezultata	69
3.16	Specifičnost detekcije biosenzora. Relativna promena signala $\delta(\%)$ =	
	$\frac{R_{ct}(cc)-R_{ct}(BSA)}{R_{ct}(BSA)}$ za različite koncentracije specifične <i>E. coli</i> i nespecifičnih	
	bakterija <i>E. aerogenes</i> i <i>B. subtilis</i>	70
3.17	Šematski prikaz funkcionalizacije površine zlata za detekciju salmonele.	74

3.18	Karakterizacije površine radne elektrode merenjem kontaktnog ugla pre	
	i nakon nanošenja merkaptoundekanoične kiseline. (a) Zlato; (b) Zlato	
	sa merkaptoundekanoičnom kiselinom.	75
3.19	(a) Ekvivalentno kolo korišćeno za fitovanje rezultata; (b) Otpor pre-	
	nosu naelektrisanja za različite korake funkcionalizacije; (c) Nikvistovi	
	dijagrami za različite koncentracije bakterija; (d) Otpor prenosu naelek-	
	trisanja u funkciji različitih koncentracije salmonele	76
3.20	Specifičnost detekcije biosenzora	77
3.21	(a) Komercijalna sito-štampana elektroda Dropsens 220AT; (b) Planarna	
	elektroda na bazi zlatnih listića; (c) Integrisan sistem elektroda na bazi	
	zlatnih listića u mikrofluidični rezervoar; (d) Realizovani planarni dizajn;	
	(e) Realizovani 3D dizajn	82
3.22	(a) Voltamogram zlata u 0,5 M sumpornoj kiselini; (b) Randles-Ševičkov	
	dijagram u 10 mM kalijum fero/ferijcijanidu u PBS puferu; (c) Pikovi	
	oksidacije i redukcije u funkciji korena brzine skeniranja; (d) Stabilnost	
	signala tokom 25 ciklusa u 10 mM kalijum fero/fericijanidu u PBS puferu.	84
3.23	Nikvistovi dijagrami za različite koncentracije redoks para u vodi, kali-	
	jum hloridu i PBS puferu. Unutrašnji grafici predstavljaju odziv senzora	
	za čist elektrolit bez redoks para; (a) Planarna elektroda na bazi zlatnih	
	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu	
	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru.	85
3.24	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87
3.24 3.25	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87
3.24 3.25	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88
3.24 3.25 3.26	 lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru. Šematski prikaz procesa funkcionalizacije površine zlata. (a) Fluorescentni test vezivanja antigen HER2 - antitelo Tmab; (b) Fluorescentni test vezivanja pL - antitelo Tmab. (a) Raman spektroskopija zlata, zlata sa MUA, zlata sa MUA i proteinom 	85 87 88
3.24 3.25 3.26	 lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru. Šematski prikaz procesa funkcionalizacije površine zlata. (a) Fluorescentni test vezivanja antigen HER2 - antitelo Tmab; (b) Fluorescentni test vezivanja pL - antitelo Tmab. (a) Raman spektroskopija zlata, zlata sa MUA, zlata sa MUA i proteinom L u opsegu od 100 do 2000 cm⁻¹; (b) Dekonvolucija pikova u u opsegu 	85 87 88
3.24 3.25 3.26	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88 89
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88 89
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88 89
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88 89
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88
3.243.253.263.27	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	85 87 88 89 91
 3.24 3.25 3.26 3.27 3.28 	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	8587888991
 3.24 3.25 3.26 3.27 3.28 	lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru	8587888991

3.29	Specifičnost detekcije HER2 senzora. Relativna pr	romena otpora prenosu
	naelektrisanja izračunata je prema izrazu: $\delta(\%) =$	$\frac{R_{ct}(cc) - R_{ct}(1000 \ ng/mL \ Tmab)}{R_{ct}(1000 \ ng/mL \ Tmab)}$
	93	

3.30	Kontrolna merenja sa ponavljajućom inkubacijom medijuma. Relativ-	
	na promena otpora prenosu naelektrisanja izračunata je prema izrazu:	
	$\delta(\%) = \frac{R_{ct}(cc) - R_{ct}(medijum)}{R_{ct}(medijum)} \dots \dots$	94

3.35 Rezultati elektrohemijske detekcije glukoze; (a) Ispitivanje potencijala oksidacije vodonik peroksida (H₂O₂); Ciklusi 1-2 snimljeni su u acetatnom puferu. Ciklusi 3-4 snimljeni nakon dodavanja kapi GOx. Ciklusi 5-6 snimljeni nakon dodavanja kapi fruktoze. Ciklusi 7-8 snimljeni nakon dodavanja kapi glukoze; (b) Intenzitet pika oksidacije sa slike (a) na 0,9 V vs. Ag/AgCl RE; (c) Rezultati hronoamperometrije za detekciju glukoze pripremljene u acetatnom puferu; Unutrašnji grafik: Uvećani prikaz kontrolnih merenja i malih koncentracija Glc; (d) Kalibraciona kriva detekcije glukoze u acetatnom puferu. Signal je predstavljen kao relativna promena vrednosti u odnosu na signal acetatnog pufera, $\delta(\%) = 100 \times (I_{konc.} - I_{pufer})/I_{pufer}$; Unutrašnji grafik: Uvećani prikaz kalibracione krive za glukozu u opsegu 0,05 - 2,5 mg/mL. 108

3.36	(a) Rezultati hronoamperometrije za različite koncentracije glukoze u	
	ćelijskom medijumu. Unutrašnji grafik: Kalibraciona kriva za medijum;	
	(b) Kalibraciona kriva u ćelijskom medijumu na ulazu u LOC platformu;	
	Realna koncentracija je izračunata množenjem izmerene koncentracije	
	sa odnosom protoka i faktorom 2 koji predstavlja razblaženje nakon	
	mešanja u čipu. Signal je izračunat sledećim izrazom: $\delta(\%) = 100 \times$	
	$(I_{konc.} - I_{pufer})/I_{pufer}$	109

Spisak tabela

1.1	Poređenje osetljivosti i linearnosti odziva senzora za različite periode	
	jedinične ćelije	17
1.2	Dielektrična permitivnost uzoraka ulja i uzoraka izmešanog palminog i	
	ricinusovog ulja	21
1.3	Poređenje predloženog SSPP senzora za merenje dielektrične permitiv-	
	nosti sa drugim predloženim rešenjima u karakterizaciji ulja u pogledu	
	principa detekcije, zapremine uzorka, osetljivosti i kompleksnosti izrade.	24
2.1	Rezultati obrade mikroskopskih slika. Srednje vrednosti i standardne	
	devijacije pokrivenosti površine senzora tokom 96 h kultivacije ćelija.	38
2.2	Mikroskopske slike i proces obrade slike u cilju detekcije koncentracije	
	ćelija u mikrobioreaktoru.	39
3.1	Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije E. coli iz prethodnih	
	istraživanja	72
3.2	Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije S. Typhimurium iz	
	prethodnih istraživanja	79
3.3	Poređenje elektroaktivnih površina i faktora hrapavosti komercijalne	
	Dropsens elektrode, planarne elektrode na bazi zlatnih listića i elektrode	
	na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru (3D)	83
3.4	Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije HER2 iz prethodnih	
	istraživanja	97

Rečnik stranih izraza

- engl. Lab-on-a-chip Laboratorija na čipu, LOC
- engl. Surface Plasmon Polariton Površinski plazmonski polaritoni, SPP
- engl. Spoof Surface Plasmon Polariton Dizajnirani (Lažni) površinski plazmonski polaritoni, SSPP
- engl. Printed Circuit Board Tehnologija štampanih ploča, PCB
- engl. Ground masa
- engl. Polyvinyl chloride Polivinil-hlorid, PVC
- engl. Poly(methyl methacrilate) Poli(metil metakrilat), PMMA
- engl. Xurography Ksirografija
- engl. Vector network analyzer Vektorski analizator mreže, VNA
- engl. SubMiniature version A connectors Površinski montirani konektori, SMA
- engl. Scale down approach Strategija smanjivanja razmere
- engl. Alternative current Naizmenična struja, AC
- engl. Direct current Jednosmerna struja, DC
- engl. Scanning electron microscopy Skenirajući elektronski mikroskopija, SEM
- engl. Cyclic voltammetry Ciklična voltametrija, CV
- engl. *Electrochemical impedance spectroscopy* Elektrohemijska impedansna spektroskopija, EIS
- engl. Chronoamperometry Hronoamperometrija, CA
- engl. Squared wave voltammetry Voltametrija pravougaonog talasa, SWV
- engl. Solution resistance Otpor rastvora, R_{sol}
- engl. Charge transfer resistance Otpor prenosu naelektrisanja, R_{ct}

- engl. Warburg element Varburgov element, W
- engl. Double layer capacitance Kapacitivnost dvojnog sloja, Cdl
- engl. Coffee ring effect Efekat kafene mrlje
- engl. Energy Dispersive Spectroscopy Energetska disperzivna spektroskopija, EDS
- engl. Self-assembled monolayer Samoorganizujući sloj
- engl. Mercaptopropionic acid Merkaptopropionična kiselina, MPA
- engl. Bovine Serum Albumin Goveđi serumski albumin, BSA
- engl. Mercaptoundecanoic acid Merkaptoundekanoična kiselina, MUA
- engl. Diferential Pulse Voltammetry Diferencijalna pulsna voltametrija, DPV
- engl. Gold leaf electrode Elektroda na bazi zlatnih listića, GLE
- engl. Deionized water Dejonizovana voda, DI
- engl. *Glucose* glukoza, Glc
- engl. Computer Numeric Control Računarska numerički upravljana mašina, CNC

Uvod

Razvoj savremenih mikro i nanotehnologija uneo je niz novina u oblast razvoja senzora, u pogledu dizajna senzora, načina izrade kao i primene novih materijala u cilju smanjivanja dimenzija senzora i povećanja osetljivosti detekcije. Pored razvoja samih senzora, savremena istraživanja orijentisana su i na njihovu integraciju u kompaktne multifunkcionalne platforme, poznate kao Laboratorija-na-čipu (engl. *Lab-on-a-chip* (LOC)). LOC platforme često koriste koncept mikrofluidike i primene mikrokanala za manipulaciju fluidom, rezervoare za skladištenje fluida, kao i optičke i elektronske komponente za detekciju promena u analitu. Razvoj ovakvih sistema zahteva multidisciplinaran pristup i predstavlja jednu od aktuelnih tema savremene nauke. Aktuelna istraživanja u ovoj oblasti usmerena su na razvoj mikrofluidičnih platformi koje integrišu senzore i biosenzore, sa ciljem detekcije bakterija u hrani i vodi, tumor biomarkera, monitoringa različitih parametara životne sredine, kontroli kvaliteta hrane, kao i u novijim istraživanjima posvećenim razvoju kultivisanog mesa, itd.

Zbog mogućnosti detekcije u realnom vremenu, mikrotalasni senzori predstavljaju odlično rešenje za širok opseg primena uključujući merenje dielektrične permitivnosti, kontrolu kvaliteta hrane, detekciju biomolekula, itd. Međutim, veliki nedostatak mikrotalasnih senzora zasnovan je na nemogućnosti detekcije sa velikom osetljivošću i oni se uglavnom primenjuju u oblastima gde se ne zahteva detekcija malih promena dielektrične permitivnosti. Jedan od obećavajućih fenomena za ultraosetljivu detekciju promene dielektrične permitivnosti zasniva se na površinskim plazmonskim polaritonima (engl. Surface Plasmon Polaritons, SPP) odnosno površinskom talasu koji nastaje sprezanjem fotona i slobodnih elektrona na razdelnoj površini između metala i dielektrika. Ove oscilacije karakteristične su po tome što su fizički vezane za razdelnu površinu dva materijala, najčešće metala i dielektrika, i samim tim omogućavaju jaka lokalna polja i interakciju na dimenzijama manjim od konvencionalnog limita difrakcije, zbog čega su veoma moćan alat za realizaciju visokoosetljivih senzorskih i biosenzorskih sistema. Međutim, SPP talasi se prostiru na razdelnoj površini provodnik/dielektrik na optičkim učestalostima i zbog toga se primenom koncepta dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona (engl. Spoof Surface Plasmon Polariton - SSPP) omogućava njihovo prostiranje i u dalekom infracrvenom, mikrotalasnom i terahercnom opsegu učestalosti. Ovaj koncept omogućen je primenom dizajniranih senzorskih konfiguracija, kao i plazmoničnih metamaterijala, koji omogućavaju imitaciju SPP propagacije na pomenutim učestalostima. Primenom pomenutog principa, u okviru doktorske disertacije razvijen je senzor za detekciju malih promena dielektrične permitivnosti velike osetljivosti. Analizom konfiguracije senzora ispitani su različiti oblici jedinične ćelije, kao i njihov uticaj na osetljivost senzora na male promene dielektrične permitivnosti. Velika osetljivost detekcije dielektrične permitivnosti ima potencijalnu primenu u kontroli kvaliteta hrane, gde dielektrična permitivnost predstavlja jedan od bitnih parametara kvaliteta. U okviru glave 1 doktorske disertacije biće predstavljeni rezultati simulacija, optimizacije, realizacije i eksperimentalne verifikacije LOC platforme sa integrisanim senzorom na bazi SSPP talasa za identifikaciju i kontrolu kvaliteta jestivih ulja.

Pored mikrotalasnog senzora, u okviru doktorske disertacije razvijeno je i LOC rešenje za praćenje životnog ciklusa ćelije unutar mikrobioreaktora primenom impedansnog senzora. Naime, principi detekcije senzora za bioanalize često su zasnovani na električnim osobinama ćelija, za koje je ustanovljeno da ispoljavaju različito ponašanje u zavisnosti od opsega učestalosti koji se koristi za analize. Većina realnih materijala pokazuje i dielektrična i provodna svojstva zbog postojanja kako dipola, tako i slobodnih nosilaca naelektrisanja koji se kreću kroz materijal. Kod materijala sa heterogenom strukturom (kao što su biološki materijali) pri kretanju slobodnih nosilaca naelektrisanja u polju, može doći i do nagomilavanja naelektrisanja na unutrašnjim razdelnim površinama. U heterogenim sistemima, unutrašnje razdvajanje naelektrisanja dovodi do formiranja efektivne unutrašnje polarizacije i stoga se na makroskopskom nivou, za opis sistema koriste veličine dielektrična permitivnost i provodljivost. Pomenute veličine zavisne su od učestalosti, a njihova promena opisana je disperzionom karakteristikom. Napredak mikrofluidike i senzorskih tehnologija doveo je do razvoja novih metoda monitoringa rasta ćelija, kako u makro tako i u mikrosistemima. U okviru glave 2 doktorske disertacije predstavljena je realizacija mikrofluidične platforme sa mikrobioreaktorom i integrisanim impedansnim senzorom u cilju monitoringa rasta ćelija tokom procesa kultivacije u minijaturizovanoj platformi koja predstavlja simulator velikog bioreaktorskog sistema u smanjenim razmerama. Impedansni senzor sa interdigitalnim dizajnom elektroda realizovan je u procesu inkdžet štampe. Metod izrade mikrofluidične platforme predstavlja brzo i efikasno rešenje za izradu simulatora smanjenih razmera za montinoring rasta ćelija, što može naći primenu u npr. procesu razvoja kultivisanog mesa. U predloženom sistemu, sisarske ćelije MRC-5 korišćene su kao model adherentnih ćelija, a senzor je uspešno detektovao sve faze rasta ćelija (lag, eksponencijalnu, stacionarnu, i fazu odumiranja) tokom 96 h kultivacije ćelija sa ograničenim nutrijentima. Kombinovanjem impedansnog pristupa sa obradom slike, predložena je platforma koja može da posluži za praćenje biomase u realnom vremenu i napredni sistem praćenja rasta ćelija u mikrobioreaktoru, tj. sistemu smanjenih razmera.

Takođe, princip minijaturizacije iskorišćen je za realizaciju biosenzorskih rešenja za detekciju specifičnih analita u kapi uzorka. Biosenzori predstavljaju najnaprednije analitičke uređaje koji mere biološke ili hemijske reakcije prevodeći ih u električne signale koji određuju koncentraciju ciljnog elementa. Sastoje se od dva osnovna elementa: bioprepoznatljivog elementa (kao što su antitela, aptameri, enzimi, nukleinske kiseline, itd.) koji specifično prepoznaju ciljni bioelement (kao što su mikroorganizmi, virusi, molekuli, nukleinske kiseline, biomarkeri itd.). Biosenzori imaju potencijal da promene standardne procese dijagnostike i monitoringa u različitim industrijskim oblastima. Primenom biosenzora pruža se brza, precizna i ekonomična alternativa tradicionalnim laboratorijskim metodama.

Veliki značaj razvoja biosenzorskih tehnologija ogleda se u detekciji bakterija u hrani i životnoj sredini, kao izazivača ~600 miliona oboljenja i 420000 smrtnih slučajeva širom sveta, po podacima Svetske zdravstvene organizacije. Pravovremena detekcija patogena u uzorcima može sprečiti dalje širenje kontaminacije i bolesti, sa širokom primenom u zaštiti životne sredine, zdravstvu, kontroli kvaliteta hrane, itd. Zbog toga postoji potreba na tržištu za brzom i specifičnom detekcijom bakterija, odnosno metodom koja omogućava specifičnu detekciju patogena na terenu. Izazovi u razvoju ovih biosenzorskih rešenja baziraju se na odabiru provodnih materijala i njihovoj modifikaciji bioprepoznatljivim elemenatima (kao što su antitela) za specifičnu detekciju u malim zapreminama uzorka. Biosenzorska rešenja bi u predloženim primenama omogućila dobijanje informacija u realnom vremenu i pravovremeno preventivno delovanje i preduzimanje odgovarajućih mera. Elektrohemijski biosenzori na bazi zlata najčešće se koriste zbog inertnosti zlata kao podloge i njegovoj efikasnoj funkcionalizaciji sa biomolekulima sa tiolnom grupom, koja ima jak afinitet za vezivanje na zlatu. Brza i jeftina izrada biosenzora na bazi zlatnih listića predložena je pomoću laserske ablacije zlatnih podloga i funkcionalizacije elektrode bioprepoznatljivim elementom za detekciju specifičnog bioelementa. U okviru glave 3 doktorske disertacije, biće predstavljeni rezultati razvoja nove tehnologije jeftine izrade elektroda, koje se u procesu biofunkcionalizacije prilagođavaju detekciji bakterija. Eksperimentalna verifikacija razvijene tehnologije i realizovanih biosenzora potvrđena je detekcijom niskih koncentracija bakterija Escherichia coli i Salmonella Typhimurium.

Pored sigurnosti hrane, rana detekcija tumor biomarkera predstavlja globalni zdravstveni izazov. Iako se brojne studije i kampanje bave prevencijom i lečenjem karcinoma dojke, ključna komponenta u borbi protiv ovog oboljenja jeste rana detekcija specifičnih biomarkera. Jedan od najvažnijih biomarkera je HER2, koji predstavlja ključni faktor u proceni i tretmanu karcinoma dojke. U okviru doktorske disertacije razvijen je elektrohemijski biosenzor za detekciju HER2 tumor biomarkera na bazi nove tehnologije izrade elektroda. Predloženi koncept prevazilazi postojeća rešenja u pogledu jednostavnosti, cene izrade senzora, kao i osetljivosti detekcije.

Pored elektrohemijskih senzora za detekciju bakterija i tumor biomarkera HER2, u okviru doktorske disertacije realizovana je LOC platforma sa integrisanim biosenzorom za detekciju glukoze u tečnim analitima, pogodna za povezivanje sa makrosistemima za monitoring glukoze u realnom vremenu. Naime, povezivanje makrosistema sa mikrosistemima za merenja u realnom vremenu nalazi veliku primenu u različitim biotehnološkim procesima jer omogućava precizno praćenje parametara makroprocesa na mikroskali, što daje informacije o procesu i omogućava poboljšanu kontrolu i optimizaciju procesa. Pored toga, na ovaj način omogućeno je kontinuirano praćenje bez potrebe za ručnim uzorkovanjem i analizom, što sprečava potencijalnu kontaminaciju uzoraka, dovodi do efikasnije i isplativije proizvodnje. Smanjivanjem dimenzija sistema omogućava se precizna kontrola uslova i procena njihovog uticaj na relevantne procese u bioanalizama. Iz tog razloga početna istraživanja razvoja senzora često koriste fizičke principe mikrofluidike, a sa druge strane smanjuje se cena analiza kroz uštedu reagenasa i hemikalija. Potencijal detekcije predloženog koncepta potvrđen je u medijumu za kultivaciju ćelija, a predloženi čip pokazao je veliki potencijal za povezivanje sa makrosistemima, kao što su bioreaktori, za direktno praćenje glukoze u tečnom uzorku.

Glava 1

Senzor na bazi dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona za ultraosetljivu detekciju dielektrične permitivnosti

Savremena nauka i inženjerstvo naširoko koriste koncept metamaterijala, gde se inženjeringom geometrije materijala ostvaruju osobine koje ne postoje u prirodi, kao što su negativna permitivnost ili permeabilnost, negativni indeks prelamanja, itd. Metamaterijali se mogu definisati kao materijali dizajnirane strukture koji se koriste za kontrolu i manipulaciju elektromagnetnih ili akustičnih talasa. Naime, metamaterijali sadrže niz ponavljajućih jedinica, poznatih kao jedinične ćelije, čije su dimenzije značajno manje od talasne dužine zračenja sa kojom metamaterijal interaguje. Iz tog razloga, pri interakciji elektromagnetnog (EM) zračenja i materijala, EM talas "vidi" niz jediničnih ćelija kao efektivnu sredinu, odnosno voluminozni materijal sa specifičnim osobinama. Primena koncepta metamaterijala u dizajniranju senzora omogućava pojavu niza talasnih fenomena, koji se prirodno javljaju u drugim opsezima učestalosti.

Zahvaljujući svojim inovativnim osobinama, metamaterijali su omogućili razvoj novih uređaja i komponenata, te su našli primenu u različitim oblastima kao što su medicinska industrija, automobilska industrija, vazduhoplovstvo, kao i razvoju različitih senzora, antena, optičkih filtera itd. [1–5]. Pomenute inovacije otvorile su put za dalji napredak tehnologije senzora, primenom koncepta metamaterijala u slučaju akustičnih, optičkih i mikrotalasnih senzora.

Senzori čija se radna učestalost nalazi u opsegu 0,3 - 40 GHz klasifikuju se kao mikrotalasni senzori [6–9]. Zbog mogućnosti detekcije u realnom vremenu, neinvazivnim i beskontaktnim merenjima, mikrotalasni senzori predstavljaju pogodno rešenje za širok spektar primena, uključujući merenja dielektrične permitivnosti [10–13], kontrolu kvaliteta hrane [14–16], detekciju gasova [17–19] i biomolekula [20, 21], monitoring glukoze [22, 23], itd. Novija istraživanja kombinuju mikrotalasne senzore sa drugim tehnologijama, uključujući i mikrofluidiku, koja omogućuje izradu kompaktnih i isplativih platformi za brzu detekciju u malim količinama tečnosti [24, 25]. Iako postoji veliko interesovanje za poboljšanje njihove osetljivosti, uključujući primenu split-ring rezonatora [26, 27], transmisionih vodova [28], meta-površinskih apsorbera [29], peč rezonatora [30], itd., osetljivost senzora na promenu dielektrične permitivnosti je mala i koriste se za merenja u širem opsegu promene vrednosti dielektrične permitivnosti.

Fizički fenomen koji nudi mogućnost prevazilaženja pomenutih ograničenja osetljivosti mikrotalasnih senzora su površinski plazmonski polaritoni (engl. Surface Plasmon Polaritons, SPP), površinski talasi koji se javljaju na optičkim učestalostima na razdelnim površinama između provodnika i dielektrika. Primenom koncepta dizajniranih (lažnih) površinskih plazmonskih polaritona (engl. Spoof Surface Plasmon Polaritons, SSPP), u okviru doktorske disertacije razvijena je LOC platforma sa mikrotalasnim senzorom i integrisanom mikrofluidičnom komorom za tečne uzorke, u cilju detekcije malih promena dielektrične permitivnosti tečnih analita. Predložena je nova jedinična ćelija za SSPP strukturu, a njeno ponašanje i potencijal detekcije detaljno su analizirani. Senzor je realizovan kombinacijom brzih i ekonomičnih tehnologija ksirografije, laserskog mikromašinstva i hladne laminacije, a njegov potencijal je potvrđen eksperimentima sa uzorcima jestivog ulja. Rezultati pokazuju visoku osetljivost (850 MHz/jedinici dielektrične permitivnosti) i odličnu linearnost ($R^2 = 0.9802$) senzora, što, zajedno sa niskim troškovima i jednostavnom izradom, čini predloženi senzor kandidatom za detekciju malih promena dielektrične permitivnosti jestivih ulja i drugih tečnih analita.

1.1 Teorijski uvod

SPP talas predstavlja površinski EM talas koji se prostire duž razdelne površine dielektrik - metal, usled sprezanja EM polja upadnog talasa i kolektivnih oscilacija elektrona na površini metala. SPP talasi se prirodno javljaju unutar opsega učestalosti koji čine deo mikrotalasnog, infracrvenog (IC), vidljivog i dela ultraljubičastog spektra [31–33]. Različiti koncepti "pomeranja" fenomena SPP talasa na druge opsege učestalosti predloženi su u literaturi, u cilju primene pogodnih osobina ovih talasa [1, 34, 35]. U dalekom IC, terahercnom i mikrotalasnom opsegu učestalosti, metali se ponašaju dominantno kao dobri provodnici i zbog toga SPP talasi ne postoje na površini metala. Da bi se realizovali SPP talasi na mikrotalasnim ili terahercnim učestalostima, predloženi su plazmonični metamaterijali pomoću veštačkih (dizajniranih) struktura metalnih površina na skali manjoj od talasne dužine zračenja ili na tzv. podtalasnom nivou. Dizajnirane strukture sadrže periodične žlebove, otvore, proreze i blokove u cilju omogućavanja prostiranja SSP na mikrotalasnim i terahercnim učestalostima [1, 34–38]. Površinski EM modovi, koji se javljaju za različite konfiguracije plazmoničnih metamaterijala, nazivaju se engl. spoof plazmoni, "lažni" ili "dizajnirani" plazmoni. Njihove osobine veoma su slične SPP talasima na optičkim učestalostima, s bitnom razlikom da se njihove osobine, odnosno disperziona relacija i rezonantna učestalost mogu kontrolisati promenom geometrije i korišćenih materijala.

Konfiguracija polja i osnovne jednačine

U cilju dobijanja uslova postojanja SPP talasa na razdelnoj površini metala i dielektrika, analizirana je pobuda površinskih naelektrisanja na razdelnoj površini metala i dielektrika za slučaj p-polarizacije¹ upadnog EM zračenja.

Upadni ugao, θ_1 , definisan je u odnosu na normalu na razdelnu površinu, slika 1.1a. Moment impulsa fotona upadnog zračenja, $\hbar k_d$, sadrži talasni broj fotona, $k_d = \frac{2\pi}{\lambda}n_d$, koji se prostire kroz dielektrik sa indeksom prelamanja n_d . Na razdelnoj površini, reflektovani talas nastavlja kretanje pod istim uglom kao i upadni talas u odnosu na normalu, dok se deo talasa prelama pod uglom θ_2 u odnosu na normalu na razdelnu površinu i nastavlja kretanje kroz metal. Moment impulsa fotona u metalu je $\hbar k_m$, gde je talasni broj fotona $k_m = \frac{2\pi}{\lambda}n_m$ i n_m indeks prelamanja metala. Impuls duž *x* pravca je očuvan i važi $k_{dx} = k_{mx}$, gde je $k_{dx} = k_d \sin \theta_1$ i $k_{mx} = k_m \sin \theta_2$. Drugim rečima, važi Snelov zakon:

$$n_d \sin \theta_1 = n_m \sin \theta_2. \tag{1.1.1}$$

Generalno, indeks prelamanja dielektrika n_d veći je od indeksa prelamanja metala n_m u vidljivom delu spektra. U tom slučaju talas nailazi na razdelnu površinu iz optički gušće u optički ređu sredinu i vrednost prelomnog ugla θ_2 veća je od vrednosti upadnog ugla θ_1 . U ovom slučaju maksimalna vrednost prelomnog ugla je 90°, kada se upadni talas kreće duž razdelne površine dve sredine. Granični upadni ugao naziva se kritičnim uglom θ_c i opisuje sledećim izrazom:

$$\sin \theta_c = \frac{n_m}{n_d}.\tag{1.1.2}$$

Ako zrak pada na graničnu površinu pod uglom većim od θ_c , odbija se od razdelne površine simetrično u odnosu na normalu. Ova pojava poznata je kao totalna refleksija. Međutim, pri nailasku talasa na razdelnu površinu pod uglom većim od θ_c , moment impulsa upadnog talasa veći je od momenta impulsa koji metal može da primi. Za p-polarizovani talas na razdelnoj površini, oscilacije električnog polja dovođe do po-kretanja kolektivnih oscilacija površinskih naelektrisanja, gde oscilujuća naelektrisanja proizvođe polje koje prodire u metal i pri totalnoj refleksiji talasa. Ova polja nazivaju se iščezavajućim ili evanescentnim poljima i usmerena su u pravcu normalnom na razdelnu površinu, slika 1.1b. Za talas koji upada pod kritičnim uglom, dužina iščezavanja polja je beskonačna, ali ova vrednost brzo opada na red veličine talasne dužine svetlosti kako se upadni ugao povećava. U ovim slučajevima, iščezavajuća polja za upadni talas

¹ili TM moda talasa, gde je vektor električnog polja paralelan sa ravni upadnog EM zračenja.



Slika 1.1: (a) p-polarizacija upadnog EM zračenja na razdelnu površinu metal-dielektrik; (b) šema EM talasa i površinskih naelektrisanja na razdelnoj površini metala i dielektrika; intenzitet komponente električnog polja normalan na razdelnu površinu eksponencijalno opada udaljavanjem od razdelne površine.

iznad kritičnog ugla korisna su za sprezanje zračenja sa površinskim elektronima i formiranje površinskih plazmonskih polaritona.

Na osnovu graničnih uslova na razdelnoj površini dve sredine, komponenta električnog polja upadnog talasa E_x je očuvana, dok se komponenta električnog polja E_z menja pri nailasku na razdelnu površinu. Naime, normalna komponenta gustine električnog polja D_z je kontinualna s obzirom na to da nema slobodnih naelektrisanja na razdelnoj površini i E_z se menja sa dielektričnom permitivnošću sredine:

$$D_z = \varepsilon_d \varepsilon_0 E_{zd} = \varepsilon_m \varepsilon_0 E_{zm}, \qquad (1.1.3)$$

gde su ε_d i ε_m dielektrične permitivnosti dielektrika i metala, E_{zd} i E_{zm} z-komponente električnog polja dielektrika i metala, respektivno, a ε_0 dielektrična permitivnost vakuuma. Opisani diskontinuitet u E_z rezultuje promenu polarizacije na razdelnoj površini. Iz ove pretpostavke može se primetiti da s-polarizovani² upadni talas neće izazvati stvaranje naelektrisanja na razdelnoj površini, dok će p-polarizovani talas stvoriti vremenski zavisnu polarizaciju naelektrisanja na razdelnoj površini. Iz tog razloga u daljoj analizi biće razmatrana samo p-polarizacija EM talasa.

Magnetno i električno polje iznad površine metala (za z > 0) mogu se opisati izrazima (1.1.4) i (1.1.5), dok su magnetno i električno polje u oblasti z < 0 opisani izrazima (1.1.6) i (1.1.7):

$$H_d = (0, H_{yd}, 0) e^{-k_{zd}z + i(k_x x - \omega t)}, \qquad (1.1.4)$$

²ili TE moda talasa, gde je vektor električnog polja normalan na ravan upadnog EM zračenja.

$$E_d = (E_{xd}, 0, E_{zd}) e^{-k_{zd}z + i(k_x x - \omega t)}, \qquad (1.1.5)$$

$$H_m = (0, H_{ym}, 0) e^{-k_{zm}z + i(k_x x - \omega t)}, \qquad (1.1.6)$$

$$E_m = (E_{xm}, 0, E_{zm}) e^{-k_{zm}z + i(k_x x - \omega t)}, \qquad (1.1.7)$$

gde H_d i E_d opisuju magnetno i električno polje u dielektriku, dok H_m i E_m opisuju magnetno i električno polje u metalu, respektivno. Komponenta x talasnog vektora označena je sa k_x , dok su z-komponente talasnog vektora u dielektriku i metalu opisane sa k_{zd} i k_{zm} , respektivno. Komponente x električnog polja predstavljene su sa E_{xd} i E_{xm} u dielektriku i metalu, dok su z-komponente električnog polja predstavljene sa E_{zd} i E_{zm} u dielektriku i metalu, dok su z-komponente električnog polja predstavljene sa E_{zd} i E_{zm} u dielektriku i metalu, respektivno. Analogno, y-komponente magnetnog polja u dielektriku i metalu predstavljene su sa H_{yd} i H_{ym} , respektivno.

Na osnovu prve i treće Maksvelove jednačine, kao i graničnih uslova za razdelnu površinu dva materijala, izveden je uslov za postojanje SPP talasa na razdelnoj površini dve sredine [39]. Granični uslovi koji važe za razdelnu površinu metal-dielektrik na slici 1.1 su: $E_{xd} = E_{xm} = E_x$, dok za pravac normalan na razdelnu površinu važi granični uslov $\varepsilon_d E_{xd} = \varepsilon_m E_{xm}$ i za magnetno polje $H_{yd} = H_{ym} = H_y$. Prema graničnim uslovima za razdelnu površinu između metala i dielekrika, tangencijalna komponenta vektora električnog i magnetnog polja je kontinualna. Veza između dielektričnih permitivnosti i normalnih komponenata talasnih vektora data je sledećim izrazom i predstavlja uslov postojanja površinskih plazmonskih polaritona:

$$\frac{k_{zd}}{k_{zm}} = -\frac{\varepsilon_d}{\varepsilon_m},\tag{1.1.8}$$

a disperzija talasnog broja definisana je izrazom:

$$k_x = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}},\tag{1.1.9}$$

odnosno:

$$k_{spp} = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}}.$$
(1.1.10)

Na slici 1.2 predstavljena je kriva opisana disperzionom relacijom, definisanom izrazom (1.1.10), za SPP talase na razdelnoj površini dielektrika permitivnosti ε_d i metala ε_m , bez gubitaka. Linija svetlosti odgovara ravanskom talasu u slobodnom prostoru ispunjenim dielektrikom. Disperziona kriva SPP talasa ima nelinearnu karakteristiku i uvek je sa desne strane u odnosu na liniju svetlosti, što ukazuje da su SPP talasi "sporiji" u odnosu na talas u slobodnom prostoru. Takođe, kao posledica sprezanja fotona i površinskih plazmona, SPP talasi pokazuju veći ukupni moment impulsa u slobodnom prostoru u odnosu na svetlost na istoj učestalosti.



Slika 1.2: Kriva disperzije SPP talasa.

Kao što je prethodno pomenuto, SPP talasi imaju evanescentna polja koja prodiru i u dielektrik i u metal. Evanescentno polje SPP talasa prostorno slabi u smeru normalnom na razdelnu površinu i u dielektriku i metalu, slika 1.1b. U ovom slučaju, dubina prodiranja polja u dielektrik i metal, respektivno, definisana je kao $\delta_d = 1/k_{zd}$ i $\delta_m = 1/k_{zm}$ kada električno polje opada na vrednost 1/e. Dubina prodiranja SPP talasa u dielektrik i metal data je izrazima (1.1.11) i (1.1.12):

$$\delta_d = \frac{1}{k} \left| \frac{\varepsilon_d + \varepsilon_m}{-\varepsilon_d^2} \right|^{\frac{1}{2}},\tag{1.1.11}$$

$$\delta_m = \frac{1}{k} \left| \frac{\varepsilon_d + \varepsilon_m}{-\varepsilon_m^2} \right|^{\frac{1}{2}}.$$
(1.1.12)

Iz prethodnih izraza može se videti da električna polja SPP talasa opadaju eksponencijalno sa rastojanjem od razdelne površine dve sredine. Na osnovu malih dubina prodora električnih polja SPP talasa u dielektriku i metalu, električna polja SPP koncentrisana su uglavnom blizu razdelne površine, a koncentracija polja značajno je povećana na razdelnoj površini. Bez obzira na to, koncentracija polja SPP talasa opada brzo od razdelne površine duž *z* pravca, a koncentracija polja veća je u dielektriku nego u metalu [39]. Kao što je prethodno opisano, osobine SPP talasa u opsegu optičkih učestalosti moguće je "preneti" i na opsege učestalosti mikrotalasa primenom koncepta dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona. Ovaj koncept iskorišćen je za realizaciju mikrotalasnih SSPP struktura na bazi različitih geometrija jediničnih ćelija, a u okviru disertacije za realizaciju mikrotalasnog senzora za visokoosetljivu detekciju dielektrične permitivnosti tečnih analita.

1.2 Pregled relevantnih istraživanja

Dosadašnja istraživanja dovela su do realizacije različitih planarnih konfiguracija koje podržavaju propagaciju SSPP talasa, a zasnovane su na gradijentnim otvorima [37], rešetkama [37], cik-cak žlebovima [40], žlebovima sa kružnim peč rezonatorima [41] i disk rezonatorima [42]. Osim toga, svojstva SSPP talasa korišćena su za realizaciju filtera [43–45], antena [46, 47] i talasovodnih sistema [48–50]. Uprkos njihovom velikom potencijalu za senzorske primene, samo nekoliko senzora zasnovanih na SSPP-u je predloženo u literaturi, uključujući senzor za merenje indeksa prelamanja i debljine materijala [51], senzor za procenu sadržaja vode u ljudskom tkivu [52] i detektor Šotkijeve diode [53]. Svi predloženi senzori, zasnovani na SSPP talasima, koriste jedinične ćelije sa češljastom strukturom visokoosetljivih svojstava. Senzor za procenu sadržaja vode u ljudskom tkivu [52], zasnovan na planarnom plazmonskom talasovodu, realizovan je u tehnologiji štampanih ploča (engl. Printed Circuit Board, PCB) i pokazao je sposobnost za in vivo merenja sadržaja vode u tkivu kože sa potencijalom za rane dijagnostičke primene. S druge strane, detektor Šotkijeve diode zasnovan na SSPP-u takođe je realizovan u PCB tehnologiji, gde je SSPP konfiguracija omogućila značajno povećanje osetljivosti detekcije [53]. Iako je senzorsko rešenje zasnovano na češljastoj strukturi metamaterijala pokazalo izuzetno visoke performanse u osetljivosti za merenje debljine i indeksa prelamanja, senzor nije eksperimentalno realizovan [51]. Pored toga, na bazi SPP fenomena predložen je senzor za merenje dielektrične permitivnosti sa visokom osetljivošću, takođe realizovan u PCB tehnologiji [54].

Generalno, senzori za detekciju promene dielektrične permitivnosti nalaze praktičnu primenu u karakterizaciji materijala [55–57], merenju vlažnosti zemljišta [58, 59], kontroli kvaliteta hrane [60, 61], mešavini fluida [62, 63], itd. Jedna od potencijalnih primena mikrotalasnih senzora u kojima osetljiv odziv može pružiti vredne informacije o uzorku je kontrola kvaliteta jestivih ulja. U tom smislu, dielektrična spektroskopija se koristi za detekciju falsifikata ulja [64], određivanje hemijskog sastava [65, 66], kontrolu kvaliteta jestivih ulja [67], određivanju degradaciju ulja prilikom prženja [68, 69], karakterizaciju kulinarskih ulja [27], određivanje vremena korišćenja ulja [28] i identifikaciju ulja [29, 70]. U nastavku disertacije biće predstavljen senzor na bazi SSPP talasa realizovan za detekciju malih promena dielektrične permitivnosti jestivih ulja u cilju identifikacije ulja i detekcije izmešanih uzoraka.

1.3 Senzor na bazi SSPP za ultraosetljivu detekciju dielektrične permitivnosti

Prethodno opisan princip dizajniranih površinskih plazmona iskorišćen je za realizaciju senzora za ultraosetljivu detekciju dielektrične permitivnosti tečnih analita. Primenom numeričkih simulacija ispitan je potencijal detekcije dve vrste jediničnih ćelija u pogledu osetljivosti detekcije uzoraka male dielektrične permitivnosti. Takođe, niz jediničnih ćelija optimizovan je u pogledu broja jediničnih ćelija i njihovih dimenzija, dajući optimalan dizajn SSPP senzora. Konačno, senzor je realizovan primenom jeftine hibridne tehnologije, a njegove performanse validirane sa uzorcima jestivih ulja [10, 11].

1.3.1 Disperzione krive jediničnih ćelija periodičnih struktura metalnog voda

Za potencijalnu primenu dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona u senzorskim tehnologijama, predložena je nova jedinična ćelija i upoređena sa standardnom jediničnom ćelijom češljaste strukture metalnog voda. Dimenzije jedinične ćelije optimizovane su tako da se opseg učestalosti kom asimptotski teže disperzione krive uklopi u mikrotalasne učestalosti zbog jednostavnosti izrade senzora milimetarskih dimenzija. Simulirana geometrija sadrži rezervoar u kom se nalazi uzorak dielektrične permitivnosti ε_{uzorka} i optimizovanu češljastu strukturu metalnog voda koja se nalazi iznad i ispod rezervoara. S obzirom na to da se princip detekcije dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona obezbeđuje nizom jediničnih ćelija u strukturi, performanse senzora i linearnost odziva ispitani su za različite vrednosti perioda jedinične ćelije. Takođe, ispitana je zavisnost broja jediničnih ćelija i gubitaka u strukturi.

Centralni element senzora je SSPP struktura, odnosno jedinična ćelija, čije geometrijske karakteristike određuju ponašanje SSPP strukture. Naime, fenomen SSPP u takvim kolima omogućava niskofrekventno ponašanje strukture na učestalostima koje odgovaraju rezonantnom ponašanju ćelijske jedinice. Drugim rečima, na učestalostima koje su bliske rezonantnoj učestalosti jedinične ćelije, talas postaje više konfiniran, a odgovarajuće disperzione karakteristike počinju odstupati od svetlosne linije, sve do učestalosti koja ne dozvoljava propagaciju, a koju karakteriše transmisiona nula u odzivu SSPP strukture.

U tom smislu, prvo je predložena nova jedinična ćelija, prikazana na slici 1.3a,

koja pruža kompaktniju strukturu u poređenju sa konvencionalnom češljastom strukturom, prikazanom na slici 1.3b, zahvaljujući dvema simetričnim strukturama koje formiraju T-oblikovanu prazninu. Ako pretpostavimo da su jedinične ćelije rezonantne ćelije sa njihovom efektivnom induktivnošću i kapacitivnošću, može se primetiti da dok predložena jedinična ćelija ima sličnu efektivnu kapacitivnost prema masi (engl. *ground*) kao češljasta struktura, njena efektivna induktivnost je značajno veća, a kao rezultat toga, predložena jedinična ćelija ima nižu rezonantnu učestalost. Za dobijanje disperzione relacije predložene jedinične ćelije i češljaste strukture, korišćen je CST Microwave Studio 2021 \mathbb{R}^3 . Problem je rešen koriščenjem Eigenmode solver-a. Ponavljajuća jedinica opisana je periodom *d*, širinom žleba *a*, dužinom žleba *h* i ukupnom visinom jedinice *w* i debljinom materijala *t*.



Slika 1.3: (a) Predložena jedinična ćelija; (b) Jedinična ćelija češljaste strukture.

U simulacijama je pretpostavljena potencijalna tehnologija izrade senzora, pa su za parametre korišćeni parametri materijala kao pri izradi senzora. Za modelovanje senzorske platforme zajedno sa komorom za tečne uzorke korišćeni su sledeći parametri za simulacije materijala: sloj aluminijuma debljine 40 μ m modelovan je tako da ima električnu provodljivost 3,56 × 10⁷ S/m. PVC folija debljine 80 μ m modelovana je sa dielektričnom permitivnošću 3,3 i tangensom ugla gubitaka (tan δ) 0,15, dok je PMMA debljine 2 mm modelovan sa dielektričnom permitivnošću 2,6 i tan δ 0,02. Iako rezultati simulacija pokazuju da osobine 3M trake imaju zanemarljiv doprinos rezultatima, modelovana je kao tanak film dielektrične permitivnosti 3.

Višeslojna struktura predloženog SSPP senzora prikazana je na slici 1.4. Kao što je opisano u uvodnom delu, princip detekcije senzora zasniva se na SSPP strukturi, koja je realizovana korišćenjem provodnih slojeva 1 i 7, dok slojevi 2 - 6 služe kao dielektrične podloge i istovremeno sadrže mikrofluidični rezervoar za uzorak. Zbog

 $^{^{3}\}mathrm{modul}$ MW & RF & OPTICAL | Periodic Structures | FSS, Metamaterial Unit Cell | Dispersion Diagram
postupka izrade, koji će biti detaljnije objašnjen u sekciji 1.3.3, slojevi su napravljeni od aluminijuma (Al) (slojevi 1 i 7), PVC folije (slojevi 2 i 6), poli(metil metakrilata) (PMMA) (sloj 4) i 3M obostrano lepljivih traka (slojevi 3 i 5). Osim toga, provodni slojevi optimizovani su da imaju gladak prelaz između mikrostrip linija i konektora u pogledu prilagođenja impedanse 50 Ω -skom standardu.



Slika 1.4: Višeslojna struktura SSPP senzora za detekciju dielektrične permitivnosti.

U cilju optimizacije performansi detekcije, ispitani su disperzioni dijagrami dve jedinične ćelije iste površine otiska. Češljasta jedinična ćelija okarakterisana je sa četiri parametra prikazana na slici 1.3 - period *d*, udaljenost između žlebova *a*, dužina žleba *h*, širina strukture *w*, i njihovi odnosi a = 0, 4d, h = 0, 8d, w = d, dok je predložena jedinična ćelija okarakterisana sa još dva dodatna geometrijska parametra - širina savijenih struktura b = 0, 067d, i udaljenost između savijenih oblika i dubine žleba x = 0, 2(w - h). Naime, svi parametri jediničnih ćelija funkcija su perioda *d*, što omogućava skaliranje strukture promenom njegove vrednosti.

Slika 1.5a predstavlja rezultate simulacija u kojima su upoređeni disperzioni dijagrami za različite vrednosti jedinične ćelije sa periodom *d* za predloženu i češljastu jediničnu ćeliju. Rezultati simulacija pokazuju da disperzioni dijagrami u slučaju obe ispitane jedinične ćelije značajno odstupaju od linije svetlosti. Takođe, u oba slučaja porast perioda *d* dovodi do smanjenja učestalosti površinskih plazmona, međutim,

predložena struktura jedinične ćelije pokazuje nižu učestalost površinskih plazmona u poređenju sa češljastom strukturom, što ukazuje na veću efektivnu induktivnost i posledično nižu rezonantnu učestalost.



Slika 1.5: (a) Disperziona kriva češljaste strukture i predložene jedinične ćelije za vrednosti perioda d u opsegu 2,5 - 10 mm; (b) Disperziona kriva češljaste i predložene jedinične ćelije za period d = 7,5 mm za različite vrednosti dielektrične permitivnosti ε_r u opsegu 1 - 5; (c) Zavisnost učestalosti površinskih plazmona od dielektrične permitivnosti za češljastu i predloženu jediničnu ćeliju.

1.3.2 Optimizacija dimenzija i broja jediničnih ćelija

Pored disperzionih dijagrama, analizirana je osetljivost i linearnost detekcije cele strukture senzora. Slika 1.6 prikazuje odgovore senzora za period jedinične ćelije u opsegu od 2,5 - 10 mm, respektivno i različite vrednosti dielektričnih permitivnosti uzoraka u opsegu 1 - 5. Grafici 1.6a-d predstavljaju koeficijent transmisije u zavisnosti od učestalosti, dok unutrašnji grafik svakog od grafika predstavlja zavisnost položaja transmisione nule i dielektrične permitivnosti tečnog analita. Kao i u slučaju disperzionih krivih, položaj transmisionih nula na graficima 1.6a-d prikazuje pomeranje ka nižim učestalostima sa porastom perioda jedinične ćelije. Tabela 1.1 sumira sve parametre osetljivosti i linearosti kalibracionih krivih, predstavljenih na unutrašnjim graficima slika 1.6 za različite periode jedinične ćelije. Osetljivost je analizirana prema izrazu $\frac{f_{max} - f_{min}}{\varepsilon_{max} - \varepsilon_{min}}$, gde su ε_{max} i ε_{min} maksimalna i minimalna vrednost dielektrične permitivnosti uzorka, dok su f_{max} i f_{min} učestalosti transmisionih nula koje odgovaraju ε_{max} i ε_{min} , respektivno. Može se primetiti da se najbolja linearost postiže u strukturi sa periodom d = 7,5 mm, odnosno R² = 0,964, dok je osetljivost 569 MHz/epsilon u opsegu dielektrične permitivnosti 1 - 5. Iako strukture sa d = 2,5, 5 i 10 mm pokazuju bolju osetljivost, dobra linearost je jedna od najvažnijih svojstava senzora i zbog toga je odabrana vrednost od 7,5 mm kao optimalna vrednost perioda jedinične ćelije za realizaciju senzora.





Slika 1.6: Simuliran odziv senzora za uzorke dielektrične permitivnosti u opsegu 1 - 5 za periode jedinične ćelije: (a) d = 2,5 mm; (b) d = 5 mm; (c) d = 7,5 mm; (d) d = 10 mm. Unutrašnji grafici: Kalibracione krive transmisionih nula u funkciji dielektrične permitivnosti.

Tabela 1.1: Poređenje osetljivosti i linearnosti odziva senzora za različite periode jedinične ćelije

Period jedinične	Osetljivost	Linearnost R ²	Fit
ćelije d (mm)	(MHz/epsilon)		
2,5	757,5	0,8956	$-0,718\varepsilon + 16,982$
5	718,8	0,962	-0,7124 ε + 9,486
7,5	532,1	0,964	-0,5633 ε + 6,7239
10	611,19	0,8932	-0,5772 ε + 5,7012

U sledećim rezultatima simulacija, period jedinične ćelije fiksiran je na d = 7,5 mm zbog odličnih linearnih karakteristika i kompaktnih dimenzija jednostavnih za izradu

senzora. Dalja analiza obuhvata poređenje odziva SSPP struktura sa različitim brojem jediničnih ćelija. Konkretno, dijagrami disperzije i učestalosti površinskih plazmona dobijaju se pod pretpostavkom da je struktura beskonačna, dok realni senzor dozvoljava konačan broj jediničnih ćelija. Stoga se mogu očekivati razlike između idealnih i realističnih slučajeva, a analizom je dobijen broj jediničnih ćelija koji pruža dobar odnos veličine strukture i ukupnih performansi senzora.

Slika 1.7 prikazuje rezultate simulacija za broj jediničnih ćelija 5, 7 i 9, za vrednosti dielektrične permitivnosti 1, 3 i 5, gde se vidi da nema značajnih razlika u položaju transmisionih nula, a samim tim ni u potencijalu osetljivosti detekcije. Rezultati pokazuju da struktura sa 9 jediničnih ćelija pokazuje dublje transmisione nule u poređenju sa 5 i 7 jediničnih ćelija koje pokazuju slično ponašanje. S druge strane, rezultati na slici 1.7 takođe pokazuju da broj jediničnih ćelija određuje gubitke u strukturi i pokazuje da struktura sa manjim brojem jediničnih ćelija ima manje gubitke. Stoga, 7 jediničnih ćelija je izabrano kao dobar kompromis između veličine senzora i dovoljno duboke transmisione nule da budu detektabilne u merenjima i svojstava sa malim gubicima.



Slika 1.7: Odziv mikrotalasnog na bazi SSPP talasa za broj jediničnih ćelija 5, 7 i 9 za uzorke dielektrične permitivnosti 1, 3 i 5.

Optimizovana struktura SSPP senzora sa periodom jedinične ćelije d=7,5 mm i optimalnim brojem jediničnih ćelija 7, izrađena je primenom hibridne tehnologije izrade, koja je opisana u nastavku.

1.3.3 Hibridna tehnologija izrade SSPP senzora

Na osnovu rezultata teoretske analize i kompleksnosti geometrije senzora razvijen je novi postupak izrade senzora. Predloženi SSPP senzor predstavlja višeslojnu strukturu dobijenu višestepenim procesom izrade. Postupak izrade zasniva se na tehnologijama ksirografije i laserskog mikromašinstva, korišćenjem jeftinih materijala i može se smatrati jednostavnim, ekonomičnim i brzim jer celokupan postupak traje svega nekoliko minuta.

Provodni slojevi 1 i 7 napravljeni su od aluminijumskih lepljivih folija i isečeni laserom (Nd:YAG Rofin-Sinar Power Line D-100). Sloj 4 sa mikrofluidičnim rezervoarom napravljen je sečenjem PMMA ploča pomoću CO₂ lasera (CNC—MBL 4040RS). Slojevi 2 i 6 izrađeni su u PVC foliji (MBL 80MIC Beograd, Srbija), dok su slojevi 3 i 5 obostrano lepljive trake 3M, a svi su isečeni pomoću ploter cuttera (Roland DG CAMM-1 GS-24). U procesu hladne laminacije, svi slojevi spojeni su u redosledu prikazanom na slici 1.4. Izgled svakog izrađenog sloja prikazan je na slici 1.8. Ista struktura korišćena je za izradu slojeva od PMMA i 3M trake, prikazanih na slici 1.8a i 1.8b, respektivno. Gornja PVC folija, prikazana na slici 1.8c, sadrži otvore za ulaz/izlaz fluida radi punjenja mikrofluidičnog rezervoara uzorcima, dok se donja PVC folija koristi za zatvaranje komore, slika 1.8d. Konačno, realizovani SSPP senzor prikazan je na slikama 1.8e i 1.8f, odozgo i odozdo, respektivno.



Slika 1.8: Hibridna tehnologija izrade senzorske platforme; (a) Srednji sloj sa komorom za fluid izrađen je u PMMA; (b) Lepljenje slojeva omogućeno je obostrano lepljivom 3M trakom; (c) Gornji sloj PVC folije zatvara komoru sa gornje strane; (d) Donji sloj PVC folije zatvara komoru sa donje strane; (e) Izgled realizovane senzorske platforme odozgo; (f) Izgled realizovane senzorske platforme odozdo.

Prethodno opisan postupak izrade omogućava realizaciju senzora kombinova-

njem jeftinih materijala i brzih tehnologija izrade. Opisana tehnologija iskorišćena je za realizaciju SSPP senzora, nakon čega je eksperimentalna validacija odrađena sa uzorcima jestivih ulja.

1.3.4 Eksperimentalna validacija performansi SSPP senzora

Za testiranje SSPP senzora korišćeni su uzorci ulja, počevši od palminog ulja, koje ima najnižu vrednost dielektrične permitivnosti od pripremljenih uzoraka. U svakom sledećem koraku, rezervoar je ispran korišćenjem uzorka sa prvom većom dielektričnom permitivnošću, a zatim je ponovo napunjen istim uzorkom. Zapremina komore unutar senzorske platforme iznosi 0,8 mL, što je ujedno i zapremina korišćenih uzoraka. Odzivi senzora mereni su pomoću vektorskog analizatora mreže (VNA, E5071C Agilent Technology), a za povezivanje između uređaja i SSPP senzora korišćeni su površinski montirani konektori (SMA Southwest Microwave 292-04A-5), prikazani na slici 1.9. Kalibracija senzora na jednoj tački urađena je sa mikrofluidičnim rezervoarom ispunjenim vazduhom.



Slika 1.9: Postavka eksperimenta. Vektorski analizator mreže povezan je sa SSPP senzorom u cilju merenja dielektrične permitivnosti jestivih ulja.

Kao što je prethodno rečeno, cilj predloženog senzora je da se primeni na realne probleme, te je na taj način validiran merenjem dielektrične permitivnosti jestivih ulja, što predstavlja tehniku otkrivanja kvaliteta i falsifikovanja ulja. U tu svrhu korišćeni su sledeći uzorci: palmino ulje (Palmino ulje za prženje, Dijamant, Zrenjanin, Srbija), suncokretovo ulje (Jestivo rafinisano ulje, Baš Baš, Zrenjanin, Srbija), ricinusovo ulje (Livsane, Novi Sad, Srbija), i maslinovo ulje (Cadel Monte, 100% italijansko ekstra devičansko maslinovo ulje). Pored uzoraka ulja dostupnih na tržištu, dodatna 4 uzorka su pripremljena mešanjem palminog i ricinusovog ulja, a njihove dielektrične permitivnosti izračunate prema formuli Kraševskog [71]:

$$\varepsilon_{rMIX} = (\sqrt{\varepsilon_{rp}}\nu_p + \sqrt{\varepsilon_{rc}}\nu_c)^2, \qquad (1.3.1)$$

gde ε_{rMIX} predstavlja dielektričnu permitivnost mešavine ulja, ε_{rp} i ε_{rc} dielektričnu permitivnost palminog i ricinusovog ulja, respektivno, a i v_p i v_c predstavljaju zapreminski udeo palminog i ricinusovog ulja u mešanim uzorcima. Vrednosti dielektrične permitivnosti korišćenih ulja i izračunate vrednosti za mešavine palminog i ricinusovog ulja za izmešane uzorke prikazani su u tabeli 1.2.

Uzorak	Dielektrična permitivnost	$\tan \delta$	Referenca
Palmino	1,8	0,03	[72]
Maslinovo	1,82	0,04	[73]
Suncokretovo	1,86	0,03	[74]
Ricinusovo	2	0,08	[75]
Izmešani uzorci	Dielektrična permitivnost	$tan \delta$	Zapreminski odnos mešanja
Uzorak 1	1,84	0,04	1:3,5
Uzorak 2	1,87	0,04	1:2
Uzorak 3	1,93	0,06	2:1
Uzorak 4	1,96	0,07	3,5 : 1

Tabela 1.2: Dielektrična permitivnost uzoraka ulja i uzoraka izmešanog palminog i ricinusovog ulja.

Na slikama 1.10a i 1.10b prikazani su simulirani i izmereni rezultati za uzorke čistog jestivog ulja i uzorke mešanih ulja, respektivno. Treba napomenuti da su simulirani rezultati dobijeni korišćenjem izračunatih dielektričnih permitivnosti u tabeli 1.2. Može se videti da su spektralne pozicije transmisionih nula pomerene ka nižim učestalostima za povećanje vrednosti dielektričnih permitivnosti uzoraka. Pored toga, može se uočiti dobro slaganje između rezultata simulacija i merenja, osim malog spektralnog pomeranja i većih gubitaka, gde se poslednji mogu pripisati gubicima u kablovima i konektorima i nesavršenosti postupka izrade. S obzirom na to da je spektralni pomak mali, uticaj gubitaka na performanse senzora nije velik.



Slika 1.10: (a) Rezultati eksperimenata i simulacija za uzorke jestivih ulja; (b) Rezultati eksperimenata i simulacija za uzorke izmešanog palminog i ricinusovog ulja, tabela 1.2; (c) Spektralne pozicije transmisionih nula za sve izmerene uzorke.

Izmereni rezultati potvrđuju da je predloženi senzor veoma osetljiv na male promene dielektrične permitivnosti uzorka. Rezultati su dodatno potvrđeni na slici 1.10c koja prikazuje zavisnost spektralnog položaja simuliranih i izmerenih nula od dielektrične permitivnosti uzoraka. I simulirani i izmereni rezultati imaju odlične linearne osobine $R^2 = 0,9971$ i $R^2 = 0,9802$, respektivno.

1.4 Diskusija i zaključak

U okviru prve glave doktorske disertacije realizovan je senzor na bazi dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona i time potvrđen senzorski potencijal ovog talasnog fenomena. Nova konfiguracija jedinične ćelije predložena je u cilju poboljšanja osetljivosti detekcije dielektrične permitivnosti, a optimizacija njenih dimenzija urađena u cilju unapređena linearnosti odziva senzora. Rezultati pokazuju da predloženi senzor ima potencijal za primenu u kontroli kvaliteta ulja jer je u stanju da razlikuje ulja sa razlikom dielektrične permitivnosti od 0,02. Zajedno sa brzom i jednostavnom procedurom proizvodnje, opisane karakteristike čine predloženi senzor odličnim kandidatom za detekciju malih promena dielektrične permitivnosti, ne samo za jestiva ulja, već i za druge tečne analite.

Da bi se dalje ilustrovale odlične performanse SSPP senzora, poređenje sa drugim senzorima za detekciju dielektrične permitivnosti u jestivim uljima prikazano je u tabeli 1.3. Predstavljeni rezultati pokazuju da opisani senzor predstavlja prvo rešenje za detekciju jestivog ulja zasnovano na SSPP fenomenu. U pogledu složenosti tehnologije izrade, treba napomenuti da je hibridni pristup za izradu senzora omogućio njegovu jednostavnu i brzu pripremu koja se može obaviti u nekoliko koraka i za nekoliko minuta. Štaviše, predloženi senzor koristi manje od 1 mL uzorka, što smanjuje količinu korišćenih uzoraka u poređenju sa senzorima koji se moraju uroniti u uzorak tokom testiranja. Dodatno, kao što je prikazano u rezultatima senzor obezbeđuje visoku osetljivost. Iako strukture senzora u radovima [14, 27] imaju bolju osetljivost, zahtevaju složenije procedure proizvodnje s obzirom na to da su im radne učestalosti u opsegu desetina GHz, što posledično zahteva realizaciju manjih struktura, kompleksniju izradu i skuplju opremu. Štaviše, struktura u [27] nije eksperimentalno potvrđena. Pored toga, predloženi senzor ima odličnu linearnost, koja nadmašuje linearnost drugih rešenja. Rezultati ovih istraživanja publikovani su u okviru rada u načnom časopisu i na međunarodnoj konferenciji.

Tabela 1.3: Poređenje predloženog SSPP senzora za	a merenje dielektrične permitivn	osti sa drugim predloženim rešenjima u
karakterizaciji ulja u pogledu principa de	etekcije, zapremine uzorka, oset	jivosti i kompleksnosti izrade.

Primena	Dizajn	Tehnologija	Kompleksnost	Zapremina	Osetljivost	Radna	Ref.
			tehnologije	uzorka (mL)	(MHz/ε_r)	učestalost	
Detekcija falsifikata	Dvostruki komple-	РСВ	Srednje	Uronjen	1133	11,56 GHz	[14]
	mentarni SRR						
Karakterizacija ulja	Metamaterijal -	Dizajnirano	Srednje	Proc. 0,01	1120	30 GHz	[27]
za kuvanje	SRR						
Određivanje vreme-	Transmisiona linija	РСВ	Srednje	Uronjen	Proc. 243	5,45 GHz	[28]
na prženja	- senzor 1						
Određivanje vreme-	Transmisiona linija	РСВ	Srednje	Uronjen	Proc. 270	5,45 GHz	[28]
na prženja	- senzor 2						
Identifikacija jestivih	Meta-površinski	РСВ	Srednje	Proc. <1	500	9,887 GHz	[29]
ulja	apsorber						
Detekcija falsifikata	EBG-inspirisani	PDMS	Visoka	0,8	205,1	2,592 GHz	[30]
	peč rezonator						
Dielektrična karakte-	Dvostruki SRR	РСВ	Srednje	Uronjen	74,37	1,85 GHz	[19]
rizacija							
Predloženi senzor	SSPP	Hibridno	Jednostavno	0,8	850	6,32 GHz	[11]

Glava 2

LOC platforma kao mikrobioreaktor sa integrisanim impedansnim senzorom za monitoring rasta ćelija

Pri proučavanju složenih velikih sistema često se koristi strategija smanjivanja razmere (engl. scale down approach), gde se veličina i složenost sistema smanjuju dok se značajni fizičko-hemijski procesi u sistemu zadržavaju. Ovaj pristup omogućava razvoj i optimizaciju kompleksnih makroprocesa i njihovo dublje razumevanje, s obzirom na to da je broj parametara i promenljivih značajno smanjen u mikrookruženju. Pored toga, ovaj pristup smanjuje potrebu za skupom i velikom opremom, smanjuje količinu korišćenih reagenasa i materijala i omogućava lakšu kontrolu procesnih parametara [76, 77]. Korišćenje pristupa smanjenih razmera, posebno mikrofluidičnih platformi integrisanih sa različitim senzorskim tehnologijama može biti veoma korisno za različite bioprocese kako bi se rešili problemi koji nastaju povećanjem dimenzija sistema [78–80]. Mikrofluidika omogućava manipulaciju malim količinama tečnosti reda mikrolitara u mreži specifično dizajniranih mikrokanala imitirajući složene makroprocese kao što su mešanje tečnosti, separaciju čestica, itd. Integracija senzora u mikrofluidične platforme dovela je do razvoja koncepta LOC [81, 82] i organ-na-čipu [83, 84], koji mogu simulirati složene biološke sisteme u kontrolisanom okruženju. Ove platforme pokazale su potencijal da unesu velike izmene u polja medicine i biotehnologije omogućavajući brzo i precizno testiranje lekova i medicinskih tretmana i analiza, kao i u boljem razumevanju funkcionisanja bioloških sistema.

U okviru doktorske disertacije pomenuti pristup iskorišćen je za realizaciju LOC platforme sa mikrobioreaktorom za kultivaciju ćelija i integrisanim impedansnim senzorom za praćenje rasta ćelija. Impedansni senzor sa interdigitalnim dizajnom elektroda realizovan je inkdžet štampom i integrisan u LOC platformu, odnosno simulator smanjenih razmera bioreaktora. Predloženi metod, integrisan u jednostavan minijaturizovani LOC sistem, pokazuje potencijal za primenu u različitim istraživanjima kao što su organ-na-čipu, za testiranje lekova i ispitivanje ćelija i tkiva, optimizaciju sistema kultivisanog mesa i sl. Potencijal predložene platforme sa integrisanim impedansnim senzorom testiran je na MRC-5 ćelijama, koje su korišćene kao model adherentnih ćelija sisara. Predloženi senzor precizno je detektovao sve faze rasta ćelija tokom perioda kultivacije od 96 h sa ograničenim hranljivim materijama. Kombinovanjem rezultata impedansnog merenja sa tehnikama obrade mikroskopskih slika tokom rasta ćelija, razvijen je novi pristup za praćenje biomase u realnom vremenu uz naprednu kontrolu praćenja rasta ćelija u mikrobioreaktorima.

U teorijskom uvodu biće opisan princip rada impedansnog senzora, kao i dielektrične osobine bioloških materijala biće opisane za različite opsege učestalosti u cilju razumevanja principa detekcije. U eksperimentalnom delu, rezultati izmerene impedanse biće upoređeni sa rezultatima predloženog modela ekvivalentnog električnog kola koje opisuje ponašanje senzora, kao i rezultatima obrade mikroskopskih slika u cilju procene biomase unutar LOC platforme.

2.1 Pregled relevantnih istraživanja

Pristup smanjenih razmera posebno je relevantan za istraživanja u oblasti kultivisanog mesa, koje se smatra održivom alternativom tradicionalnoj proizvodnji mesa, zbog svog potencijala za etičan i održiv bioproces zasnovan na kultivaciji ćelija i tehnikama tkivnog inženjeringa. Kultivisano meso potencijalno nudi rešenja za velike probleme u tradicionalnim metodama proizvodnje mesa [85]. Tradicionalna poljoprivreda ima ogroman uticaj na zagađenje [86] i klimatske promene [87], dok se istovremeno suočava sa izazovima primene antibiotika i fungicida, kao i sa patogenima i bolestima u sistemima stočarske proizvodnje [88]. Iz tog razloga proizvodnja kultivisanog/laboratorijski uzgojenog mesa ima ogroman potencijal da ublaži sve navedene probleme vezane za konvencionalnu proizvodnju mesa. Proizvodnja mesa u velikim razmerama posebno je važna jer su Ujedinjene nacije predvidele da će porast stanovništva dostići 10 milijardi ljudi u narednih 30 godina, što će rezultirati povećanom potražnjom za hranom za više od 70% [89]. Potencijal ove oblasti već je prepoznat u svetskim okvirima imajući u vidu da je EFSA1 donela određene regulative i da su pojedine zemlje već usvojile regulative za proizovodnju i distribucije proizvoda od kultivisanog mesa [90]. Međutim, proces proizvodnje kultivisanog mesa je i dalje veoma skup, pa je smanjenje troškova proizvodnje jedan od glavnih prioriteta i atraktivnih oblasti istraživanja. U tom smislu, senzori mogu biti od posebne pomoći u proizvodnoj skali jer omogućavaju poboljšanu kontrolu u procesu i ponovnu optimizaciju procesa kultivacije, uštedu na korišćenju medijuma za kultivaciju i snižavanje ukupne cene bioprocesa. U literaturi su predložena različita senzorska rešenja za praćenje relevantnih parametara rasta ćelija u bioreaktoru [91, 92].

Biomasa jedan je od najvažnijih parametara za praćenje tokom kultivacije ćelija

¹European Food Safety Authority

u bioreaktorima jer direktno opisuje prirast rasta ćelija. Mnoge neinvazivne tehnike zasnovane na brojanju ćelija hemocitometrima [93], bliskoj infracrvenoj spektroskopiji [94] i dielektričnoj spektrometriji [95] predložene su za praćenje biomase. Pored prethodno navedenih tehnika, koje se smatraju tehnikama direktnog monitoringa, predložene su i indirektne metode zasnovane na merenju koncentracije glukoze i laktata [96], oslobođenih gasova tokom bioprocesa [97] i promene redoks potencijala [98]. Sva navedena rešenja imaju svoje nedostatke, a njihova integracija u bioreaktore je i dalje izazovan zadatak za komercijalne primene.

Impedansni princip detekcije rasta ćelija pokazao je obećavajući potencijal za praćenje biomase korišćenjem naizmenične struje (AC) u radio-frekventnom opsegu [99, 100]. Naime, dielektrična svojstva ćelija zavise od učestalosti primenjenog polja. Kao heterogene strukture, ćelije su sačinjene od izolacionih membrana i okružene provodnom citoplazmom, kao i provodnim medijumom za kultivaciju. Drugim rečima, ćelije se mogu posmatrati kao mali kondenzatori, pa se njihova kapacitivna svojstva mogu koristiti za praćenje rasta tokom vremena. Pored toga, impedansa, kao kompleksna veličina, sadrži informacije o provodnim osobinama sistema za kultivisanje (koji obuhvata ćelije sa medijumom za kultivaciju) i informacije o kapacitivnim svojstvima sistema za kultivaciju kroz realne i imaginarne delove, respektivno. Ove informacije iskorišćene su za izračunavanje karakteristika kao što su vijabilnost ćelija, proliferacija i adhezija ćelija na podlogu [101–105]. Nedavne studije pokazale su da je ovaj pristup efikasan i u 2D i 3D sistemima kultivisanja ćelija, odnosno i za adherentne ćelije u monoslojevima i za slobodno plutajuće ćelije u suspenzijama [106]. Shodno tome, impedansni metod postao je koristan pristup u brojnim biološkim oblastima, uključući testiranje lekova, ispitivanje kretanja ćelija i tkivnog inženjeringa [102, 107–109].

2.2 Teorijski uvod

2.2.1 Kriva disperzije bioloških materijala

Generalno, pojava disperzije u različitim opsezima učestalosti može se razmatrati na osnovu orijentacije dipola i kretanja nosilaca naelektrisanja. Na nižim učestalostima, dipoli se lako orijentišu u pravcu primenjenog polja, dok nosioci naelektrisanja na svom putu imaju veliku verovatnoću za zahvatanje u nekom od defekata materijala ili na unutrašnjim razdelnim površinama. Iz tih razloga, na nižim učestalostima karakteristična je velika vrednost dielektrične permitivnosti i mala vrednost provodljivosti. Sa porastom učestalosti, smanjuje se sposobnost dipola da isprate promene u električnom polju i polarizacija opada. S druge strane, nosioci naelektrisanja prelaze kraće razdaljine unutar materijala i verovatnoća za njihovo rasipanje se smanjuje. Iz tih razloga, sa porastom učestalosti, permitivnost opada, a provodljivost u materijalu raste.

U heterogenim materijalima, kao što su biološki, dolazi do pojave nekoliko celina na krivoj disperzije, slika 2.1. Opadajuće, stepeničaste promene u dielektričnoj permitivnosti sa porastom učestalosti, određuju 4 oblasti (α , β , γ , i δ) i posledica su različitih mehanizama polarizacije koji rezultiraju dielektričnom relaksacijom na određenoj učestalosti. Od nižih ka višim učestalostima dominantne su migraciona relaksacija, zatim orijentaciona (dipolna), jonska i elektronska polarizacija, respektivno. Na nižim učestalostima (10 Hz - 10 kHz) α disperzija nastaje usred tangencijalnog toka nosilaca naelektrisanja po površini.

U opsegu učestalosti (10 kHz - 10 MHz) dešava se nagomilavanje naelektrisanja na ćelijskoj membrani usred različitih vremena relaksacije nosilaca naelektrisanja, tj. Maksvel-Vagnerovog efekta na razdelnoj površini ćelijske membrane. Ova oblast učestalosti naziva se β disperzija. Dodatni doprinos β disperziji daje i polarizacija proteina i drugih organskih makromolekula. Osobine biosistema u ovom opsegu učestalosti pogodne su za detekciju brojnosti ćelija unutar sistema jer se ćelije ponašaju kao dipoli i ovaj princip biće iskorišćen u predlogu senzora za biomasu, što će detaljnije biti opisano u nastavku.

Opseg učestalosti 0,1 - 5 GHz odgovara δ disperziji, koja se iskazuje kod nekih proteinskih rastvora i neće biti predmet istraživanja doktorske disertacije. Konačno, na učestalostima iznad 0,1 GHz EM talasi prolaze kroz ćelijsku membranu i interaguju direktno sa unutarćelijskim sadržajem. U ovom opsegu učestalosti dešava se relaksacija molekula vode, što dovodi do γ disperzije, i ne mogu se detektovati doprinosi pojedinačnih ćelija signalu zbog doprinosa koji potiče od molekula vode i unutarćelijskog sadržaja [100, 110, 111]. Iz tog razloga za detekciju primenom impedanse ispitane su učestalosti u oblastima α i β disperzije za detekciju rasta ćelija unutar mikrobioreaktora.



Slika 2.1: Kriva disperzije bioloških materijala.

2.2.2 Princip detekcije impedansnog senzora

Kao heterogene strukture, biološki materijal ispoljava i provodne i dielektrične osobine u primenjenom AC polju. Ponašanje ovih sistema opisano je veličinama kao što su dielektrična permitivnost i provodljivost, koje su funkcije primenjene učestalosti i imaju karakteristike disperzije. Predloženi impedansni pristup za praćenje rasta ćelija zasniva se na promeni dielektrične permitivnosti medijuma sa ćelijama sa povećanjem brojnosti ćelija. Kao što je opisano u poglavlju 2.2.1, osetljivost detekcije zavisi od opsega učestalosti koji se koristi za merenja i u okviru istraživanja ispitana je osetljivost detekcije impedansnog senzora za učestalosti u oblasti α i β disperzije.

Naime, građa ćelijske membrane određuje kapacitivne osobine samih ćelija zbog mogućnosti akumulacije naelektrisanja u naizmeničnom polju. Pored kapacitivnih svojstava, ćelije pokazuju i visok otpor za jednosmernu struju (DC) i niskofrekventnu naizmeničnu struju. Zbog toga je opseg učestalosti do 100 kHz pogodan za očitavanje biomase, jer se na površini membrane nakupljaju naelektrisanja, a ćelije se ponašaju kao dipoli. Sistem ćelija u medijumu može se posmatrati kao kolekcija sferičnih kondenzatora, a kapacitivnost sistema raste sa povećanjem broja ćelija. Impedansni pristup pogodan je za praćenje rasta ćelija, jer samo žive ćelije poseduju prethodno opisane osobine zahvaljujući ćelijskoj membrani koja omogućava razdvajanje naelektrisanja. Pomenute kapacitivne osobine detektabilne su merenjem impedanse i taj princip je iskorišćen za pračenje rasta ćelija unutar LOC platforme.

Predložena platforma napravljenja je iz nekoliko delova: staklena podloga koristi se kao podloga na kojoj se realizuje senzor, na koji je nadograđena mikrofluidična komora sa ćelijama. U predloženom LOC sistemu, staklo prekriveno SU-8 rezistom predstavlja podlogu za kultivaciju ćelija, slika 2.2a. Sloj SU-8 rezista nanesen je na impedansni senzor u cilju sprečavanja direktnog kontakta između senzora i ćelija u cilju detekcije samo kapacitivnih svojstava merenog sistema. Model adherentnih ćelija, MRC-5, korišćen u eksperimentima, lepi se za podlogu, raste u jednoj ravni i iz tog razloga predstavljen je kao monosloj na slici 2.2a. Iznad sloja ćelija, komoru za kultivaciju ispunjava medijum, koji obezbeđuje hranljive materije za rast ćelija u toku kultivacije.

U predloženom sistemu, imaginarni deo impedanse je dominantan u ukupnoj impedansi i odražava broj ćelija u sistemu, dok realni deo oslikava električnu provodljivost medijuma i ćelija. Predloženi sistem sa integrisanim senzorom može se posmatrati kao skup sferičnih kondenzatora, gde se kapacitivnost svakog sloja može odrediti na osnovu njihovih dielektričnih svojstava i rastojanja od površine senzora, slike 2.2a i 2.2b. Ukupna kapacitivnost zavisi od svojstava korišćenih materijala (staklo, SU-8, kao i ćelije i medijum). S obzirom na to su svi ostali parametri u sistemu konstantni, imaginarni deo impedanse određen je koncentracijom ćelija. Sa druge strane, realni deo impedanse, koji je povezan sa električnom provodljivošću medijuma oko senzora, može pružiti informacije o promenama u medijumu oko senzora, kao što su prisustvo jona ili promene u jonskoj jačini rastvora.



Slika 2.2: (a) Šematski prikaz poprečnog preseka LOC platforme; (b) Ekvivalentno električno kolo kapacitivnosti slojevite strukture LOC platforme sa ćelijama.

2.3 Realizacija LOC platforme za monitoring rasta ćelija

2.3.1 Struktura LOC platforme

Za izradu višeslojne LOC platforme korišćeni su transparentni i biokompatibilni materijali - staklo i poli(metil metakrilat) - PMMA (Oracal Polikarbonati, Srbija). Impedansni senzor realizovan je u formi interdigitalnih elektroda, ištampanih na staklu debljine 2 mm. Za štampanje senzora korišćeno je mastilo sa 15% srebrnih nanočestica (Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgija). Senzor i staklo, prekriveni su SU-8 3000 rezistom debljine 8 µm (Micro Chem, Ujedinjeno Kraljevstvo). Gornji i srednji slojevi senzora izrađeni su u PMMA pločama debljine 2 mm, dok su konekcioni slojevi izrađeni u 3M dvostrano lepljivoj traci (3M[™] GPT-020F, St. Paul, MN 55144-1000, Minneapolis, MN, USA).

Višeslojna struktura predložene mikrofluidične platforme prikazana je na slici 2.3. Predložena platforma sadrži mikrobioreaktor i impedansni senzor integrisane u kompaktni, multifunkcionalni čip koji se sastoji od nekoliko različitih slojeva realizovanih korišćenjem tehnologije laserskog mikromašinstva. Kao što je spomenuto u sekciji 2.2.2, staklo (sloj 5) se koristi kao podloga za impedansni senzor koji je realizovan primenom inkdžet štampe. Dizajn predloženog senzora ima oblik interdigitalnog kondenzatora, a njegova struktura optimizovana je parametrima inkdžet štampanja kako bi se dobila dobra rezolucija štampanog sloja. Prethodna istraživanja koriste SU-8 rezist u različitim biomedicinskim primenama zbog njegove dobre biokompatibilnosti i optičke transparentnosti [112, 113]. Iz tog razloga sloj SU-8 rezista iskorišćen je za pokrivanje interdigitalnih elektroda i nanesen je primenom Dr Blade tehnike [114]. Zbog neprovodnih osobina filma SU-8 omogućena je detekcija kapacitivnih svojstava merenog sistema.

Komora mikrobioreaktora za uzgajanje ćelija ima zapreminu od 1,5 mL i realizovana je u srednjem sloju (sloj 3) koji sadrži ulazne i izlazne otvore i komoru sa zaobljenim dizajnom ivica kako bi se sprečilo stvaranje vazdušnih mehura unutar čipa. Komora je zatvorena sa gornje strane (sloj 1) i donje strane (sloj 5), gde su otvori za ulaz i izlaz poravnati sa slojem 1. Impedansni senzor poravnat je kako bi se uklopio u komoru, dok se veza sa senzorom obezbeđuje pomoću konekcionih prstiju koji se nalaze van komore. Veza između slojeva omogućena je sa dva međusobno povezana sloja, 2 i 4, koji su realizovani u istom dizajnu kao sloj 3.



Slika 2.3: Višeslojna struktura mikrofluidične platforme sa dimenzijama u mm.

2.3.2 Priprema MRC-5 ćelija za kultivaciju unutar LOC platforme

Pre zasejavanja u mikrobioreaktorsku platformu, ćelije MRC-5 (humani fibroblasti ATCC CCL-171) uzgajane su u standardnim bocama za tkivo (Costar, 25 cm²) u ćelijskom medijumu (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa 4500 mg/L glukoze, dopunjene sa 10% fetalnim goveđim serumom i 1% serum rastvor antibiotika/antimikotika (Sigma-Aldrich). Ćelije su zasejane u koncentraciji od 0,7×10⁶ ćelija, inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 100% vlažnosti sa 5% CO₂ u CO₂ inkubatoru (ICO50, MEMMERT, Schvabach, Nemačka) i pasažirane dva puta nedeljno. Za zasejavanje ćelija u mikrobioreaktor, čelije u t25 flaskovima su tripsinizirane korišćenjem 0,25% tripsin-EDTA (Serva, Nemačka), prebrojane i zasejane u koncentraciji od 50.000 ćelija/mL. Za kultivaciju unutar mikrobiorektora korišćen je i DMEM sa glukozom, fetalnim goveđim serumom i antibiotikom/antimikotikom.

2.3.3 Karakterizacija senzora i rezultati merenja impedanse

Slika 2.4a predstavlja impedansni senzor realizovan tehnikom inkdžet štampe sa interdigitalnim dizajnom elektroda na staklu, pre integracije u mikrofluidičnu plaftormu. Karakterizacija realizovanog interdigitalnog dizajna urađena je profilometrom i skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), slike 2.4b i 2.4c. Prednost inkdžet štampanja ogleda se u mogućnosti realizacije oštrih i glatkih ivica, kao što se može videti na slikama profilometra, slika 2.4b. S druge strane, slike skenirajućeg elektronskog mikroskopa daju dodatne informacije o defektima štampanog sloja na mikroskali, što može uticati na performanse senzora. Na slici 2.4c pored sastava i granulaste strukture napravljene od nanočestica srebra, SEM slika prikazuje da površina senzora nema oštećenja i da postoji uniformnost štampanog sloja. Pre upotrebe, senzor je očišćen sa izopropanolom pre integracije u mikrofluidičnu platformu.

Merenja impedanse odrađena su potenciostatom (PalmSens4, Holandija), smeštenim u CO₂ inkubator, povezanim preko Bluetooth-a sa računarom i softverom PSTrace 5.8. Na ovaj način izbegnuto je pomeranje mikrobioreaktora iz inkubatora i potencijalna kontaminacija ćelija i ćelijskog medijuma, slika 2.4d.



Slika 2.4: (a) Inkdžet štampani impedansni senzor na staklu; (b) Slika sa profilometra inkdžet štampanih elektroda; (c) SEM slika inkdžet štampanih elektroda pri uvećanju × 3000; (d) Postavka eksperimenta. Portabilni potenciostat PalmSens smešten je unutar CO₂ inkubatora zajedno sa mikrobioreaktorom sa impedansnim senzorom.

Slika 2.5 predstavlja rezultate merenja impedansnog senzora tokom 96 h kultivacije MRC-5 ćelija na tri različite učestalosti u opsegu 5 kHz - 100 kHz. U toku prva 2 h kultivacije ćelija, usled lepljenja ćelija na površinu senzora može se videti nagli pad u modulu i imaginarnom delu impedanse. Dalje analiza rezultata zavisi od analizirane učestalosti na kojoj se posmatraju rezultati merenja senzora, usled različitog ponašanja biološkog materijala u različitim opsezima učestalosti. Naime, prema krivoj disperzije opisanoj u sekciji 2.2.1, u α fazi i opsegu učestalosti 10 Hz - 10 kHz, dešava se tangencijalni tok jona na površini ćelija. Rezultati na slici 2.5a na učestalosti od 10 kHz prikazuju da senzor može da prepozna rast ćelija unutar mikrobioreaktora bez mogućnosti da detektuje lag fazu rasta. Pored toga, stacionarna faza i faza odumiranja se ne mogu razlikovati. S druge strane, na većim učestalostima, koje odgovaraju β fazi krive disperzije, dešava se nagomilavanje naelektrisanja na ćelijskoj membrani. Ova

osobina omogućava detekciju ćelija unutar plafrome i praćenje njihovog rasta u toku vremena. Slika 2.5b i 2.5c prikazuje izmerene rezultate na 50 kHz i 90 kHz u toku 96 h kultivacije, respektivno. U ovom opsegu učestalosti, senzor može da detektuje različite faze rasta ćelija: pad i lepljenje na površinu senzora, lag fazu, eksponencijalnu fazu, stacionarnu fazu i fazu odumiranja. Rezultati, međutim, pokazuju da je promena impedanse kvantitativno veća na 50 kHz u poređenju sa 90 kHz, indukujući blagi porast dielektrične permitivnosti ćelija do 100 kHz, kao što je prethodno opisano u poglavlju 2.2.1, slika 2.1. Konačno, zbog ograničenih nutrijenata dostupnih za rast ćelija, nakon 60 h kultivacije, faza odumiranja počinje. Mrtve ćelije se odlepljuju sa površine tokom faze odumiranja, rezultujući porastom impedanse u merenjima senzora. Na kraju faze odumiranja, raspad ćelija dovodi do blagog porasta impedanse.

Nakon 96 h kultivacije, kontrolna merenja impedanse svežeg medijuma i korišćenog medijuma urađena su radi utvrđivanja doprinosa merenom signalu. Naime, rezultati na slici 2.5d prikazuju malu razliku u opsegu učestalosti 5 - 20 kHz između realnog dela svežeg medijuma i medijuma nakon kultivacije ćelija. Realni deo impedanse na slici 2.5d pokazuje veće vrednosti za medijum nakon kultivacije u poređenju sa svežim medijumom. Naime, tokom procesa kultivacije, ćelije koriste nutrijente iz medijuma (koji su elektroliti) i pretpostavlja se da se usled smanjenja nutrijenata u toku kultivacije dolazi do opadanja provodljivosti medijuma, tj. porasta realnog dela impedanse korišćenog medijuma. S druge strane, imaginarni deo impedanse ne pokazuje značajne promene između svežeg medijuma i medijuma nakon kultivacije ćelija. Na osnovu ovih rezultata, pretpostavlja se da doprinos signalu impedanse daju samo ćelije koje rastu na površini senzora, a ne zbog promene svojstava medijuma u toku kultivacije, posebno na većim učestalostima koje su se pokazale bolje za opisanu primenu.



Slika 2.5: Moduo impedanse (|Z|), realni (Re) i imaginarni (Im) deo impedanse na učestalostima: (a) 90, (b) 50, and (c) 10 kHz u toku 96 h kultivacije MRC-5 ćelija unutar mikrobioreaktora. Greške na graficima predstavljaju standardnu devijaciju izračunatu za 8 ponovljenih merenja. (d) Kontrolna merenja. Poređenje između svežeg i medijuma nakon kultivacije, tj. medijuma nakon 96 h kultivacije u pogledu modula impedanse, Re i Im dela.

2.4 Poređenje izmerenih rezultata, modela ekvivalentnog kola i rezultata obrade slike

2.4.1 Obrada mikroskopskih slika

U cilju procene koncentracije ćelija unutar mikrobioreaktora, procena pokrivenosti površine senzora ćelijama urađena je tehnikom obrade mikroskopskih slika (mikroskop Nikon ECLIPSE Ts2R). Kontrolni čip, izrađen je jednako kao i čip sa senzorom i korišćen za kultivaciju tokom 96 h. Da bi se dobila informacija o pokrivenosti površine mikroskopske slike ćelijama, delovi mikroskopskih slika prekrivenih ćelijama podvrgnuti su segmentaciji. Segmentacija slika sastoji se od tri ključna koraka: preprocesiranje, detekcija ivica, i postprocesiranje.

Preprocesing:

Mikroskopske slike prvo su konvertovane iz RGB u *grayscale* format. S obzirom na to da mikronečistoće postoje na slikama, neka vrsta filtriranja mora biti primenjena na način koji će smanjiti neželjene efekte i sačuvati važne karakteristike ćelija. Iz razloga korišćen je median filter [115], nelinearni filter za uklanjanje šuma, koji određuje nove vrednosti piksela izračunavanjem medijane unapred definisanog kernela susedstva. Ovi kerneli obično su $n \times n$ matrice koje okružuju piksel koji treba filtrirati, gde je n predefinisana dimenzija. U ovom istraživanju, veličina kernela postavljena je na n = 7. Ovaj tip filtera često se koristi kao korak preprocesiranja za algoritme detekcije ivica jer potiskuje šum, ali čuva ivice na slici. Nakon toga, histogramsko izjednačavanje primenjeno je na prefiltriranim slikama pomoću tzv. *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE)* [116], koji ispravlja kontrast i čini objekte od interesa različitim u odnosu na pozadinu.

Korak detekcije ivica:

Glavni deo predložene procedure segmentacije ćelija koristi *Canny* detektor ivica [117] koji se koristi za izdvajanje ivica iz preprocesiranih slika. Ovaj metod sastoji se od nekoliko koraka: filtriranja, izračunavanja gradijenta, potiskivanja nepotpunih ivica, dvostrukog pragovanja i praćenja ivica. Prvo, slike se filtriraju glatkim Gausovim filterom, a zatim se, koristeći *Sobel* operator [118], izračunava gradijent intenziteta. Zatim, potiskivanjem nepotpunih ivica, ivice se tanje tako što se potiskuju pikseli koji nisu na maksimalnoj jačini ivice u pravcu gradijenta. Dvostruko pragovanje ili Histeretsko pragovanje odlučuje koje su ivice jake, a koje nisu. Definišu se dve vrednosti praga, T_{max} i T_{min} . Ivice sa gradijentom intenziteta većim od T_{max} se deklarišu kao ivice, a one ispod T_{min} se odbacuju. Ivice koje se nalaze između ova dva praga se klasifikuju na osnovu njihove povezanosti. Ako su povezane sa pikselima koji su deklarisani kao jake ivice, smatraju se delom ivica. Inače, takođe se odbacuju. Na ovaj način, Canny detektor ivica postiže tanje i preciznije ivice.

Postprocesing korak:

Matematička morfologija iskorišćena je kao poslednji korak obrade slike. Generalno, konstruisanjem specijalnog strukturnog elementa/kernela kao što je disk ili krst, moguće je manipulisati i uticati na konačni oblik detektovanih ivica. Operacija dilatacije dodaje piksele graničnim pikselima pomoću strukturnog elementa, dok erozija smanjuje granične piksele na isti način [119]. Segmentacija mikroskopskih slika postignuta je korišćenjem višestrukih dilatacija i erozija. Rezultati u obliku procenta pokrivenosti na bioreaktoru su ekstrahovani deljenjem broja segmentiranih piksela ćelije i ukupnog broja piksela na mikroskopskim slikama pomnoženog sa 100. Za svaki snimak, tri slike u istom uvećanju snimljene su na tri nasumično odabrana mesta u mikrobioreaktoru, i srednja vrednost i standardna devijacija izračunati po stepenu. Na osnovu poznate početne koncentracije ćelija c_i i procenta SC za početnu koncentraciju izračunatu iz procesa snimanja (SC_i), procena koncentracije ćelija urađena je za mikroskopske slike tokom 96 h kultivacije (c_t). Povećanje koncentracije ćelije direktno je proporcionalno procentu SC u mikrobioreaktoru tokom vremena kultivacije (SC_t), izraz (1).

$$c_t = c_i \frac{SC_t}{SC_i} \tag{1}$$

Tabela 2.1 sadrži srednje vrednosti i standardne devijacije procenata pokrivenosti površine tokom 96 h kultivacije ćelija unutar LOC platforme. Pored toga, rezultati obrade slike iskorišćeni su za procenu broja ćelija unutar mikrobioreaktora na osnovu poznate početne koncentracije ćelija. Male vrednosti standardne devijacije procenata pokrivenosti površine ukazuju na to da ćelije formiraju uniforman monosloj na površini čipa s obzirom na to da su proračuni odrađeni na osnovu tri slike. Pored toga, pokrivenosti površine pokazuju rastući trend koji se nastavlja tokom lag faze, eksponencijalne i stacionarne faze, nakon čega rezultati obrade slike više ne odgovaraju impedansnim merenjima. Dodatno objašnjenje dato je u tabeli 2.2, koja sadrži segmentirane slike, gde je prikazano poređenje između neobrađene slike mikroskopa i segmentiranih slika u pozadini i prednjem planu, respektivno. Naime, kao posledica ograničenih hranljivih materija dostupnih za rast, posle 60 h kultivacije ćelije ulaze u fazu odumiranja. Nakon ove tačke, obrada slike postaje manje efikasna, najverovatnije zato što se mrtve ćelije odvajaju od površine i počinje proces razlaganja ćelija. U ovoj fazi, ćelijske membrane počinju da se razgrađuju i ćelije gube svoj strukturni integritet i funkciju, što dovodi do smrti čelije. Na kraju, samo ostaci ćelijskog materijala mogu se videti na slikama mikroskopa nakon 72, 84 i 90 h kultivacije, što je dovelo do lažne detekcije pokrivenosti površine.

Vreme (h)	Sr. vr. pokrivenosti površine (%)	St. dev. (%)	Procenjena konc. ćelija (ćelija/mL)
2	6,781	3×10^{-3}	5×10^{4}
12	15,592	5×10^{-3}	$1,2 \times 10^5$
24	25,73	5×10^{-2}	$1,9 \times 10^5$
36	25,64	7×10^{-2}	$1,9 \times 10^5$
48	31,88	5×10^{-2}	2,4×10 ⁵
60	31,86	5×10^{-2}	$2,4 \times 10^5$
72*	52,2	2×10^{-1}	3,8×10 ⁵
84*	15,6	1×10^{-1}	1,1×10 ⁵
90*	67,39	6×10^{-2}	$4,9 \times 10^5$

Tabela 2.1: Rezultati obrade mikroskopskih slika. Srednje vrednosti i standardne devijacije pokrivenosti površine senzora tokom 96 h kultivacije ćelija.

*faza odumiranja ćelija

2.4.2 Fitovanje rezultata ekvivalentnim električnim kolom

Rezultati merenja impedanse fitovani su ekvivalentnim električnim kolom korišćenjem program otvorenog koda pod imenom *EIS spectrum analyzer* [120]. Ukupna impedansa merenog sistema može se modelovati ekvivalentnim električnim kolom prikazanim na unutrašnjem grafiku slike 2.6a. Predloženi model sadrži elemente koji opisuju otpor ćelijskog medijuma R_{med}, otpor i kapacitet ćelija R_{ćelija} i C_{ćelija}, kao i otpor i kapacitet elektroda i drugih komponentata mikrofluidičnog sistema, R_{el} i C_{el} (sloja rezista, stakla itd.), respektivno.

Čelijski medijum je u najvećoj meri sačinjen od vode i jona i kao takav, provodan je. Pri modelovanju električnih osobina ćelija i njihove okoline, ćelijski medijum je pojednostavljeno predstavljen kao otpornik, R_{med} s obzirom na to da predstavlja putanju za struju između monosloja ćelija i elektroda. S obzirom na to da je kod paralelnog RC kola napon jednak na krajevima otpornika i kondenzatora, paralelno RC kolo iskorišćeno je za opisivanje monosloja ćelija i elektroda. U slučaju monosloja ćelija, RC kolo opisuje efektivan doprinos formiranog sloja ćelija, bez razmatranja specifičnog doprinosa pojedinačnih ćelija. Pored toga, RC kolo za opisivanje elektroda sadrži senzor izrađen tehnikom inkdžet štampe i dodatni tanki sloj filma SU-8 koji sprečava direktni kontakt između ćelija, podloge i PMMA. Predloženi model ekvivalentnog kola iskorišćen je za fitovanje eksperimentalnih rezultata, a kapacitet ćelijskoj monosloja $C_{ćelija}$ upoređen sa eksperimentalnim rezultatima, što će biti predstavljeno u nastavku.

Predloženi model upoređen je sa izmerenim rezultatima modula impedanse u inicijalnom trenutnku i nakon 24, 48 i 96 h kultivacije ćelija. Slika 2.6a pokazuje da predloženi model odgovara izmerenim rezultatima. Takođe, u predloženom modelu,

Tabela 2.2: Mikroskopske slike i proces obrade slike u cilju detekcije koncentracije ćelija u mikrobioreaktoru.

Vreme (h)	Mikroskop	Segmentacija pozadine	Segmentacija prednjeg plana
0			
2	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3		
12	and a state of the		
24	a de la de l	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A
36	and the states		
48	A CONTRACTOR		
60	12		
72			
84			
90			



Slika 2.6: (a) Poređenje rezultata merenja impedansnog senzora sa rezultatima fitovanja ekvivalentnim električnim kolom predstavljenim u unutrašnjosti grafika. (b) Poređenje kapaciteta ćelija iz fitovanog modela i procenta pokrivenosti površine senzora ćelija dobijena pomoću obrade mikroskopskih slika.

parametri vezani za elektrodu (R_{el} i C_{el}) mogu se smatrati konstantnim, s obzirom na to da elektrode nisu u kontaktu sa merenim sistemom i njihove osobine se ne menjaju tokom perioda kultivacije. Ključan parametar za opis rasta ćelija tokom vremena je kapacitivnost ćelija, $C_{ćelija}$, koja direktno oslikava rast ćelija u toku vremena, slika 2.6b. Ovaj parametar prikazuje sve faze rasta ćelija uključujući lag fazu, fazu eksponencijalnog rasta, stacionarnu i fazu odumiranja. Poređenjem rezultata dobijenih obradom slike i modelovanja, slika 2.6b pokazuje da oba metoda daju podjednak trend za prvih 60 h kultivacije ćelija, tj. do početka faze odumiranja. Nakon toga, impedansni model uspešno opisuje stanje ćelija, dok rezultati obrade ne odgovaraju odgovoru impedanse. Konačno, oba rešenja mogu biti nezavisno primenjena u kontinualnom monitoringu rasta ćelija u mikrofluidičnoj platformi.

2.5 Diskusija i zaključak

U okviru druge glave doktorske disertacije predstavljene su dve nove metode za monitoring rasta ćelija unutar minijaturizovanog LOC sistema za praćenje biomase tokom vremena, prva bazirana na merenju impedanse i druga na bazi obrade mikroskopskih slika. Kao što je opisano, realizovana je LOC platforma sa integrisanim impedansnim senzorom za praćenje rasta ćelija tokom vremena kultivacije. U cilju opisivanja i analize dobijenih rezultata, napravljen je model ekvivalentnog električnog kola.

Rezultati pokazuju da se metod obrade slike može koristiti za grubu procenu bio-

mase i daje dobre rezultate tokom procesa rasta ćelija, dok u slučaju odumiranja ćelija predloženi metod ne daje pouzdane rezultate. U slučaju većih bioreaktora, primena ove metode je limitirana zbog nepraktičnosti dobijanja slika bez dodatnih manipulacija ili uzorkovanja.

S druge strane, predloženo rešenje merenja impedanse predstavlja jedan od glavnih doprinosa ove disertacije i kao takav može se koristiti za detekciju svih faza rasta ćelija sa visokom pouzdanošću. Predloženi impedansni senzor može biti prilagođen i redizajniran za integraciju, kako u sisteme LOC i organa-na-čipu, tako i u različite komercijalne bioreaktore za monitoring biomase. S obzirom na to da predloženi impedansni senzor ima mogućnost detekcije svih faza rasta može naći primenu i u različitim biomedicinskim analizima na ćelijama i tkivima, testiranju lekova, itd.

Pored svih navedenih prednosti, LOC platforma je realizovana u isplativnoj i jednostavnoj tehnologiji, koja omogućava brzu izradu minijaturizovanih sistema, što otvara mogućnost za širok spektar primena u biotehnološkim i medicinskim istraživanjima. Rezultati ovih istražzivanja publikovani su u okviru rada u naučnom časopisu i predstavljeni na dve međunarodne konferencije.

Glava 3

Nove tehnologije realizacije elektrohemijskih biosenzora

Poslednjih godina, istraživanja u oblasti biosenzora nalaze veliko interesovanje kako nauke, tako i industrije zbog velike potrebe za specifičnim testovima za detekciju i analizu bioloških uzoraka. Posebnu ekspanziju biosenzori nalaze u brzim biomedicinskim testovima kao što su COVID 19 testovi, testovi za trudnoću, detekciju tumor biomarkera, ali svoju primenu sve više nalaze i u detekciji kvaliteta hrane, kontaminenata u vodi i zemljištu i sl. Tokom proteklih nekoliko godina, došlo je do značajnog napretka u razvoju novih biosenzora koji preuzimaju konvencionalne metode kao što su kolorimetrijski, fluorescentni, magnetni i elektrohemijski biosenzori [121–125]. Među različitim tipovima biosenzora, elektrohemijski biosenzori se izdvajaju kao vodeći kandidati zbog svoje podobnosti za primenu na terenu, izuzetne osetljivosti, selektivnosti, ekonomičnosti i pristupačnosti. Međutim, njihova komercijalizacija ostala je relativno ograničena zbog izazova proizvodnje zlatnih elektroda, koje su najčešće korišćene podloge za realizaciju elektrohemijskih senzora i zbog stabilnosti funkcionalizovanog sloja biomolekula.

Iako se većina biosenzora oslanja na kvalitativnu detekciju, kao daje informaciju da li je određeni bioelement prisutan u uzorku ili nije, često je neophodno i kvantitativno odrediti koncetracije i prisustvo specifičnih biomolekula u nekom uzorku, jer određene koncetracije mogu izazvati negativne efekte po ljudsko zdravlje. Elektrohemijski biosenzori imaju ogroman potencijal da unesu novine u način na koji se vrši dijagnostika bolesti, praćenje zdravstvenog stanja, ali i analize bioloških procesa. Razvojem elektrohemijskih biosenzora, otvara se mogućnost brze, specifične i visokoosetljive detekcije proteina, enzima, biomolekula, hormona ili genetičkih materijala, čak i u veoma niskim koncentracijama. Potencijalno tržište elektrohemijski senzori pronalaze u medicini, zaštiti živote sredine, bezbednosti hrane, farmaciji, itd. [126–129].

Iako postoji veliko potencijalno tržište za pomenute elektrohemijske biosenzore, i dalje postoji veliki broj izazova koje treba prevazići da bi se realizovali jeftini, portabilni i osetljivi sistemi. U okviru doktorske disertacije razvijena je nova tehnologija izrade zlatnih elektroda na bazi listića zlata. Predstavljena tehnologija prevazilazi postojeće tehnologije u pogledu jednostavnosti i ceni izrade elektroda. Takođe, usled velike hrapavosti površine realizovanih elektroda, pomenuta tehnologija daje veću specifičnu površinu za detekciju u poređenju sa drugim tehnologijama izrade. Na taj način, omogućena je veća osetljivost detekcije bez korišćenja dodatnih pojačavača signala ili nanomaterijala.

U ovom poglavlja biće dat teorijski uvod sa opisom procesa koji se dešavaju na razdelnoj površini elektrode i tečne faze, kao i opis elektrohemijskih tehnika korišćenih za detekciju kod realizovanih biosenzora. U okviru eksperimentalne sekcije biće predstavljena tehnologija izrade, karakterizacija realizovanih elektroda primenom tehnika skenirajuće elektronske mikroskopije, profilometrije, Raman spektroskopije, kontaktnog ugla i energetske disperzivne spektroskopije. Takođe, u okviru eksperimentalnog dela, biće ispitan uticaj geometrije i površinske strukture elektroda na elektrohemijski odziv. Značajan doprinos ove disertacije predstaljva i razvoj protokola za funkcionizaciju površine elektrode biomolekulima. Pored toga, predložene elektrode na bazi zlatnih listića biće upoređene sa komercijalnim sito-štampanim zlatnim elektrodama u pogledu potencijala za biosenzorske primene. Potencijalne primene predložene tehnologije izrade elektroda biće ispitane za biosenzorska rešenja, otvarajući mogućnost za jeftinu, osetljivu i brzu detekciju bakterija *E. coli, S.* Typhimurium i tumor biomarkera HER2.

3.1 Teorijski uvod

Elektrohemija je grana hemije koja se bavi proučavanjem interakcija između hemijskih supstanci i električne energije. Veliki deo ove oblasti bavi se proučavanjem hemijskih promena izazvanih prolaskom struje kroz uzorak, kao i proizvodnjom elektrona u hemijskim reakcijama. Elektrohemija obuhvata niz različitih pojava (kao što su elektroforeza i korozija), uređaja (kao što su senzori, biosenzori, baterije i gorivne ćelije) i tehnologija (kao što su elektrodepozicija metala i masovna proizvodnja aluminijuma i hlora) [130–132].

Oblast elektrohemije koja proučava prenos elektrona u hemijskoj reakciji između elektrode i reagujućih molekula, najčešće u tečnoj fazi, naziva se dinamička elektrohemija. Dinamička elektrohemija opisuje procese koji se odigravaju na razdelnoj površini između tečne faze i metalne elektrode, što je ujedno i interesna oblast za detekciju kod elektrohemijskih biosenzora. Pomenuti procesi na površini elektrode zavise od velikog broja parametara, kao što su opseg potencijala, transportni procesi između rastvora i elektrode, reaktivnost rastvora, priroda površine elektrode, kao i struktura razdelne površine rastvora i elektrode [133].

U narednim poglavljima biće opisani elektrohemijski procesi koji se odvijaju na

razdelnoj površini između elektrode i tečne faze. Ovaj opis obuhvata kako Faradejeve tako i nefaradejeve procese, uz dodatno objašnjenje dvojnog sloja na razdelnoj površini elektrode i tečne faze. Tehnike ciklične voltametrije, elektrohemijske impedansne spektroskopije i hronoamperometrije biće opisane teorijski, a u okviru eksperimentalnog dela i primenjene za karakterizaciju površine elektrode i detekciju bakterija *E. coli, S.* Typhimurium i tumor biomarkera HER2.

3.1.1 Elektrohemijski procesi na površini elektrode

Elektrohemijska ćelija podrazumeva troelektrodni sistem, koji uključuje radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu. Radna elektroda je mesto gde se dešavaju elektrohemijski procesi i predstavlja glavni deo elektrohemijske ćelije. Kod biosenzorskih sistema, radna elektroda je funkcionalizovana bioprepoznatljivim elementom i omogućava specifičnu detekciju željene komponente u tečnoj fazi. Referentna elektroda obezbeđuje konstantan potencijal u odnosu na koji se meri potencijal radne elektrode, dok pomoćna elektroda omogućava zatvaranje električnog kola. Produkti elektrohemijske reakcije na površini elektrode su elektroni, koji se usmeravaju i razmenjuju između potenciostata i elektrode kontrolom potencijala pomoću potenciostata.

Ključni koncepti u elektrohemiji koji opisuju na koji način električne struje utiču na elektrohemijske reakcije na elektrodama opisani su Faradejevim i nefaradejevim procesima. Ovi procesi su od suštinskog značaja za razumevanje elektrohemijskih sistema i igraju ključnu ulogu u mnogim tehničkim i naučnim primenama. Faradejevi zakoni pružaju kvantitativni okvir za analizu elektrohemijskih reakcija, dok nefaradejevi procesi igraju ključnu ulogu u optimizaciji brzine i efikasnosti ovih reakcija.

Faradejevi procesi

Pod Faradejevim procesima podrazumevaju se elektrohemijske reakcije koje direktno učestvuju u prenosu naelektrisanja između tečne faze i elektrode. Ovi procesi nazvani su po britanskom naučniku Majklu Faradeju, koji je prvi put istražio proces elektrolize i elektrohemijske reakcije sredinom 19. veka. Faradejevi zakoni opisuju kvantitativnu vezu između količine hemijske supstance koja se menja tokom elektrohemijske reakcije i količine naelektrisanja koje protekne kroz elektrolit.

Faradejeva elektroliza se odnosi na proces gde se elektrohemijska reakcija dešava primenom potencijala na elektrodu uronjenu u elektrolit, gde se prenos naelektrisanja omogućava putem jona u rastvoru. Na anodi se obično dešava oksidacija (gubitak elektrona), dok se na katodi odvija redukcija (dobijanje elektrona). Količina supstance koja se menja tokom elektrolize proporcionalna je količini prenetih elektrona i može se izračunati prema Faradejevim zakonima [132, 133]. Princip merenja elektrohemijskih biosenzora zasniva se na detekciji elektrona koji su izgenerisani u Faradejevim procesima na razdelnoj površini metala i tečne faze. Naime, za karakterizaciju radne elektrode biosenzora uglavnom se koristi redoks par, koji se u elektrohemijskom procesu oksiduje i redukuje pod dejstvom potencijala. U tom procesu dolazi do razmene elektrona sa potenciostatom i omogućena je kvantifikacija dostupnosti centara interakcije na površini elektrode za oksido-redukcionu reakciju. Na taj način opisuje se "zauzetost" površine elektrode sa prethodno detektovanim komponentama. Za detekciju elektrona dobijenih kao produkt hemijske reakcije, koriste se različite elektrohemijske tehnike, što će detaljnije biti opisano u nastavku.

Nefaradejevi procesi

Nefaradejevi procesi su elektrohemijske reakcije koje ne učestvuju direktno u prenosu naelektrisanja, već utiču na brzinu i efikasnost Faradejevih procesa. Ovi procesi se odvijaju na elektrodama i mogu uključivati adsorpciju/desorpciju jona i molekula, promene površinske strukture elektrode i stvaranje difuzionog sloja na elektrodi.

Jedan od ključnih nefaradejevih procesa je adsorpcija i desorpcija jona ili molekula na površini elektrode. Adsorpcija se odnosi na prijanjanje hemijskih komponenata na površinu elektrode, dok desorpcija predstavlja njihovo oslobađanje. Ovi procesi mogu značajno uticati na brzinu faradejevih reakcija, jer promene površinske pokrivenosti mogu otežati ili ubrzati reakcije. Nefaradejevi procesi takođe uključuju stvaranje difuzionog sloja oko elektrode. Ovaj sloj se formira usled razlike u koncentraciji jona na površini elektrode i u elektrolitu, što može usporiti brzinu hemijske reakcije. Takođe, kod nefaradejevih procesa ne dolazi do razmene elektrona sa elektrodom [132, 133].

Pri elektrohemijskoj detekciji u slučaju biosenzora, Faradejevi procesi oksidacije i redukcije redoks para omogućavaju praćenje zauzetosti površine detekovanim uzorkom. S druge strane, nefaradejevi procesi ne učestvuju direktno u izmerenom signalu (jer nema razmene elektrona sa elektrodom), ali se njihov doprinos može detektovati u vidu skladištenja naelektrisanja na površini elektrode.

U nastavku poglavlja biće opisan potencijal na razdelnoj površini elektrode, kao i formiranje dvojnog sloja usled različito naelektrisanih jona koji postoje u elektrohemijskim sistemima.

3.1.2 Potencijal na razdelnoj površini elektrode i tečne faze

Potencijal na razdelnoj površini između elektrode i tečne faze opisuje interakciju i reaktivnost elektrode i uzorka. Ima značajan uticaj na brzinu elektrohemijskih reakcija, adsorpciju specifičnih molekula i jona na površini elektrode, kao i na promene u hemijskom sastavu elektrolita u blizini elektrode. Odnos između električnog potencijala, koncentracije jona i temperature u elektrohemijskim reakcijama opisuje Nernstova¹ jednačina, predstavljena izrazom (3.1.1). Iz izraza (3.1.1) vidi se da potencijal elektrode zavisi od koncentracije jona u rastvoru i može biti pozitivan ili negativan. Na osnovu Nernstove jednačine omogućeno je izračunavanje električnog potencijala elektrode za različite koncentracije oksidovanih (cc_{ox}) i redukovanih (cc_{red}) jona na različitim temperaturama. Takođe, korisna je za proučavanje ravnotežnih stanja u elektrohemijskim ćelijama i određivanje promena potencijala tokom elektrohemijskih reakcija. U izrazu (3.1.1) *E* predstavlja električni potencijal elektrode za jediničnu koncentraciju jona, *R* gasnu konstantu, *T* temperaturu, a *F* Faradejevu konstantu.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nf} \ln \frac{cc_{ox}}{cc_{red}}$$
(3.1.1)

Prethodni izraz opisuje elektrohemijske reakcije na površini elektrode pri promeni potencijala. Naime, ako se promeni potencijal elektrode, rastvor koji je u kontaktu sa elektrodom mora imati koncentracioni odnos aktivnih oksidovanih i redukovanih jona, kako je naznačeno u Nernstovoj jednačini, odnosno mora doći do elektrohemijske reakcije. Iz tog razloga Nernstova jednačina predstavlja jednu od osnovih jednačina za razumevanje elektrohemijskih procesa na površini elektrode [133].

Formiranje dvojnog sloja na površini elektrode

Kada se uspostavi ravnoteža na površini elektrode, na razdelnoj površini elektrode i tečne faze postoji elektrostatička sila između elektrode i nosilaca naelektrisanja, koja formira odvajanje pozitivnih i negativnih nosilaca naelektrisanja. U ovakvom sistemu postoje i Braunovo kretanje i entropijska sila, koje homogenizuju raspodelu različitih nosilaca naelektrisanja na većoj udaljenosti od razdelne površine, u rastvoru. Pored jona koji određuju površinsko naelektrisanja ili tzv. površinskih jona, u rastvoru postoje i tzv. kontra joni, koji su naelektrisani suprotno od naelektrisanja površinskih jona. Iako je očuvana ukupna neutralnost u sistemu, raspodela nosilaca naelektrisanja u blizini razdelne površine je nehomogena i razlikuje se nekoliko slojeva.

U sloju najbližem elektrodi, koncentracija kontra jona je najveća i opada sa rastojanjem od površine, dok se koncentracija površinskih jona menja obrnutno. Takve nehomogene raspodele jona u blizini razdelne površine tečne faze i elektrode dovode do formiranja tzv. dvojnog sloja, slika 3.1. Dvojni sloj, kao što i sam naziv kaže, sastoji se od dva sloja, Šternovog² sloja i Gujevog³ sloja (takođe nazvanog difuzni dvojni sloj). U Šternovom sloju električni potencijal linearno opada kroz čvrsto vezani sloj

¹engl. Walther Nernst

²engl. Otto Stern

³engl. Louis Georges Gouy

određujućih i kontra jona, do Helmholcove⁴ ravni. Daljim povećanjem rastojanja od površine elektrode, nakon Helmholcove ravni, nalazi se Gujev sloj ili difuzioni dvojni sloj. U Gujevom sloju, kontra joni slobodno difunduju dok ne dostignu usrednjenu koncentraciju u rastvoru, a električni potencijal opada aproksimativno prema relaciji:

$$E \propto e^{-\kappa(h-H)},$$
 (3.1.2)

gde je $h \ge H$ debljina Šternovog sloja, $1/\kappa$ Debaj-Hikelova⁵ konstanta, koja se takođe koristi za opisivanje dvojnog sloja:

$$\kappa = \sqrt{\frac{F^2 \sum_i c_i Z_i^2}{\varepsilon_r \varepsilon_0 RT}}.$$
(3.1.3)

U izrazu (3.1.3) ε_0 predstavlja permitivnost vakuuma, ε_r dielektričnu permitivnost rastvora, a c_i i Z_i koncentraciju i valencu kontra jona tipa *i* (*i* predstavlja opštu oznaku za različite vrste jona). Ova jednačina pokazuje da električni potencijal u blizini čvrste površine opada sa povećanjem koncentracije i valentnim stanjem kontra jona, a raste sa povećanjem dielektrične permitivnosti rastvora eksponencijalno. Veća koncentracija i valenca kontra jona bi dovela do smanjene debljine i Šternovog i Gujevog sloja. U teoriji, Gujev difuzioni sloj se završava u tački gde električni potencijal dostiže nulu, što bi bio slučaj samo kada je rastojanje od čvrste površine beskonačno. Međutim, u praksi, debljina dvojnog sloja je obično približno 10 nm ili veća. Ravan koja razdvaja usko vezani sloj tečnosti od ostatka tečne faze naziva se klizeća ravan. Električni potencijal na klizećoj ravni naziva se zeta potencijal i poznat je kao parametar koji određuje stabilnost koloidnih disperzija [134].

Opisani procesi na razdelnoj površini elektrode i tečne faze određuju u velikoj meri i odziv i osetljivost elektrohemijskih biosenzora. Tehnike ciklične voltametrije, elektrohemijske impedansne spektroskopije i hronoamperometrije korišćene su u eksperimentalnom delu za karakterizaciju i detekciju u biosenzorskim sistemima. Teorijske osnove ovih elektrohemijskih tehnika biće predstavljene u narednim poglavljima.

3.1.3 Ciklična voltametrija

Jedna od najčešće korišćenih elektrohemijskih tehnika za proučavanje procesa na površini elektrode je ciklična voltametrija (CV). Ova tehnika omogućava opisivanje brzine, mehanizma i kinetike reakcija elektroaktivnih supstanci. Kao rezultat ciklične voltametrije dobija se zavisnost struje u funkciji promene potencijala i dobijeni grafici nazivaju se ciklični voltamogrami ili samo voltamogrami.

⁴engl. *Hermann von Helmholtz*

⁵engl. Peter Debye i Erich Hückel



Slika 3.1: Šematski prikaz dvosloja na razdelnoj površini između elektrode i tečne faze.

U cikličnoj voltametriji potencijal radne elektrode postepeno se menja tokom vremena dok se meri struja koja prolazi kroz elektrodu. Opisana promena potencijala u vremenu prikazana je na slici 3.2a. Tipično, potencijal radne elektrode menja se linearno u vremenu do zadate maksimalne vrednosti potencijala u odnosu na referentnu elektrodu, nakon kog se vrši smanjenje potencijala do minimalne zadate vrednosti potencijala prema izrazu:

$$E = E_i \pm \nu t, \tag{3.1.4}$$

gde je E_i inicijalni potencijal, ν predstavlja brzinu skeniranja (izražava se u V/s), a t vreme skeniranja. Inicijalni potencijal, E_i , bira se tako da elektroaktivne komponente nisu ni oksidovane ili redukovane. Potencijal se zatim menja do maksimalne E_{max} ili minimalne vrednosti E_{min} , kada se vrši okretanje smera skeniranja. Uzastopnim ponavljanjem promene potencijala, vrši se skeniranje uzorka i iz tog razloga tehnika nosi naziv ciklična voltametrija. Važni parametri u CV tehnici su veličine struje oksidacionog pika koja se dešava na anodi, $I_{p,a}$ i redukcionog pika na katodi $I_{p,c}$, kao i potencijali pri kojima se javljaju pikovi na anodi i katodi, $E_{p,a}$ i $E_{p,c}$, respektivno [130, 135, 136].



Slika 3.2: (a) Promena potencijala u toku vremena u cikličnoj voltametriji; (b) Primer cikličnog voltamograma.

U slučaju elektrohemijskih biosenzora, redoks par jona gvožđa⁶ najčešće se koristi za karakterizaciju površine biosenzora. U tom slučaju Faradejevi procesi oksidacije i redukcije redoks para su reakcije od interesa i daju mogućnost povezivanja izmerenih parametara svake od elektrohemijskih tehnika sa kvantitetom detektovanog uzorka.

Opseg potencijala za CV bira se na način da u okviru voltamograma budu jasno definisani pikovi oksidacije i redukcije gvožđa, slika 3.2b. Promenom potencijala iznad ravnotežnog stanja, vrši se prenos elektrona sa molekula u rastvoru na elektrodu i obrnuto. U slučaju jona gvožđa, Fe³⁺, elektron sa elektrode može da pređe na jon redukujući ga u Fe²⁺ stanje, izraz (3.1.5):

$$Fe^{3+}(aq) + e^{-}(m) \to Fe^{2+}(aq).$$
 (3.1.5)

Suprotno, kada se od Fe²⁺ oduzima elektron molekul se oksiduje, a elektroda prima jedan elektron:

$$Fe^{2+}(aq) \to Fe^{3+}(aq) + e^{-}(m).$$
 (3.1.6)

Na osnovu izraza (3.1.5) i (3.1.6) može se zaključiti da je redoks par Fe³⁺/Fe²⁺ reverzibilan i iz tog razloga sam voltamogram ima simetrične pikove struje oksidacije i redukcije gvožđa. Potencijali na kojima se dešava oksidacija i redukcija razdvojeni su iz razloga difuzije analita do/od površine elektrode pri procesima oksidacije i redukcije [133]. Pre elektrohemijskih eksperimenata, elektrode se uglavnom podvrgavaju cikličnoj voltametriji u kiselini u cilju skidanja nečistoća sa njihove površine.

Pri oksidaciji i redukciji zlata u kiselini vrši se uklanjanje nečistoća sa površine elektrode. Iz tog razloga ponavljanjem ciklične voltametrije u kiselini tokom nekoliko desetina ciklusa, vrši se čišćenje elektrode kao deo standardnog protokola. S obzirom na to da se rastvori najčeče prave u vodi, opseg merenog potencijala, tzv. prozor potencijala

⁶U slučaju realizovanih elektrohemijskih biosenzora, karakterizacija površine vrši se redoks parom kalijum ferocijanida i kalijum fericijanida.
bira se tako da krajnji potencijal bude potencijal oksidacije dovodi do cepanja vode:

Anoda (oksidacija) :
$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$
, (3.1.7)

a krajnji potencijal redukcije dovodi do redukcije vodonika:

Katoda (redukcija) :
$$4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$$
. (3.1.8)

U ovom procesu, molekuli vode na anodi razlažu se na kiseonik, protone H⁺ i elektrone e⁻, izraz (3.1.7), dok se na katodi protoni i elektroni kombinuju da formiraju molekule vodonika, izraz (3.1.8).

Primena ciklične voltametrije, pored karakterizacije sastava elektrode, omogućava i procenu aktivne površine elektrode koja učestvuje u elektrohemijskoj reakciji, pomoću Randles-Ševičkove jednačine.

Randles-Ševičkova jednačina

Randles-Ševičkova jednačina opisuje vezu između difuzije i elektrohemijskih procesa na površini elektrode. Može se koristiti za određivanje elektrohemijski aktivne (ili elektroaktivne) površine elektrode, ukoliko su poznati koeficijent difuzije i koncentracija redoks para. Za idealno ravnu metalnu elektrodu, očekuje se da će elektroaktivna površina biti jednaka geometrijskoj površini elektrode. Međutim, to nije slučaj kada postoje nečistoće na elektrodi, kada su elektrode porozne ili funkcionalizovane specifičnim bioprepoznatljivim elementima (kao što su DNK, aptameri, antitela i sl.). Pored procene elektroaktivne površine elektrode, jednačina omogućava i procenu difuzionog koeficijenta nepoznatog redoks para. Randles-Ševičkova jednačina je predstavljena izrazom (3.1.9):

$$i_{\nu} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot C \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2}, \qquad (3.1.9)$$

gde je 2,69·10⁵ $\frac{C}{\text{mol}\sqrt{V}}$ konstanta u kojoj figurišu Faradejeva konstanta *F*, univerzalna gasna konstanta *R*, i temperatura (300 K). Dalje, u izrazu (3.1.9), *A* predstavlja elektroaktivnu površinu u cm², *i_p* je anodni pik struje, *D* difuzioni koeficijent (6,1 ·10⁻⁶cm²/s [137] za [Fe(CN)₆]^{4–}), *n* broj elektrona koji učestvuje u polureakciji (1 za [Fe(CN)₆]^{4–}), ν brzina skeniranja (0,5 V/s) i *c* koncentracija [Fe(CN)₆]^{4–} jona u mol/cm³.

U praksi, Randles-Ševičkova jednačina najčešće se koristi u eksperimentima gde se uzorak meri u seriji različitih brzina skeniranja. To se radi kako bi se generisao takozvani Randles-Ševičkov grafik, koji prikazuje zavisnost maksimalne struje redoks reakcije od kvadratnog korena brzine skeniranja. Iz Randles-Ševičkovog grafika može se proceniti reverzibilnost redoks reakcije. Naime, da bi redoks reakcija bila potpuno reverzibilna, maksimalna struja oksidacije i redukcije mora imati jednake maksimalne vrednosti. To znači da se isti broj elektroaktivnih molekula oksiduje i redukuje tokom svakog ciklusa. Takođe, za redoks sistem koji je kontrolisan difuzijom, grafikon maksimalne struje u odnosu na kvadratni koren brzine skeniranja pokazuje linearnu zavisnost. U suprotnom sistem je ireverzibilan ili kvazi-reverzibilan. Redoks par u kome obe vrste jona brzo razmenjuju elektrone sa elektrodom, tj. profil potencijal-struja vođen je isključivo difuzijom i Nernstovom jednačinom naziva se elektrohemijski reverzibilni par [133, 138]. Primena Randles-Ševičkove jednačine biće predstavljena u okviru poglavlja sa rezultatima.

3.1.4 Elektrohemijska impedansna spektroskopija

Elektrohemijska impedansna spektroskopija (EIS) jedna je izuzetno moćnih elektrohemijskih tehnika koja se koristi za proučavanje elektrohemijskih interakcija na površini elektrode. Ova tehnika pruža informacije o kinetici elektrohemijskih procesa, karakteristikama elektrode i promene u svojstvima elektrolita. Primena EIS-a je široka i obuhvata mnoge oblasti, uključujući baterijske sisteme, gorivne ćelije, senzore, biosenzore i druge elektrohemijske sisteme. U okviru ovog poglavlja biće predstavljeni osnovni principi elektrohemijske impedansne spektroskopije, njen značaj u proučavanju elektrohemijskih sistema, načini analize rezultata ekvivalentnim električnim kolima i primene ove tehnike u biosenzorskim sistemima.

Impedansa kao kompleksna veličina

EIS tehnika se oslanja na primenu male amplitude signala (napona ili struje), obično nadograđenim na jednosmernu (DC⁷) komponentu signala, na elektrohemijski sistem i merenje rezultujućeg odgovora (struje ili napona) u širokom opsegu učestalosti. Za opisivanje impedanse koristi se Omov zakon za naizmeničnu (AC⁸) struju. U sistemu naizmenične struje, koristi se oscilujući sinusni potencijal u vremenu E(t), predstavljen izrazom (3.1.10):

$$E(t) = E_m \sin 2\pi f t, \qquad (3.1.10)$$

gde je f učestalost, a E_m maksimalna amplituda talasa. Oscilujući potencijal izaziva strujni tok u elektrohemijskoj ćeliji, a merena impedansa Z definisana je kao odnos primenjenog potencijala i generisane struje:

$$Z(f) = \frac{E(t)}{i(t)},$$
(3.1.11)

⁷engl. *direct current*

⁸engl. alternating current

gde je Z funkcija primenjene učestalosti, a struja *i* i potencijal *E* funkcije vremena.

Nikvistovi dijagrami predstavljaju impedansu u domenu učestalosti, tako da je na *x*-osi predstavljen realni deo impedanse, dok je na *y*-osi predstavljen imaginarni deo impedanse. Na Nikvistovom dijagramu, svaka tačka predstavlja drugu učestalost i kompleksni broj, čiji modul određuje i modul impedanse.

Realni deo impedanse odnosi se na otpor elektrohemijskog sistema prema promeni električnog signala. On je povezan sa aktivnim elektrohemijskim procesima, kao što su elektrokatalitičke reakcije na površini elektrode. S druge strane, imaginarni deo impedanse, predstavlja reaktivni karakter elektrohemijskog sistema. On opisuje skladištenje i otpuštanje energije tokom promene električnih signala. Imaginarni deo impedanse obuhvata kapacitivne i induktivne komponente. Kapacitivna komponenta ukazuje na sposobnost elektrode da skladišti električnu energiju u dvojnom sloju na površini elektrode, dok induktivna komponenta ukazuje na reaktivnost elektrohemijskih procesa [133, 139].

Opisani doprinosi realnom i imaginarnom delu impedanse mogu se modelovati komponentama ekvivalentnog električnog kola, koje modeluje ponašanje elektrohemijskog sistema. U narednom poglavlju, detaljno će biti predstavljeno ekvivalentno električno kolo koje se najčešće primenjuje za interpretaciju Nikvistovih dijagrama dobijenih pomoću biosenzora. Ova analiza omogućava izvlačenje relevantnih parametara modela, ključnih za kvantitativnu detekciju specifičnih komponenata pomoću biosenzora.

Modelovanje ekvivalentnim električnim kolom

Elektrohemijska impedansna spektroskopija može se koristiti za izdvajanje korisnih informacija o složenim elektrohemijskim sistemima. Kao što je rečeno, različiti delovi elektrohemijskog sistema mogu se modelovati pomoću poznatih elektronskih komponenata, čija je impedansa dobro okarakterisana. Za opis elektrohemijskih procesa na površini elektrode, najčešće se koristi Randlesovo ekvivalentno kolo. Ovaj model je nazvan po britanskom naučniku Arthur John Randlesu, koji je prvi predstavio ovu aproksimaciju složenih elektrohemijskih sistema. Kada se primenjuje na elektrohemijske biosenzore, Randlesovo ekvivalentno kolo se koristi za kvantitativno analiziranje elektrohemijskih karakteristika senzora, kao i za interpretaciju njihovih impedansnih spektara. Ovaj model sastoji se od serije komponenata koje aproksimiraju elektrohemijske interakcije na površini elektrode i u rastvoru [139].

Naime, ako se posmatra kap elektrolita nanesena na planarnu elektrodu kao na slici 3.3a, svaki od delova sistema mogu se opisati elektronskim komponentama grupisanim u ekvivalentno električno kolo. Naime, sama kap može se predstaviti kao otpornik R_{sol}⁹ u kolu i predstavlja otpor elektrolita. Komponenta otpora prenosu naelektrisanja, R_{ct}¹⁰ predstavlja, kao što i sam naziv kaže, otpor prenosu naelektrisanja između elektrode i elektrolita. Kapacitivnost C oslikava sposobnost elektrode da skladišti naelektrisanja u dvojnom sloju na razdelnoj površini između elektrode i elektrolita, dok prisustvo Varburgovog elementa¹¹ (W) opisuje doprinos difuzije jona elektrolita do površine elektrode.

Tipičan dijagram impedanse za elektrolitičke reakcije koje se odvijaju na površini elektrode, predstavljen je na slici 3.3b. Naime, paralelno RC kolo koje sadrži otpor prenosu naelektrisanja R_{ct}, kapacitivnost dvojnog sloja C i Varburgov element W modeluju Faradejevu reakciju razmene naelektrisanja. Međutim, ponašanje elektrohemijskog sistema i predloženog ekvivalentnog kola, u velikoj meri zavisi od primenjene učestalosti i iz tog razloga će u nastavku biti opisano ponašanje svake od elektronskih komponenata u zavisnosti od učestalosti u cilju boljeg razumevanja procesa koji se dešavaju na površini elektrode.

Pri prolasku struje kroz opisano strujno kolo, struja prolazi kroz otpornik R_{sol}, i tada se deli na paralelno vezane komponente RC kola. U paralelnom RC kolu, struja lakše prolazi kroz kondenzator na većim učestalostima. Shodno tome, pri niskim učestalostima struja prolazi prvenstveno kroz otpornik, dok na višim učestalostima AC struja prolazi pretežno kroz kondenzator. Ukupna impedansa se na taj način približava vrednosti R + R_{ct} na *x*-osi na niskim učestalostima, a opada sa porastom učestalosti. Na visokim učestalostima dijagram impedanse pokazuje dominantan doprinos ukupnoj impedansi potiče od otpora rastvora jer dvojni sloj obezbeđuje zanemarljiv otpor struji. Iz toga sledi da se na visokim učestalostima ne dešava elektroliza. Međutim, kako se učestalost smanjuje, to više nije slučaj i efekat R_{ct} raste uporedo sa C dovodeći do karakterističnog polukružnog izgleda dijagrama. Konačno, na nižim učestalostima impedansa pokazuje veliki porast, tzv. "rep" koji se modeluje Varburgovim elementom. Do porasta dolazi zbog značajnih promena koncentracije izazvanih naizmeničnom strujom, koje postaje sve teže dopuniti difuzijom na nižim učestalostima.

Ovaj složeni model omogućava dublje razumevanje interakcija između elektrode i elektrolita, razlaganje doprinosa različitih komponenata ukupnom signalu i pruža vredne informacije za optimizaciju elektrohemijskih sistema kao što su biosenzori. Njegova primena biće predstavljena u okviru poglavlja sa rezultatima.

⁹engl. Solution resistance.

¹⁰engl. *Charge transfer resistance*.

¹¹engl. *Warburg element*.



Slika 3.3: (a) Šematski prikaz ekvivalentnog električnog kola i razdelne površine elektrode i kapi; (b) Primer Nikvistovog dijagrama.

3.1.5 Hronoamperometrija

Hronoamperometrija je elektrohemijska tehnika koja omogućava precizno praćenje brzine elektrohemijskih procesa u vremenskom domenu i pruža informacije o reaktivnosti i karakteristikama elektrode i elektrolita.

Za izvođenje hronoamperometrije koristi se troelektrodni sistem, gde se prati reakcija na radnoj elektrodi, referentna elektroda održava konstantan elektrohemijski potencijal, dok pomoćna elektroda obezbeđuje prikupljanje elektrona koji su nastali u reakciji. Tokom eksperimenta prati se promena struje u toku vremena. Ove promene omogućavaju nam da dobijemo podatke o brzini reakcije, difuzionim procesima i drugim elektrohemijskim osobinama sistema.

Kod hronoamperometrije pobuda se vrši konstantnim potencijalom, a odziv prati kao promena struje u vremenu. Uopšteno govoreći, pre početka eksperimenta elektroda se drži na potencijalu pri kojem se ne dešavaju Faradejevi procesi. U početnom trenutku t_0 potencijal prelazi na vrednost pri kojoj se javlja redoks reakcija, slika 3.4a. Za reakcije koje su pod kontrolom difuzije, struja opada sa vremenom prema Kotrelovoj (engl. *Cottrell*) jednačini:

$$i(t) = \frac{nFADC}{\pi^{1/2}t^{1/2}},$$
(3.1.12)

gde je *n* broj elektrona koji učestvuje u polureakciji, *C* koncentracija jona, *F* Faradejeva konstanta, *A* predstavlja elektroaktivnu površinu i *D* difuzioni koeficijent jona, slika 3.4b.



Slika 3.4: (a) Zavisnost potencijala od vremena u hronoamperometriji; (b) Zavisnost struje od vremena u hronoamperometriji.

U okviru doktorske disertacije hronoamperometrija će biti primenjena za posrednu detekciju različitih koncentracija glukoze, merenjem elektrona koji nastaju oksidacijom vodonik peroksida, o čemu će biti više reči u nastavku.

3.2 Pregled relevantnih istraživanja

Zbog prirode samog materijala, odlične električne provodljivosti, izuzetne mehaničke stabilnosti i lake funkcionalizacije zlata kroz formiranje kovalentne veze sa tiolnom grupom, zlatne elektrode najčešći su odabir za realizaciju elektrohemijskih biosenzora [140–142]. Elektrohemijski biosenzori predstavljaju široko polje istraživanja zbog osetljive detekcije u nano i pikomolovima za primene u rasponu od kvaliteta vode i hrane do monitoringa zdravstvenog stanja. Međutim, iako su elektrohemijski biosenzori jednostavni za upotrebu i mogu se povezati sa jeftinim i prenosivim instrumentima, mali broj njih je komercijalizovan. Jedan od razloga malog broja komercijalizovanih senzora su izazovi vezani za proizvodnju zlatnih elektroda.

Tradicionalno, zlatne elektrode proizvode se tehnologijama fotolitografije ili litografije, koje predstavljaju složene procese gde se za realizaciju koriste skupe hemikalije, a zahtevaju i potrebu za specijalizovanim laboratorijama i čistim sobama, koje su mnogima nedostupne [142]. Druge metode, kao što su metod elektrodepozicije i vakuumskog deponovanja, imaju visoku cenu. Pored toga, procesi sadrže i korak hemijskog odstranjivanja materijala u procesu nagrizanja (ecovanja), gde se deponovani materijali selektivno uklanjaju i pretvaraju u otpad koji se u nekim slučajevima mora tretirati. Pored pomenutih tehnologija, inkdžet i sito-štampa izdvajaju se kao alternativne pristupačne metode izrade elektroda u odnosu na tradicionalne metode. Elektrode štampane inkdžet štampačem generišu se nanošenjem mastila sa zlatnim nanočesticama na podlogu ili na prethodno nanesene slojeve [143]. Efikasne strukture sa finim dizajnom mogu se dobiti sa malom količinom nanočestica, bez potrebe za maskama i upotrebom jednostavne opreme. Međutim, neizbežna tendencija rastvorenih nanočestica da formiraju strukture nalik prstenu kafe (engl. *coffee ring effect*) usled površinskog napona i svojstva protoka kapljica u interakciji sa površinom može proizvesti neujednačen film, što smanjuje performanse uređaja. Da bi se ovo izbeglo, zlatno mastilo se može dopirati drugim materijalima i naneti na podlogu kroz masku, kao što je slučaj komercijalizovanih jednokratnih zlatnih sito-štampanih elektroda [144]. Heterogenost i neponovljivost prijavljeni kod sito-štampanih elektroda potiču od doping materijala koji može smanjiti efikasnost funkcionalizacije elektroda ili ometati detekciju. Sitoštampane elektrode dostupne su komercijalno od strane kompanija Dropsens [145], Palmsens [146], Nanoshell [147] itd. Međutim, ova tehnologija poseduje ograničenje za izbor podloge jer treba da izdrži visoku temperaturu pri sinterovanju paste i stoga često nisu pogodni za integraciju u LOC uređaje.

Jeftini listići zlata nanometarske debljine napravljeni od čistog zlata nisu često korišćeni materijal za izradu elektrohemijskih senzora zbog poteškoća u rukovanju listićima i njihove lomljivosti [148]. Novija istraživanja predlažu svega nekoliko senzora na bazi zlatnih listića u svrhu elektrohemijske detekcije. Matsui i saradnici su razvili mikroelektrodu na bazi zlatnih listića za detekciju glukoze [149]. Takođe, Zamani i saradnici su proizveli elektrodu na bazi zlatnih listića za detekciju glukoze [149]. Takođe, Zamani i saradnici su proizveli elektrodu na bazi zlatnih listića za detekciju aktivnosti DNK-aze I [150], a Prasertiing i saradnici proizveli planarni elektrohemijski senzor sa radnom elektrodom na bazi zlatnih listića za detekciju Pb²⁺ jona [148]. U pomenutim istraživanjima, zlatne elektrode dobijene su montažom zlatnih listića između dva sloja izolacione poliimidne, poliesterske ili polivinilhloridne (PVC) lepljive folije. Gornji sloj folije sadrži otvor koja omogućava izlaganje površine elektrode rastvoru uzorka.

Ključni problemi u razvoju elektroda za jednokratnu upotrebu koje se mogu lako koristiti za brze, osetljive i jeftine aplikacije biosenzora ostaju zahtevi za malom zapreminom uzorka, visokom provodljivošću i velikom površinom radne elektrode. U okviru doktorske disertacije, koristeći 24-karatne zlatne listiće kao materijal za izradu elektroda, realizovana je platforma za senzor korišćenjem tople laminacije i laserske ablacije. Proizvodni proces je pristupačan jer ne zahteva maske dizajna, čistu sobu i naknadnu obradu proizvedenih elektroda. Pored toga, proces izrade veoma je brz: u laboratorijskim uslovima jedna elektroda se proizvodi za manje od jednog minuta, dok tehnologije kao što su litografija, sito ili inkdžet štampa zahtevaju nekoliko sati. Štaviše, više kopija elektrode može se proizvesti u jednom ciklusu, sa proizvodnim troškovima reda 0,1€ po kopiji. Zbog uskog laserskog zraka i njegove rezolucije, može se postići visoka ponovljivost i reproduktivnost. Štaviše, složena geometrija elektroda može se realizovati sa veoma malom rezolucijom i uskim razmakom između elektroda.

3.3 Tehnologija izrade elektroda na bazi zlatnih listića

Zlatni listići, korišćeni za izradu elektroda, koriste se u različitim oblastima, uključujući slikarstvo, ukrašavanje umetničkih dela, ikona, nameštaja, arhitektonskih elemenata, a u novije vreme i kao jestiva dekoracija hrane. Proces proizvodnje zlatnih listića podrazumeva topljenje i oblikovanje zlatne smese koja se potom izvlači kroz valjke i stanjuje sve dok se ne stvori veoma tanak film. Potom se pomenuti listići seku na male kvadrate koji se utiskuju u potporni papir omogućavajući njihovo pakovanje i korišćenje. Najčešće se koristi 24-karatno zlato jer ima najveći udeo zlata u materijalu i može se postići debljina listića od svega par mikrona [151].

Opisani zlatni listići iskorišćeni su za izradu elektroda kombinovanjem procesa laminacije i laserske ablacije zlata. Potencijal ovako izrađenih elektroda ispitan je za različite primene u biosenzorskoj detekciji bakterija i tumor biomarkera pomoću imobilizovanih antitela na površini zlata, o čemu će biti više reči u nastavku.

U okviru doktorske disertacije razvijena je nova tehnologija izrade elektroda na bazi zlatnih listića sa mogućnošču realizacije različitih planarnih i 3D konfiguracija senzora. Predložena tehnologija omogućava brzu izradu velikog broja elektroda i primene u velikom broju oblasti, sa prednostima u pogledu jednostavnosti izrade, niske cene i visoke osetljivosti detekcije.

Šematski prikaz postupka izrade elektroda predstavljen je na slici 3.5a. Predložene zlatne elektrode napravljene su kao višeslojna struktura od potpornog (neprovodnog) sloja, na koji se nanose slojevi zlatnih listića dimenzija 80 mm × 80 mm (Pozlata Dimitrijević, Srbija). Potporni sloj za zlatne listiće sastoji se od četiri sloja polivinil hlorid (PVC) folija (ImageLast A4 125 Micron Laminating Pouch), debljine 125 μ m. PVC folije sadrže lepak koji se u procesu laminacije, pod dejstvom toplote, oslobađa i lepi za naredni sloj. Pre laminacije, na PVC podlogu nanosi se izolacioni sloj od politetrafluoretilen (PTFE, Wurth, Srbija) spreja koji čini površinu hidrofobnom. Ovaj korak izvršen je kako bi se sprečilo razlivanje kapi tečnih uzoraka tokom merenja. Konačno, na površinu PVC podloge nanosi se zlato toplom laminacijom na 180 °C (Laminator PDA3 330C, PINGDA, Kina) dva listića zlata, jednog za drugim, koji se usled oslobađanja lepka sa PVC folije lepi na površinu PVC podloge. Slika 3.5b predstavlja laminirane zlatne listiće na PVC podlogu, na kom se zatim laserskom ablacijom dobija serija od 18 elektroda, slika 3.5c.

Nakon procesa laminacije zlatnih listića i PVC podloge, dizajn elektroda izrađen je laserskom ablacijom korišćenjem Nd:YAG lasera (Power Line D-100, Rofin-Sinar, Nemačka). Laser u procesu ablacije formira mrežu gusto zbijenih linija, koje se međusobno preklapaju 80%, i prolazeći po zadatom dizajnu vrši uklanjanje materijala, odnosno ablaciju zlata. Za pomenuti proces laser je korišćen u engl. *hatch* režimu rada sa parametrima struje 26,2 A, učestalosti 65 kHz, i brzinom kretanja snopa od 500 mm/s. Ablacijom zlata realizuje se dizajn elektrode prethodno nacrtan u CAD softveru. U okviru rezultata istraživanja biće predstavljeni dizajnovi planarnih dvoelektrodnih i troelektrodnih elektroda na bazi zlatnih listića, kao i 3D troelektrodni sistem.



Slika 3.5: (a) Šematski prikaz koraka izrade elektroda na bazi zlatnih listića; (b) Zlatni listići laminirani na PVC podlogu pre laserske ablacije; (c) Zlatni listići laminirani na PVC podlogu posle laserske ablacije.

3.4 Karakterizacija elektroda na bazi zlatnih listića

Karakterizacija predloženih elektrona na bazi zlatnih listića urađena je pomoću tehnika skenirajuće elektronske mikroskopije, energetske disperzivne spektroskopije i optičke profilometrije u cilju vizualizacije površine i određivanja njenog elementarnog sastava.

3.4.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija i energetska disperzivna spektroskopija

Da bi se omogućilo posmatranje objekata na nanoskali, potrebno je prevazići ograničenja optičke mikroskopije usled talasne dužine fotona u vidljivom spektru. Iz tog razloga skenirajući elektronski mikroskop koristi talasnu dužinu snopa elektrona kojima se bombarduje uzorak da bi se omogućilo posmatranje objekata na mikro i nanoskali. Pored mogućnosti posmatranja uzoraka na mikro i nanoskali, skenirajući elektronski mikroskopi često imaju dodatne mogućnosti za kvalitativno i kvantitativno određivanje sastava uzoraka.

Određivanje elementarnog sastava uzorka vrši se tehnikom energetske disperzivne spektroskopije (EDS). Kod ove tehnike meri se energija X zraka koji su nastali interakcijom električnog snopa i atoma ispitivanog materijala. Na osnovu energije X zraka može se zaključiti o kom se elementu radi (kvalitativna analiza), a na osnovu broja pristiglih fotona jedne iste energije određuje se koliko detektovanog elementa ima (kvantitativna analiza). Kao izlazna informacija dobija se EDS spektar koji predstavlja broj X zraka detektovanih na određenoj energiji.

U cilju vizualizacije površine realizovanih elektroda na bazi zlatnih listića i procene udela elemenata u sastavu elektroda, odrađena je karakterizacija elektroda primenom skenirajuće elektronske mikroskopije i energetske disperzivne spektroskopije. Primenom pomenute dve tehnike ispitan je uticaj broja slojeva zlatnih listića nanetih na PVC podlogu na hrapavost površine i sadržaj elemenata. Za opisane eksperimente korišćen je skenirajući elektronski mikroskop (SEM, Hitachi TM3030, Japan).

Slike 3.6a i b prikazuju slike skenirajućeg elektronskog mikroskopa snimljene sa jednim i dva sloja zlatnih listića na PVC podlogu, respektivno. Kao što je opisano u poglavlju 3.3, pri laminaciji se oslobađa lepak na PVC foliji i omogućava lepljenje zlatnog listića na površinu PVC podloge. Lepak prodire kroz tanak i porozan sloj jednog sloja zlatnog listića što se vidi kao tačkaste izbočine na slici 3.6a. Na ovim mestima omogućava se vezivanje dodatnog sloja zlatnog lista, povećavajući na taj način hrapavost površine, a samim tim i osetljivost elektrode. S druge strane, slika 3.6b prikazuje površinu elektrode sa dva zlatna listića na kojoj nema tragova lepka.

Pretpostavka o lepljenju zlata na lepak koji prodire kroz pore jednog sloja zlatnih listića potvrđena je kroz EDS rezultate, gde su predstavljeni EDS spektri za jedan i dva sloja zlatnih listića, slika 3.7a i b, respektivno. Naime, oba spektra sadrže pikove koji potiču od M_{α} (2,123 keV) i L_{α} (9,713 keV) zlata, kao i K_{α} liniju ugljenika (0,277 keV), dok je K_{α} linija kiseonika (0,525 keV) detektovana samo kod uzorka sa jednim slojem zlatnih listića [152]. Na grafiku 3.7c predstavljeni su grafički i tabelarno rezultati elementarnog sastava uzoraka, gde je detektovan veći sadržaj ugljenika i kiseonika (koji



Slika 3.6: SEM analiza površine elektroda na bazi zlatnih listića; (a) Jedan sloj zlatnih listića na PVC podlozi; (b) Dva sloja zlatnih listića na PVC podlozi.

potiču najverovatnije od lepka PVC folije).

Skenirajuća elektronska mikroskopija i energetska disperzivna spektroskopija pomogle su u procesu optimizacije izrade elektroda na bazi zlatnih listića, s potvrdom njihovog sastava i hrapavosti površine. Dodatna vizualizacija površine elektroda urađena je optičkom profilometrijom.

3.4.2 Optička profilometrija

Optička profilometrija je sofisticirana tehnika za karakterizaciju površine materijala sa visokom preciznošću i rezolucijom. Ova tehnika omogućava neinvazivno merenje topografskih karakteristika površine putem analize interferencije svetlosnih talasa. Glavni princip optičke profilometrije leži u poređenju faznih razlika između referentnog i reflektovanog svetlosnog zraka koji je prošao kroz interakciju sa površinom. Analizom ovih interferograma, moguće je rekonstruisati visinske profile površine sa velikom tačnošću. Optička profilometrija je posebno korisna za merenje mikrostrukturnih karakteristika, kao što su hrapavost, reljef i visinske promene.

U cilju procene hrapavosti elektroda sa dva sloja zlatnih listića odrađena je karakterizacija optičkom profilometrijom. U tu svrhu korišćen je optički profilometar (Huvitz Panasis, Južna Koreja). Slika 3.8a prikazuje površinu zlatnih elektroda gde se vidi hrapav reljef i velika efektivna površina, a dodatnu potvrdu hrapavosti reljefa daje 3D slika prikazana na slici 3.8b, u rasponu od nekoliko desetina mikrona, kao rezultat dodatnog sloja zlata.

Prikazani rezultati potvrđuju veliku hrapavost i efektivnu površinu elektrode, stvarajući na taj način veći broj centara za interakciju u senzorskim i biosenzorskim



Slika 3.7: (a) Rezultati EDS analize elektrode sa jednim slojem zlatnih listića; (b) Rezultati EDS analize elektrode sa dva sloja zlatnih listića; (c) Maseni udeo elemenata za elektrode sa jednim i dva sloja zlatnih listića.

primenama. U narednom poglavlju tehnologija izrade elektrode na bazi zlatnih listića iskorišćena je za realizaciju planarnih dvoelektrodnih i troelektrodnih sistema, zajedno sa 3D sistemom, gde je troelektrodni sistem integrisan unutar mikrofluidične platforme.

3.4.3 Planarni dvoelektrodni sistem na bazi zlatnih listića

Inicijalni dizajn elektroda na bazi zlatnih listića ispitan je za dvoelektrodni sistem sa radnom elektrodom poluprečnika 2,5 mm. Rastojanje između kontakata dizajnirano je da iznosi 2,54 mm, što odgovara standardnim elektronskim komponentama. Dimenzije izrađene radne i pomoćne elektrode prikazane su na slici 3.9a. Ovaj dizajn omogućava elektrohemijsku detekciju korišćenjem male zapremine uzorka sa zapreminom kapi 80 μ L.

Merenja cikličnom voltametrijom predstavljenog dvoelektrodnog sistema urađena su pomoću Ag/AgCl eksterne referentne elektrode (CHI 111 Ag/AgCl, 3 M KCl, CH Instruments, USA) uronjene u kap na površini elektrode, slika 3.9b. Držač elektrode sa pinovima na rastojanju 2,54 mm korišćen je za povezivanje radne i pomoćne elektrode sa potenciostatom. Senzor se u držač ubacuje kao USB, a eksterna Ag/AgCl referentna elektroda povezana je spoljnim kablom i uronjena u kap na površini elektrode. Merenja elektrohemijske impedansne spektroskopije vršena su u dvoelektrodnom



Slika 3.8: (a) Površina zlatnih elektroda snimljena optičkim profilometrom; (b) 3D prikaz elektroda snimljen pomoću optičkog profilometra.

sistemu tako da se pomoćna i referentna elektroda povezuju na isti potencijal, slika 3.9c. Postavka eksperimenta predstavljena je na slici 3.9d. Potenciostat Palmsens4 (Potenciostat/Galvanostat/Analizator impedanse, PalmSens BV, Netherlands), povezan je na računar programom PCTrace 5.8, a držač za elektrode povezan na potenciostat.

Ciklična voltametrija (CV) sumporne kiseline urađena je radi karakterizacije kristalnosti i utvrđivanja sastava elektrode. Kao što je rečeno, karakterizacijom površine elektrode pomoću ciklične voltametrije dobijaju se karakteristični pikovi oksidacije i redukcije metala, što ujedno predstavlja i njegov prepoznatljivi izgled voltamograma. Slika 3.10a prikazuje oksidacioni pik na +1,3 V (u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu) i redukcioni pik na +0,80 V (u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu), što odgovara karakterističnom voltamogramu zlatnih elektroda, bez dodatnih pikova koji bi ukazivali na prisustvo nečistoća na površini elektrode.

Elektroda je zatim okarakterisana po pitanju stabilnosti i reproducibilnosti izrade, što su važni faktori kod samostalno napravljenih materijala i uređaja. Stabilnost signala elektrode ispitana je korišćenjem redoks probe 10 mM kalijum fero/fericijanida (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]) u PBS puferu. Prikazani voltamogram na slici 3.10b prikazuje Fe²⁺/Fe³⁺ redoks reakciju sa jasno definisanim pikovima oksidacije i redukcije. Intenzitet pikova prikazuje jednake vrednosti tokom 25 snimanja što pokazuje dobru stabilnost signala realizovanih elektroda.

Elektrohemijska impedansna spektroskopija (EIS) korišćena je za prikazivanje ponovljivosti izrađenih elektroda u rastvoru Fe^{2+}/Fe^{3+} , slika 3.10c. Impedansni spektri sastoje se od polukružnog dela čiji je prečnik izračunat kao otpor prenosu naelektrisanja (engl. *charge transfer resistance* R_{ct}) i linearnog dela koji predstavlja proces kontrolisan difuzijom. Izuzetna ponovljivost dobijena je koristeći pet različitih elektroda, sa ponovljivim odzivom niske varijabilnosti, posebno u polukružnom delu spektra, slike 3.10c i 3.10d.



Slika 3.9: (a) Dimenzije planarnog dvoelektrodnog sistema na bazi zlatnih listića; Dimenzije na slici predstavljene su u mm; (b) Postavka eksperimenta sa eksternom Ag/AgCl referentnom elektrode; (c) Postavka eksperimenta za dvoelektrodni sistem; (d) Postavka eksperimenta.

Elektrode su zatim okarakterisane CV metodom koristeći kalijum fero/fericijanidni redoks probu u PBS puferu za različite brzine skeniranja. Kao što je prikazano na slici 3.11a, struja se povećava sa povećanjem brzine skeniranja. Intenzitet oba pika oksidacije anjona i redukcije katjona redoks probe u odnosu na kvadratni koren brzine skeniranja pokazuju linearan odnos, slika 3.11b. Linearnost ukazuje na to da je difuzija kontro-lisala oksidaciju/redukciju jona na površini elektrode, dok simetričnost faradejskih pikova ukazuje reverzibilnost redoks para.

Konačno, procenjena je zavisnost signala impedanse kalijum fero/fericijanida od njegove koncentracije u PBS puferu, slika 3.11c. Linearni opseg modula impedanse primećen je na učestalostima 1 Hz i 100 kHz za koncentracije redoks probe u rasponu od 0,001 mM do 0,1 mM i 0,1 mM do 10 mM, respektivno, slika 3.11d. Rezultati pokazuju da elektroda omogućava pouzdanu i osetljivu detekciju impedanse kalijum fero/fericijanid sa učestalostima u opsegu od 1 Hz do 100 kHz.

Potencijal ovako okarakterisanih elektroda na bazi zlatnih listića ispitan je za detekciju *E. coli* i *S.* Typhimurium, kao i tumor biomarkera HER2.

3.5 Biosenzor za detekciju *E. coli* na bazi zlatnih listića

U sektorima zdravstva i poljoprivrede, *E. coli* nije samo član najrelevantnijih patogena koji se prenose hranom i vodom, već je i glavni rezervoar gena otpornosti na



Slika 3.10: Karakterizacija elektroda na bazi zlatnih listića; (a) CV u 0,5 M sumpornoj kiselini za brzinu skeniranja od 0,5 V/s; (b) CV u 10 mM kalijum fero/fericijanida u PBS puferu tokom 25 ciklusa; (c) Nikvistov dijagram za 10 mM fero/fericijanida u PBS puferu za 5 različitih elektroda; (d) Procena ponovljivosti izrade elektroda pomoću parametra otpora prenosu naelektrisanja.

antibiotike. Sojevi *E. coli* pretežno su bezopasni komensali u gastrointestinalnom traktu sisara i ptica i mogu boraviti, nezavisno od domaćina, u vodi, zemljištu i sedimentima. Kada se prilagodi vancrevnim nišama kod ljudi, *E. coli* može da izazove bolesti koje značajno opterećuju zdravstvene sisteme na globalnom nivou, kao što su infekcije urinarnog trakta, pijelonefritis, sepsa i meningitis [153]. Pored toga, *E. coli* je fekalna indikatorska bakterija u ispitivanju kvaliteta vode u životnoj sredini [154] i važan indikator u proceni bezbednosti hrane [155]. U literaturi su predloženi različiti biosenzori zasnovani na antitelima za otkrivanje *E. coli* u cilju brze dijagnostike i poboljšanja mera zdravstvene zaštite [156–161]. Većina njih zasniva se na korišćenju komercijalnih sitoštampanih elektroda na bazi zlata i ugljenika. Iako postoji veliki broj rešenja u literaturi njihova komercijalna primena još nije zaživela najviše zbog skupih tehnologija izrade, loše ponovljivosti izrade, nestabilnih signala itd.



Slika 3.11: (a) CV u 10 mM fero/fericijanidu u PBS puferu za brzine skeniranja u opsegu 0,1 do 1 V/s; (b) Zavisnost pikova oksidacije i redukcije 10 mM fero/fericijanida u PBS puferu od korena brzine skeniranja; (c) Nikvistovi dijagrami za različite koncentracije fero/fericijanida u PBS puferu; (d) Modul impedanse na 1 Hz i 100 kHz za različite koncentracije fero/fericijanida u PBS puferu u opsegu 0,001 mM - 0,1 mM i 0,1 mM - 10 mM, respektivno.

3.5.1 Funkcionalizacija elektroda za detekciju E. coli

Elektrode na bazi zlatnih listića funkcionalizovane su sa specifičnim antitelom koje prepoznaje celu ćeliju *E. coli* kako bi se omogućilo otkrivanje bakterija bez preliminarne lize ćelija, slika 3.12. Predloženi biosenzor realizovan je višestrukim inkubacijama kapi na radnoj elektrodi. Samoorganizujući monosloj¹² merkaptopropionične kiseline (3-Merkaptopropionična kiselina, Sigma Aldrich) formiran je tokom inkubacije preko noći na 4 °C od 1 μ L 10 mM MPA pripremljene u etanolu. Merkaptopropionična kiselina (MPA¹³) sadrži tiolnu grupu sa jakim afinitetom za vezivanje za površinu zlata i karboksilnu grupu na drugom kraju lanca, koja omogućava vezivanje amino grupe antitela.

¹²engl. *self-assembled monolayer*

¹³engl. Mercaptopropionic acid

Aktivacija karboksilnih grupa MPA urađena je kroz 1 h inkubacije 10 μ L kapi 50 mM Nhidroksi sukcinimida (NHS, Sigma Aldrich)/50 mM N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil karbodiimid hidrohlorida (EDC, Sigma Aldrich) pripremljenih u PBS puferu. Nakon toga, 1 h inkubacije antitela (ab137967, Abcam, SAD) omogućava kovalentno vezivanje na površini zlata i konačno, u cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja, 50 μ g/mL goveđeg serumskog albumina - BSA¹⁴ (Sigma Aldrich) inkubiran je 20 minuta na sobnoj temperaturi. Svaki korak funkcionalizacije okarakterisan je putem impedansne spektroskopije, prikazanog u odeljku sa rezultatima.



Slika 3.12: Šematski prikaz slojeva funkcionalizacije površine zlatne radne elektrode za specifičnu detekciju *E. coli*.

Da bi se procenila efikasnost funkcionalizacije, izvršena je SEM vizualizacija površine elektrode pre i posle imobilizacije i blokiranja antitela, slika 3.13b. SEM slika zlata pokazala je površinu svetlije boje u poređenju sa bojom funkcionalizovane elektrode što ukazuje da su biološki molekuli sa slabim naelektrisanjem imobilisani. SEM slike za modifikovane elektrode pokazale su nasumičnu distribuciju tamnih mrlja kada se posmatra u režimu sekundarnih elektrona rasejanih unazad koji odgovaraju organskim molekulima vezanim za površinu zlata, slika 3.13a i 3.13b.

Potvrda formiranja MPA monosloja na površini zlata prikazana je merenjem kontaktnog ugla (Kruss Scientific, Nemačka). Inicijalno merenje kontaktnog ugla urađeno je na očišćenoj elektrodi, a nakon potapanja u etanolni rastvor MPA, elektrode su ponovo okarakterisane merenjem kontaktnog ugla sa vodom. Slike 3.13c i d pokazuju da se početne vrednosti kontaktnog ugla kapi vode smanjuje sa 70, 7(4)° na 53, 53(27)° nakon nanošenja MPA na površinu. Ove vrednosti ukazuju na povećanje hidrofilnosti površine nakon nanošenja monosloja MPA.

¹⁴engl. Bovine Serum Albumin



Slika 3.13: (a) SEM slika površine zlatne elektrode sa obeleženim organskim materijalom na površini; (b) SEM slika površine zlatne elektrode sa MPA i obeleženim organskim materijalom na površini; (c) Kontaktni ugao površine radne elektrode na bazi zlatnih listića; (d) Kontaktni ugao površine radne elektrode na bazi zlatnih listića modifikovane sa MPA.

3.5.2 Karakterizacija koraka funkcionalizacije

Da bi se dodatno potvrdila modifikacija površine, elektroda je okarakterisana redoks probom kalijum fero/fericijanida u PBS puferu nakon svakog koraka funkcionalizacije. Rezultati predstavljeni Nikvistovim dijagramima na slici 3.14a pokazuju značajno povećanje prečnika polukruga impedanse nakon različitih faza funkcionalizacije biosenzora, potvrđujući formiranje različitih slojeva na površini zlatne elektrode. Dobijeni porast impedanse opisuje neprovodnost imobilizovanih molekula na površini zlata, a kvantitativna procena stabilnosti signala i veličine promene signala odrađene su nakon fitovanja ekvivalentnim električnim kolom.

Rezultati impedansne spektroskopije fitovani su ekvivalentnim električnim ko-

lom predstavljenim na unutrašnjem grafiku slike 3.14a. Kao sveobuhvatna veličina koja opisuje zasićenost površine zlata slojevima funkcionalizacije i antitelima, korišćen je otpor prenosu naelektrisanja R_{ct}. Slika 3.14b predstavlja rezultate fitovanja ekvivalentnim električnim kolom i vrednosti otpora prenosu naelektrisanja za različite korake funkcionalizacije. Rezultati pokazuju porast ove veličine, što odgovara povečanju pokrivenosti površine organskim materijalima, odnosno vezivanje antitela na monosloj MPA, a zatim i popunjavanje slobodnih veza sa BSA proteinom, u cilju sprečavanja nespecifičnog doprinosa signalu. Mala standardna devijacija ukazuje na stabilnost izmerenog signala.



Slika 3.14: (a) Nikvistovi dijagrami nakon svakog od koraka funkcionalizacije biosenzora. Unutrašni grafik: Ekvivalentno električno kolo korišćeno za fitovanje rezultata; (b) Otpor prenosu naelektrisanja za različite korake funkcionalizacije.

3.5.3 Elektrohemijska detekcija E. coli

Funkcionalizovane zlatne elektrode za detekciju *E. coli* na bazi antitela, izložene su rastućoj koncentraciji ćelija *E. coli* (ATCC 25922) u PBS puferu. Odgovarajući Nikvistovi dijagrami prikazani su na slici 3.15a. Rezultati pokazuju rastući trend impedanse sa povećanjem koncentracije bakterija.

Impedansna merenja fitovana su ekvivalentnim električnim kolom, prikazanim na unutrašnjem grafiku slike 3.15b i izračunati su odgovarajući elementi električnog kola. Predloženo ekvivalentno kolo uključuje pet elemenata: omski otpor rastvora elektrolita, R_{sol}; element konstantne faze, CPE, koji odražava nehomogenost sloja u prisustvu velikih entiteta; paralelno RC_{bakt.} kolo koje opisuje sloj bakterija vezan za površinu senzora; Varburgova impedansa, W, koja se odnosi na niskofrekventni deo spektra, gde difuzioni mehanizam kontroliše izmerenu impedansu i otpor prenosu naelektrisanja

 R_{ct} . Od ovih elemenata, R_{ct} i CPE zavise od dielektričnih i izolacionih karakteristika na razlednoj površini elektroda/elektrolit i odražavaju modifikaciju površine elektrode usled vezivanja antigena od strane antitela na površini elektrode. Kolo RC_{bakt.} je povezano na otpornik koji opisuje redoks probu i kolo koje opisuje razdelnu površinu između elektrode i kapi. Međutim, treba napomenuti da se za opisivanje bakterijskog sloja koristi klasični kondenzator. Osim toga, pošto je površina elektrode izuzetno hrapava na mikroskali, kao što pokazuje 3D profil, CPE se koristi za modelovanje razdelne površine između kapi i zlata. Glavna promena je povećanje otpora prenosu naelektrisanja R_{ct} koji je povezan sa fenomenom prenosa mase i/ili dielektričnim ili provodnim svojstvima uhvaćenih bakterijskih ćelija. Otpor prenosu naelektrisanja je, stoga, odabran da kvantifikuje detekciju bakterijskih ćelija. R_{ct} pokazuje rastući trend sa povećanjem količine ćelija *E. coli* i dobrom linearnom zavisnošću u opsegu od 10¹–10⁷ cfu/mL, slika 3.15b. Jednačina fitovanja *y* = 109,71*x* + 283,68 pokazuje dobru linearnu zavisnost sa R² od 0,9823.

Eksperimentalna granica detekcije bila je 10 cfu/mL dok je izračunata procenjena na 2 cfu/mL (prema IUPAC pravilima sa formulom (3S/d) gde je *S* standardna devijacija test merenja i *d* je osetljivost izvedena iz nagiba linearne krive). Ovako nizak limit detekcije uporediv je sa vrednostima dobijenim za detekciju *E. coli* korišćenjem naprednih elektrohemijskih biosenzora kao što je navedeno u tabeli 3.1, predloženih u novijim istraživanjima.



Slika 3.15: (a) Rezultati detekcije *E. coli* za koncentracije u opseg 10¹ - 10⁷ cfu/mL; (b) Rezultati fitovanja ekvivalentnim električnim kolom: Otpor prenosu naelektrisanja u funkciji koncentracije bakterija. Unutrašnji grafik: Ekvivalentno električno kolo korišćeno za fitovanje rezultata.

Selektivnost senzora ispitana je za *E. aerogenes* (gram-negativnu bakteriju, ATCC 13048) i *B. subtilis* (gram-pozitivnu bakteriju, PY79) kao nespecifične bakterije za imobilizovana antitela, slika 3.16. Relativna promena u R_{ct} uzrokovana različitim koncentracijama bakterija u odnosu na R_{ct} BSA sloja, δ , ukazuje da nije detektovan značajan signal za obe kontrolne bakterije u opsegu koncentracija od 10¹ cfu/mL do 10⁷ cfu/mL u poređenju sa povećanjem signala izmerenim sa 10¹ cfu/mL *E. coli*. Dakle, metoda pokazuje prihvatljivu specifičnost senzora.

Specifičnost detekcije

60 40 20 0 1 2 2 1 2 3 4 5 6 E. coli E. aerogenes B. subtilis 0 1 2 3 4 56

log E. coli konc. (cfu/mL)

Slika 3.16: Specifičnost detekcije biosenzora. Relativna promena signala $\delta(\%) = \frac{R_{ct}(cc) - R_{ct}(BSA)}{R_{ct}(BSA)}$ za različite koncentracije specifične *E. coli* i nespecifičnih bakterija *E. aerogenes* i *B. subtilis*.

3.5.4 Diskusija i zaključak

Tabela 3.1 sadrži poređenje metoda detekcije, dinamičkih opsega i limita detekcije prethodnih radova za detekciju *E. coli* sa predloženim biosenzorom na bazi zlatnih listića. Na osnovu prethodnih biosenzora za detekciju *E. coli* iz literature može se primetiti da su zlatne i ugljenične elektrode najčešće korišćene elektrode za biosenzorske platforme. U cilju povećanja specifične površine elektrode se često modifikuju nanočesticama, uz nekoliko radova sa kompozitnim nanomaterijalima.

Biosenzorske platforme realizovane sa zlatnom deponovanim fizičkom depozicijom, pokazuju manji dinamički opseg detekcije bakterija [157, 162, 163]. Ovako realizovane elektrode imaju malu specifičnu površinu za vezivanje bioprepoznatljivih elemenata i stoga dolazi do zasićenja pri manjim koncentracijama bakterija. Pored prethodno opisanih biosenzora, gde se detekcija bakterija vrši direktno na površini elektrode, za pojačanje signala i porast dinamičkog opsega detekcije, predloženi su i indirektni načini detekcije. Npr. funkcionalizacijom magnetnih čestica antitelima za detekciju bakterija omogućuje se specifično vezivanje bakterije na čestice, a vezivanjem sekundarnog antitela sa enzimom na bakteriju omogućuje kvantifikacija izmerene koncentracije bakterija. Naime, u opisanoj postavci meri se elektrohemijska aktivnost enzima, koja se povezuje sa koncentracijom detektovanih bakterija [164]. Kod ovakog načina detekcije, ciljana supstanca u uzorku obično se označava nekom vrstom markera ili fluorescentnog elementa koji omogućava senzoru da prepozna prisustvo bakterije kroz detekciju markera ili fluorescentnog elementa. Za ove potrebe koriste se antitela, enzimi ili drugi molekuli koji se vezuju za ciljnu supstancu i omogućavaju njenu detekciju. Često se kao nedostaci ovog pristupa navode dodatni koraci pri pripremi uzorka, kao i veća potrošnja vremena i resursa za realizaciju biosenzora.

Elektrode modifikovane nanočesticama imaju znatno veću specifičnu površinu, omogućavajući više potencijalnih mesta za vezivanje bioprepoznatljivog elementa i samim tim više mesta za detektovanje bakterija. Ovakav pristup povećava dinamički opseg detekcije i smanjuje limit detekcije, čime se povećava osetljivost analize. Naime, modifikacijom elektrode nanošesticama i direktnom detekcijom bakterija pomoću inovativnog bioprepoznatljivog elementa (peptidi u TIR proteinu) dobijen je nizak limit detekcije od svega 2 cfu/mL [165].

Pored porasta specifične površine, često se u radovima koriste magnetne nanočestica koje pored detekcije, omogućavaju i separaciju bakterija iz uzorka primenjenim magnetnim poljem. Na ovaj način ostvareni su veliki dinamički opsezi detekcije i dobri limiti detekcije od 10 cfu/mL [159, 166, 167]. Pored zlatnih elektroda i ugljenične elektrode pokazuju potencijal za detekciju bakterija, s nešto manjim limitima detekcije realizovanih biosenzora [168, 169]. Takođe, nedavna istraživanja ističu prednosti različitih poluprovodnih nanomaterijala [160] i nanokompozita za detekciju bakterija [170, 171]. Ovi materijali pokazali su se efikasnim u pogledu proširenja dinamičkog opsega i smanjenja limita detekcije. Međutim, proizvodnja ovih materijala često nije jednostavna, zahteva skupu opremu i komplikovane procese, što može predstavljati izazov za primenu u širem kontekstu.

Predloženo rešenje realizacije biosenzora na bazi zlatnih listića parira prethodnim istraživanjima i u pogledu osetljivosti i u pogledu dinamičkog opsega detekcije. Međutim, predloženo rešenje prevazilazi sva prethodna u pogledu cene i jednostavnosti izrade elektroda. Takođe, velika specifična površina omogućava osetljivu detekciju bakterija bez potrebe za dodatnim obogaćivanjem površine nanomaterijalima. Dodatna prednost predloženog pristupa jeste brza i direktna detekcija bakterija, bez korišćenja obeležavajućih elemenata pri detekciji. Štaviše, detekcija korišćenjem predloženih zlatnih elektroda je za pet redova veličine osetljivija od tradicionalnog imunološkog ELISA testa [172]. Dobijeni nizak limit detekcije potvrđuje klinički relevantne infektivne doze *E. coli* (100 ćelija), što sugeriše da se predloženi biosenzor može koristiti bez daljeg poboljšanja njegove osetljivosti.

Metod detekcije	Materijal	Dinamički	LD	Ref.
		opseg (cfu/mL)	(cfu/mL)	
Impedansa	Spaterovano zlato	$3 \times 10^2 - 3 \times 10^5$	300	[157]
Impedansa	Zlatni diskovi	10 - 10 ⁴	2	[162]
Impedansa	Vakuumsko deponovanje zlata	10 ¹ - 10 ⁴	10	[163]
Provodljivost	Zlatna elektroda modifikovana magnetnim nanočesticama	10 ¹ - 10 ⁵	10	[159]
Voltametrija	Zlato modifikovano magnetnim nanočesticama	$7,4 \times 10^5 - 10^7$	7,4×10 ⁵	[166]
Voltametrija kvadratnog talasa	Zlatne sito-štampane elektrode sa magnetnim nanočesticama	$10^1 - 10^7$	10	[167]
Impedansa	Zlatne sito-štampane elektrode modifikovane nanočesticama	$10^1 - 10^3$	2	[165]
Amperometrija	Ugljenične elektrode modifikovane zlatnim nanočesticama	10 ² - 10 ⁷	100	[168]
Amperometrija	Zlatne elektrode deponovane depozicijom elektronskim snopom	10 ² - 10 ⁸	100	[164]
Voltametrija	Ugljenične elektrode	$4,8 \times 10^1 - 10^5$	48	[169]
Voltametrija kvadratnog talasa	Dijamant dopiran borom sa nanočesticama silicijum dioksida	$10^1 - 10^4$	10	[160]
Voltametrija	ZnO-CuO nanokompozit na zlatu	10 ¹ - 10 ⁷	10	[171]
Ciklična voltametrija	Nanočestice $In_2O_3 - G - SiO_2 i$ $ZrO_2Ag - G - SiO_2$	10 ¹ - 10 ¹⁰	10	[170]
Impedansa	Zlatni listići	10 ¹ - 10 ⁷	2	Rezultati

Tabela 3.1: Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije *E. coli* iz prethodnih istraživanja.

Prethodno istraživanje detaljno opisuje korake funkcionalizacije elektrode, uključujući imobilizaciju specifičnih antitela na površinu elektrode. Karakterizacija ovih koraka pokazuje uspešnu modifikaciju površine elektrode, potvrđujući povećanu hidrofilnost i vezivanje bioloških molekula. Elektrohemijska detekcija *E. coli* uspešno je izvedena, sa veoma niskim limitom detekcije od 2 cfu/mL. Osetljivost ovog senzora je veoma niska, što ga čini veoma korisnim alatom za rano otkrivanje bakterijskih infekcija. Takođe, senzor je pokazao visoku specifičnost za *E. coli*, bez značajnog odgovora na druge bakterije koje su testirane.

Predstavljeni rezultati pokazuju da predloženi elektrohemijski senzor može da pruži brzu i pouzdanu detekciju *E. coli,* što je od suštinskog značaja za bezbednost hrane i kontrolu zaraznih bolesti. Predložena tehnologija može imati široku primenu u različitim industrijama doprinoseći poboljšanju zdravstvene zaštite i kvaliteta životne sredine.

3.6 Biosenzor za detekciju *S*. Typhimurium na bazi zlatnih listića

Salmonela se ističe kao visoko prepoznat patogen odgovoran za pojavu brojnih bolesti koje se prenose hranom [173, 174]. Podatak Svetske zdravstvena organizacije govori da je salmonela odgovorna za 58 incidenata u vezi sa bezbednošću hrane u 86 država [175]. Godišnji broj slučajeva salmoneloze u Evropskoj Uniji u 2021. iznosio je 60.050, sa 773 epidemija izazvanih hranom i 11.785 slučajeva hospitalizacije [176]. Infektivna doza salmonele potrebna za izazivanje bolesti koje se prenose hranom, koju treba da unese generalno zdrava osoba, relativno je visoka i procenjuje se na 10^5 cfu/g [177], ali taj prag je znatno niži u slučaju osetljive populacije (mladi, stari, trudnice, itd.). Salmoneloza se tradicionalno vezuje za konzumiranje hrane životinjskog porekla, konzumiranje mesa, mleka, jaja itd., a poslednjih godina javlja se porast i kontaminiranog voća i povrća [178, 179].

Salmonella Typhimurium (S. Typhimurium) najveći je izazivač bolesti među svim infekcijama uzrokovanim Salmonelom. Ovaj soj poznat je po izazivanju bolničkih infekcija i teških slučajeva trovanja hranom, često dovodeći do komplikacija koje ugrožavaju život i visoke stope smrtnosti. Konvencionalne metode detekcije za S. Typhimurium uključuju kultivisanje na agar pločama [180], enzimske imunološke test (ELISA) [181] i primenu polimerazne lančane reakcije (PCR) [182]. Iako se ove tehnike smatraju zlatnim standardima ili preporučenim metodama detekcije, postoji rastuća potreba za razvojem praktičnijih i preciznijih metoda ispitivanja koje mogu zadovoljiti potražnju za jeftinim testiranjem na terenu.

Elektrode na bazi zlatnih listića iskorišćene su za realizaciju biosenzora za *S*. Typhimurium, imobilizacijom antitela na površinu radne elektrode. Elektrohemijska karakterizacija urađena je nakon svakog koraka funkcionalizacije, a merenje kontaktnog



Slika 3.17: Šematski prikaz funkcionalizacije površine zlata za detekciju salmonele.

ugla iskorišćeno kao dodatna potvrda formiranog monosloja na elektrodi. Specifičnost detekcije ispitana je sa infektivnom dozom bakterija *B. subtilis* i *S. enteritidis*, a granična vrednost detekcije eksperimentalno određena.

3.6.1 Funkcionalizacija elektroda za detekciju S. Typhimurium

Biosenzor za detekciju *S*. Typhimurium realizovan je analogno kao prethodno opisani biosenzor za *E. coli*, samo što je umesto MPA korišćena 11-merkaptoundekanoična kiselina (MUA). MUA se koristi kao samoorganizujući monosloj koji ima dugačak alkanski lanac, koji se s jedne strane završava sa tiolom, a sa druge strane sa karboksilnom grupom. Ukratko, tiol sa jedne strane MUA lanca se vezuje za zlato, dok drugi kraj ostaje slobodan za vezivanje antitela. Aktivacija karboksilnih grupa vrši se NHS/EDC hemijom, a vezivanje antitela je omogućeno kroz vezivanje amino veze antitela za karboksilnu grupu, slika 3.17. U cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja za površinu elektrode, BSA protein je nanesen kao poslednji sloj funkcionalizacije pre nanošenja bakterija.

3.6.2 Karakterizacija koraka funkcionalizacije

U cilju utvrđivanja formiranja samoorganizujućeg monosloja na površini radne elektrode, odrađena su merenja kontaktnog ugla u cilju procene hidrofilnosti površine. Naime, kontaktni ugao je prvo izmeren za očišćenu, nefunkcionalizovanu elektrodu, a zatim nakon prekonočne inkubacije na 4 °C 10 mM MUA u etanolu. Kontaktni ugao kapi vode na površini zlata i nakon formiranja samoorganizujućeg monosloja opao je



Slika 3.18: Karakterizacije površine radne elektrode merenjem kontaktnog ugla pre i nakon nanošenja merkaptoundekanoične kiseline. (a) Zlato; (b) Zlato sa merkaptoundekanoičnom kiselinom.

sa 70,7(4)° na 9,6(4)°. Ovaj rezultat potvrđuje formiranje monosloja MUA i pokazuje povećana hidrofilna svojstva MUA, slika 3.18.

Model ekvivalentnog električnog kola korišćen je za kvantifikaciju procesa funkcionalizacije kroz poređenje R_{ct} parametra posle MUA, imobilizacije antitela (Ab) i BSA koraka, slika 3.19a. Predloženo ekvivalentno električno kolo konstruisano je na osnovu oblika krive u Nikvistovom dijagramu izmerene impedanse. Naime, kao što je prethodno opisano u poglavlju 3.1.4, proces difuzije jona do površine elektrode opisuje se Varburgovim elementom u kolu. Sloj MUA, stvara kapacitivan sloj na površini elektrode i zbog toga velika vrednost imaginarnog dela dominira u ukupnoj impedansi i na Nikvistovom dijagramu. Pri manjim učestalostima oblik grafika počinje da poprima oblik polukruga, međutim, nedovoljno da bi polukrug bio vidljiv, slika 3.19c. Iz tog razloga, predstavljeno kolo za fitovanje rezultata ne sadrži Varburgov element jer je njegov doprinos vidljiv na niskim učestalostima, koje su u ovom slučaju zamaskirane velikom kapacitivnošću MUA sloja.

Elektrohemijska karakterizacija slojeva odrađena je nakon svakog sloja funkcionalizacije sa 10 mM kalijum fero/fericijanidom, slika 3.19b. Rezultati otpora prenosu naelektrisanja pokazuju rastući trend R_{ct} koji dokazuje formiranje MUA, Ab i BSA slojeva na površini zlata, respektivno.

3.6.3 Elektrohemijska detekcija S. Typhimurium

Prethodno opisani biosenzor testiran je sa *S*. Typhimurium i dve nespecifične bakterije, gram-negativnu *S. enteritidis* i gram-pozitivnu *B. subtilis*. Detekcija *S*. Typhimurium testirana je serijom bakterijskih razblaženja u opsegu 10¹ - 10⁷ cfu/mL, dok su testovi specifičnosti rađeni sa infektivnom koncentracijom *S. enteritidis* i *B. subtilis*,



Slika 3.19: (a) Ekvivalentno kolo korišćeno za fitovanje rezultata; (b) Otpor prenosu naelektrisanja za različite korake funkcionalizacije; (c) Nikvistovi dijagrami za različite koncentracije bakterija; (d) Otpor prenosu naelektrisanja u funkciji različitih koncentracije salmonele.

 10^3 cfu/mL. Svaka koncentracija bakterija inkubirana je 20 minuta, a zatim isprana MiliQ vodom. EIS karakterizacija urađena je sa kapi redoks para 10 mM kalijum fe-ro/fericijanida od 80 μ L. Svako merenje ponovljeno je sa novom kapi redoks para tri puta i izračunate srednja vrednost i standardna devijacija.

Konačno, rezultati impedanse za različite koncentracije *S*. Typhimuriuma su predstavljeni na slici 3.19c. Rezultati pokazuju visoke vrednosti impedanse i R_{ct} u opsegu od nekoliko stotina kOhma. Senzor je ispitan sa koncentracijom bakterija do 10⁷ cfu/mL, pokazujući širok dinamički opseg detekcije bez indikacija o zasićenju na površini. Kalibraciona kriva predstavljena je kroz R_{ct} u odnosu na koncentraciju bakterija, slika 3.19d, sa rastućom količinom ćelija *S*. Typhimurium, prikazujući linearni trend sa jednačinom $y = 70, 891x + 146, 29, i R^2$ vrednošću od 0,9276.

Isti pristup korišćen je za ispitivanje specifičnosti detekcije za *B. subtilis* i *S. enteritidis*. Zbog male razlike između R_{ct} parametra između različitih elektroda, relativna promena R_{ct} u odnosu na BSA funkcionalizovanu GLE, δ (izračunato u %), upoređena je za različite koncentracije specifičnih i nespecifičnih bakterija, slika 3.20. Rezultati pokazuju da je predloženi biosenzor eksperimentalno detektovao koncentraciju 10² cfu/mL *S*. Typhimurium, što je manje od infektivne doze ove bakterije.



Slika 3.20: Specifičnost detekcije biosenzora.

3.6.4 Diskusija i zaključak

U tabeli 3.4 predstavljene su metode detekcije na bazi razvijenih biosenzora, njihovi dinamički opsezi i limiti detekcije za *S*. Typhimurium.

Inovativni pristupi realizovani su u prethodnim istraživanjima za detekciju bakterija. Naime, novija istraživanja predlažu polimerne filmove sa kalupom utisnutih bakterija u filmu za selektivnu detekciju bakterija [183]. Elektrohemijsko utiskivanje pojedinačnih ćelija *S*. Typhimurium sprovedeno je formiranjem homogenog polimernog sloja na površini elektrode. Uklanjanje utisnutih bakterijskih ćelija iz ovog polimernog matriksa stvara specifičan kalup za vezivanje bakterija, koji se koristi za njihovo specifično prepoznavanje (ponovno vezivanje). Cikličnom voltametrijom urađena je kvantifikacija vezanih mesta bakterija i na ovaj način ostvaren je širok dinamički opseg detekcije i dobar limit detekcije od 47 cfu/mL.

Druge metode za detekciju *S*. Typhimurium, predlažu pojačanje elektrohemijskog signala pomoću ferocena, čiji se atom gvožđa reverzibilno može oksidovati i redukovati. Elektrohemijski biosenzor zasnovan na ferocenu (Fc)-funkcionalizovanim nanokompozitima konstruisanim za pojačanje elektrohemijskog signala za detekciju *S*. Typhimurium. Magnetne čestice u kombinaciji sa antitelom korišćene su za hvatanje ciljanih bakterija, a ferocen korišćen kao signalni marker pri testiranju. Ovaj biosenzor pokazao je nisku granicu detekcije od 3 cfu/mL i širok dinamički opseg detekcije [184].

Razvijeni su i elektrohemijski biosenzori koji koriste magnetnu separaciju bakterija detektovanih magnetnim nanočesticama sa antitelima. Oba pristupa koriste sličan princip obeležavanja bakterija sekundarnim antitelima sa enzimom. Impedansni biosenzor kombinuje magnetne nanočestice sa antitelima i njihovo obeležavanje sekundarnim antitelima sa enzimom, postižući širok dinamički opseg detekcije *S*. Typhimurium sa niskim limitom detekcije od 10^1 cfu/mL [185]. Slično, elektrohemijski biosenzor koristi zlatne nanočestice dispergovane u hitozanskom hidrogelu i sekundarno antitelo sa enzimom kao marker za označavanje bakterija i detekciju signala diferencijalne pulsne voltametrije koji potiče od enzima. Ovaj senzor takođe ostvaruje širok linearni opseg sa niskom granicom detekcije od 5 cfu/mL [186]. Sličan princip obeležavanja bakterija sekundarnim antitelom koristi se i za detekciju na ugljeničnoj elektrodi modifikovanoj magnetnim nanočesticama, gde se sekundarno antitelo sa zlatnim nanočesticama detektuje diferencijalnom pulsnom voltametrijom [187].

Pored antitela, često se u literaturi pojavljuju i aptameri kao bioprepoznatljivi elementi. Aptameri predstavljaju oligonukleotide, sintetisane za specifičnu detekciju željene bakterije. Biosenzor na bazi ugljeničnih elektroda modifikovanim zlatom i nanoporoznim zlatom pokazao se pogodnim za detekciju *S*. Typhimurium u širokom opsegu od $6,5 \times 10^2$ do $6,5 \times 10^8$ cfu/mL, sa granicom detekcije od 1 cfu/mL [188]. Pomenute modifikacije značajno utiču na povećanje specifične površine senzora, a samim tim i na dobre performanse detekcije. Još jedna od direktnih metoda detekcije pomoću aptamera omogućena je konjugacijom aptamera i kopolimera na površini elektrode [189]. Ovaj pristup pokazao je dobar dinamički opseg i limit detekcije.

U poređenju sa prethodno opisanim biosenzorima, predloženi biosenzor na bazi zlatnih listića za detekciju *S*. Typhimurium ima velik dinamički opseg detekcije i u tom pogledu je jednako dobar kao i senzori predstavljeni u tabeli 3.4, dok mu je limit detekcije nešto lošiji u poređenju sa drugim senzorima. Međutim, predloženo rešenje predstavlja direktan metod detekcije bakterija i prevazilazi sve opisane senzore u pogledu jednostavnosti i cene izrade. Iako je limit detekcije nešto manji od prethodno opisanih senzora, on je i dalje značajno niži od doze bakterija koja može da izazove infekciju.

Konačno, predloženi biosenzori na bazi zlatnih listića predstavljaju perspektivnu opciju za ekonomičnu i brzu izradu senzora za detekciju bakterija, uključujući *E. coli* i *S.* Typhimurium, s veoma širokim dinamičkim opsegom detekcije i niskim limitom detekcije koji su daleko ispod infektivnih doza. Rezultati istraživanja pokazuju odličnu linearnost i visoku specifičnost u detekciji i kao dodatna prednost, realizovani biosenzori pokazuju performanse koje su jednake ili bolje od biosenzora baziranih na naprednim nanomaterijalima. Na ovaj način postignute su bolje ili jednako dobre performanse, pri čemu su izbegnuti kompleksni proizvodni procesi i visoki troškovi.

Tabela 3.2: Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije S. Typhimurium iz				
prethodnih istraživanja				

Metod detekcije	Materijal	Dinamički	LD	Pof
		opseg (cfu/mL)	(cfu/mL)	Kel.
Ciklična voltametrija	Zlatne sito-štampane elektrode sa kalupnim polimerom za detekciju bakterija	10 ² - 10 ⁹	47	[183]
Ciklična voltametri- ja/Diferencijalna pulsna voltametrija	Sito-štampane ugljenične elektrode sa nanokompozitom ferocena	10 ¹ - 10 ⁷	3	[184]
Impedansa	Magnetna separacija magnetnih nanočestica sa antitelima	$10^1 - 10^6$	10	[185]
Diferencijalna pulsna voltametrija	Ugljenična elektroda modifikovana hidrogelom sa zlatnim nanočesticama	10 ¹ - 10 ⁵	5	[186]
Diferencijalna pulsna voltametrija	Ugljenična elektroda sa magnetnim česticama	10 ³ - 10 ⁶	143	[187]
Ciklična voltametri- ja/Impedansa	Ugljenične elektrode sa elektrodeponovanim zlatom i nanoporoznim zlatom	6,5×10 ² - 6,5×10 ⁶	1	[188]
Impedansa	Sito-štampane zlatne elektrode modifikovane kopolimerom	10 ² - 10 ⁸	3	[189]
Impedansa	Elektroda na bazi zlatnih listića	10 ² - 10 ⁷	71	Rezultati

3.7 Biosenzor za detekciju tumor biomarkera HER2 na bazi zlatnih listića

HER2 je proteinski receptor koji igra ključnu ulogu u regulaciji rasta i deobe ćelija. Kod zdravih osoba, prisustvo ovog receptora je od suštinskog značaja za održavanje zdravog tkiva, ali mutacije koje dovođe do prekomerne ekspresije HER2 receptora povezane su sa agresivnim oblicima karcinoma dojke. Koncentracija HER2 tumor biomarkera u krvi zdravih osoba nalazi se u opsegu 4 - 14 ng/mL, dok se kod pacijentkinja sa karcinomom dojke nalazi u opsegu 15 - 75 ng/mL [190]. Ovaj podatak koristi se za dijagnostiku i nadzor pacijentkinja u lečenju. Pacijentkinje se povišenim nivoom HER2 biomarkera ulaze u protokol lečenja sa Herceptinom. Herceptin je monoklonalno antitelo posebno dizajnirano da cilja HER2 receptore na površini tumorskih ćelija i blokira ih od primanja signala rasta. Otkriće ovog biomarkera i razvoj metoda za njegovu detekciju predstavljaju značajan korak ka personalizovanom pristupu u dijagnostici i lečenju pacijentkinja sa ovom bolešću.

Istraživanja i detekcija HER2 biomarkera je od višestrukog značaja za pacijentkinje, s obzirom na to da prisustvo HER2 pozitivnog statusa značajno utiče na prognozu i terapijski pristup karcinomu dojke. Pacijentkinje sa HER2 pozitivnim karcinomom dojke često imaju agresivniji oblik bolesti i lošiju prognozu u poređenju sa HER2 negativnim pacijentkinjama. Dakle, rano otkrivanje ovog biomarkera omogućava bržu i ciljanu terapiju. Ovo smanjuje neželjene efekte terapije i povećava šanse za uspešno lečenje. Takođe, istraživanje HER2 biomarkera doprinosi razvoju novih terapijskih agenasa i poboljšava razumevanje molekularnih mehanizama karcinoma dojke [191].

U okviru doktorske disertacije razvijen je biosenzor na bazi zlatnih listića za detekciju tumor biomarkera HER2. Naime, inovativan vid imobilizacije antitela na površini zlata, posredstvom proteina L, kao i osetljivost detekcije ispitani su na komercijalnim zlatnim sito-štampanim elektrodama i elektrodama na bazi zlatnih listića. Potvrda vezivanja antigen-antitelo urađena je pomoću fluorescentnog testa, a vezivanje proteina L za samoorganizujući sloj merkaptoundekanoične kiseline na površini zlatne elektrode potvrđen pomoću Raman spektroskopije. Inicijalno, u cilju ispitivanja uticaja geometrije na performanse senzora, urađena je karakterizacija komercijalnih sito-štampanih elektroda, planarnih elektroda na bazi zlatnih listića i elektroda na bazi zlatnih listića integrisanih u mikrofluidičnu komoru, svaka od njih sa radnom elektrodom prečnika 4 mm. Pomenute elektrode upoređene su u pogledu elektroaktivne površine i faktora hrapavosti. U nastavku eksperimenata, urađeno je poređenje performansi detekcije planarnih elektroda na bazi zlatnih listića i elektroda na bazi zlatnih listića integrisanih u mikrofluidičnu komoru u pogledu planarne (trodimenzionalnoj, 3D) postavke elektroda. Konačno, planarne elektrode na bazi zlatnih listića i komercijalne, sito-štampane elektrode upoređene su u pogledu osetljivosti detekcije tumor biomarkera HER2, gde su elektrode na bazi zlatnih listića pokazuju veću osetljivost detekcije HER2 tumor biomarkera. Potencijal primene prethodno realizovanog senzora ispitan je za detekciju tumor biomarkera HER2 u ćelijskom medijumu.

3.7.1 Ispitivanje uticaja tehnologije izrade i geometrije na performanse senzora

U cilju ispitivanja uticaja tehnologije izrade elektroda i geometrije elektroda na osetljivost detekcije, ispitane su komercijalne planarne zlatne elektrode realizovane sito-štampom (Dropsens 220AT, Metrohm), planarne elektrode na bazi zlatnih listića¹⁵ i elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru (neplanarni dizajn).

Dizajnovi elektroda predstavljeni su na slici 3.21. Slika 3.21a predstavlja komercijalnu Dropsens 220AT elektrodu realizovanu tehnologijom sito-štampe. Dropsens elektroda sadrži radnu i pomoću elektrodu koje su napravljene od zlatne paste, dok je referentna elektroda napravljena od srebro/srebrohloridne (Ag/AgCl) paste. Slika 3.21b predstavlja troelektrodnu planarnu elektrodu na bazi zlatnih listića, gde je troelektrodni sistem realizovan u zlatu. Slika 3.21c predstavlja trodimenzionalni sistem, gde su elektrode na bazi zlatnih listića integrisane sa gornje i donje stanje mikrofluidične komore. Naime, u gornjem sloju, na PVC podlozi, realizovana je radna elektroda, koja zatvara mikrofluidični rezervoar sa gornje strane. U donjem sloju realizovane su referentna i pomoćna elektroda, koje sa donje strane zatvaraju mikrofluidični rezervoar. Uvođenjem zlatne referentne elektrode na bazi zlatnih listića izbegnuto je korišćenje eksterne referentne elektrode. Fotografije realizovane planarane i 3D strukture predstavljene su na slikama 3.21d i e, respektivno. Karakterizacija opisane tri elektrode urađena je u pogledu sastava, efektivne površine i stabilnosti signala kroz eksperimente ciklične voltametrije. Elektrode na bazi zlatnih listića, u planarnoj i 3D konfiguraciji, upoređene su po pitanju osetljivosti za različite koncentracije redoks para kalijum fero/fericijanida pripremljenim u vodi, kalijum hloridu i PBS puferu.

¹⁵engl. *gold leaf electrode* (GLE)



Slika 3.21: (a) Komercijalna sito-štampana elektroda Dropsens 220AT; (b) Planarna elektroda na bazi zlatnih listića; (c) Integrisan sistem elektroda na bazi zlatnih listića u mikrofluidični rezervoar; (d) Realizovani planarni dizajn; (e) Realizovani 3D dizajn.

Ciklična voltametrija u 0,5 M sumpornoj kiselini urađena je na komercijalnoj i elektrodama na bazi zlatnih listića u cilju utvrđivanja sastava i karakterizacije površine zlata. Rezultati na slici 3.22a pokazuju da svaka od elektroda pokazuje karakteristične pikove oksidacije i redukcije zlata, na 0,9 V i 0,5 V u odnosu na sito-štampanu Ag/AgCl referentnu elektrodu. Potencijali oksidacije i redukcije zlata kod elektroda na bazi zlatnih listića se razlikuju zbog različitih referentnih elektroda, tj. Ag/AgCl elektrode u slučaju komercijalne elektrode i zlatne referentne elektrode kod elektroda na bazi zlatnih listića. Takođe, oblik voltamograma kod elektroda na bazi zlatnih listića pokazuje uske i oštre pikove, što ukazuje na brzu elektrohemijsku reakciju, dok su pikovi oksidacije i redukcije zlata kod komercijalnih elektroda širi što ukazuje na sporiju reakciju, maseni transport ili difuziju u elektrohemijskoj ćeliji.

U cilju ispitivanja efektivne površine komercijalne zlatne sito-štampane elektrode, planarne elektrode na bazi zlatnih listića i integrisanih elektroda u mikrofluidični rezervoar, odrađena je serija eksperimenata sa 10 mM kalijum fero/fericijanidom pripremljenim u PBS puferu. Serija voltamograma napravljena je različitim brzinama skeniranja u opsegu 0,1 V/s - 1 V/s sa korakom 0,1 V/s, slika 3.22b. Svaka od elektroda pokazuje jednake pikove oksidacije i redukcije kompleksa gvožđa i pravilan rast struje oksidacije i redukcije u zavisnosti od brzine skeniranja. Analizom rezultata sa prethodnih grafika, predstavljeni su pikovi oksidacije kompleksa gvožđa u zavisnosti od korena brzine skeniranja, slika 3.22c. Rezultati pokazuju linearan porast struje oksidacije sa korenom brzine skeniranja. Naime, sa porastom brzine skeniranja, veća promena potencijala se dešava u vremenu, odnosno veća energija se predaje jonima u rastvoru, što rezultuje većom strujom. Drugim rečima, veća brzina skeniranja smanjuje vreme koje je potrebno jonima da difunduju do elektrode, i samim tim više njih stiže do elektrode gde se dešava reakcija. Na ovaj način dobija se porast struje sa korenom brzine skeniranja, što ukazuje da su procesi na površini elektrode kontrolisani difuzijom.

Na osnovu Randles-Ševičkove jednačine predstavljene izrazom (3.1.9) može se izračunati elektroaktivna površina elektroda iz nagiba krive zavisnosti struje od korena brzine skeniranja, prema izrazu:

$$A = \frac{k}{2,69 \cdot 10^5 \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot n^{3/2}}$$
(3.7.1)

gde *k* predstavlja koeficijent pravca prave, 2,69·10⁵ $\frac{C}{mol\sqrt{V}}$ konstantu, *C* koncentracija jona, *n* broj elektrona koji učestvuje u polureakciji i *D* difuzioni koeficijent. Tabela 3.3 predstavlja izračunate elektroaktivne površine elektroda na osnovu izraza (3.7.1). Pored elektroaktivne površine, procenjen je i faktor hrapavosti elektroda, definisan kao odnos geometrijske i elektroaktivne površine elektrode. Naime, s obzirom na to da sve elektrode imaju jednaku geometrijsku površinu radne elektrode jednaku 0,12 cm², faktor hrapavosti opisuje koji udeo površine radne elektrode učestvuje u reakciji, odnosno doprinosi signalu. Rezultati prikazani u tabeli pokazuju da elektrode na bazi zlatnih listića imaju veću elektroaktivnu površinu u poređenju sa komercijalnim sitoštampanim elektrodama, što pokazuje i faktor hrapavosti koji je veći kod elektroda na bazi zlatnih listića. Kod komercijalnih elektroda faktor hrapavosti iznosi 0,58, što ukazuje da elektroda sadrži i druge komponente, najverovatnije organske komponente paste koja se koristi u sito-štampi, koje ne učestvuju u reakciji na površini. S druge strane, kod elektroda na bazi zlatnih listića ovaj faktor je veći ili jednak jedinici, što potvrđuje njihovu hrapavost i veliku specifičnu površinu.

Tabela 3.3: Poređenje elektroaktivnih površina i faktora hrapavosti komercijalne Dropsens elektrode, planarne elektrode na bazi zlatnih listića i elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru (3D).

Proračun/Elektroda	Dropsens	GLE 4 mm	GLE 4 mm 3D
Elektroaktivna površina (cm ²)	0,07	0,16	0,12
Faktor hrapavosti	0,58	1,3	1

Konačno, elektrode su ispitane u pogledu stabilnosti tokom 25 ciklusa ciklične voltametrije u 10 mM kalijum fero/fericijanidom u PBS puferu. Rezultati na graficima 3.22d pokazuju stabilan signal u slučaju sve tri elektrode sa jasnim pikovima oksidacije i redukcije gvožđa unutar redoks para.



Slika 3.22: (a) Voltamogram zlata u 0,5 M sumpornoj kiselini; (b) Randles-Ševičkov dijagram u 10 mM kalijum fero/ferijcijanidu u PBS puferu; (c) Pikovi oksidacije i redukcije u funkciji korena brzine skeniranja; (d) Stabilnost signala tokom 25 ciklusa u 10 mM kalijum fero/fericijanidu u PBS puferu.

U cilju ispitivanja osetljivosti elektroda, pripremljene su različite koncentracije kalijum ferocijanida / fericijanida u 10 mM kalijum hloridu, 10 mM PBS puferu i dejonizovanoj vodi¹⁶. Redoks par je pripremljen kao mešavina kalijum ferocijanida / fericijanida u koncentracijama od 0,5 mM, 1 mM, 5 mM i 10 mM. EIS karakterizacija urađena je kako za svaku koncentraciju, tako i u čistom rastvoru (unutrašnji grafici na slici 3.23).

¹⁶engl. deionized water, DI

Rezultati merenja pokazuju padajući trend impedanse sa porastom koncentracije redoks para, slika 3.23. Slike 3.23a i 3.23b, prikazuju Nikvistove dijagrame redoks para pripremljenih u DI vodi i 10 mM KCl, gde se vide različite vrednosti otpora rastvora, odnosno svaka koncentracija redoks probe ima različiti realni deo impedanse. S druge strane, za redoks par pripremljen u 10 mM PBS puferu, realni deo impedanse ima slične vrednosti za različite koncentracije. Ova doslednost može biti pripisana svojstvima PBS pufera, koji efikasno odoleva promenama pH vrednosti.

Poređenjem oblika krivih na Nikvistovim dijagramima za planarnu i 3D konfiguraciju, slike 3.23a i b, može se primetiti dominantnost difuzionog repa kod 3D konfiguracije u poređenju sa planarnom. Naime, geometrija tečne faze kod planarnih elektroda je polusferna, gde se radna i pomoćna elektroda nalaze na bazi polusfere, dok u slučaju 3D elektrode, oblik tečne faze odgovara cilindru koji je sa gornje i donje strane zatvoren radnom i pomoćnom elektrodom. Iako je zapremina kapi koja pokriva radnu i pomoćnu elektrodu u slučaju planarne i 3D konfiguracije ista, sama geometrija tečne faze obezbeđuje lakšu difuziju kod 3D dizajna.



Slika 3.23: Nikvistovi dijagrami za različite koncentracije redoks para u vodi, kalijum hloridu i PBS puferu. Unutrašnji grafici predstavljaju odziv senzora za čist elektrolit bez redoks para; (a) Planarna elektroda na bazi zlatnih lisića; (b) Elektrode na bazi zlatnih listića integrisane u mikrofluidičnu komoru.

U nastavku istraživanja ispitan je inovativan metod funkcionalizacije elektroda posredstvom proteina L u cilju realizacije biosenzora za detekciju tumor biomarkera HER2.
3.7.2 Funkcionalizacija elektroda za detekciju HER2

Šematski prikaz procesa funkcionalizacije radne elektrode predstavljen je na slici 3.24. Kao što je opisano kod senzora za detekciju *S*. Typhimurium, samoorganizujući monosloj merkaptoundekanoične kiseline formira se na površini zlata pomoću tiolne grupe na jednom kraju lanca. Karboksilna grupa sa druge strane MUA obezbeđuje mogućnost vezivanja proteina L (pL) na MUA sloj, aktiviranjem karboksilnih grupa primenom NHS/EDC hemije. Konačno, uzimajući u obzir afinitet pL za vezivanje za IgG antitela, vezivanje Trastuzumab - Tmab (Herceptin) sa pL, posebno omogućavajući detekciju HER2 tumor biomarkera, kao što je prikazano na slici 3.24. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje, goveđi serum albumin (BSA) je uveden kao blokator u procesu.

Protokol funkcionalizacije podrazumeva prekonoćnu inkubaciju 1 mM MUA pripremljene u apsolutnom etanolu na 4 °C. Nanošenje kapi zapremine 1 μ L vrši se na radnu elektrodu, a inkubacija se odvija u mraku. Nakon prekonoćne inkubacije, ispiranje elektrode vrši se etanolom, a potom i DI vodom. Aktivacija karboksilnih grupa MUA, odrađena je nanošenjem 10 μ L 50 mM NHS/50 mM EDC pripremljenih u PBS puferu, na radnu elektrodu jednočasovnom inkubacijom u mraku. Elektroda se zatim ispira DI vodom. Aktivirane karboksilne grupe imaju afinitet ka vezivanju amino grupe proteina, pa se u sledećem koraku funkcionalizacije nanosi 10 µL proteina L koncentracije 0,1 mg/mL i inkubira 1 h. Nakon inkubacije i ispiranja pL, na elektrodu se nanosi BSA koncentracije 50 µg/mL i inkubira 20 min u mraku u cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja i nespecifičnog doprinosa signalu. U narednom koraku, u cilju saturacije površine elektrode antitelom specifičnim za tumor biomarker HER2 herceptinom (Tmab), ponavljajuće inkubacije rastućih koncentracija Tmab u PBS puferu rađene su tokom 20 min. Konačno, ovako funkcionalizovana elektroda izložena je rastućoj koncentraciji tumor biomarkera HER2 u cilju ispitivanja potencijala detekcije realizovanog biosenzora.



Slika 3.24: Šematski prikaz procesa funkcionalizacije površine zlata.

Inicijalna potvrda vezivanja pL za antitelo Tmab, kao i antitela Tmab i tumor biomarkera HER2, urađena je fluorescentnim testom, gde se svaki događaj vezivanja antigen-antitelo obeležava sekundardnim antitelom sa fluorescentim elementom. Na taj način omogućena je potvrda vezivanja antigena i antitela, kao i kvantifikacija signala za različite koncentracije vezujućeg antigena.

3.7.3 Flourescentni test

Kao što je opisano, prvobitno testiranje vezivanja pL i antitela Tmab, kao i antitela Tmab i tumor biomarkera HER2, urađeno je fluorescentnim testom da bi se potvrdilo vezivanje bioprepoznatljivih elemenata. Postupak je urađen na ploči sa 96 bunarčića, a merenja su vršena spektrofotometrom za čitanje ploča.

Incijalno, bunarčići ploče obloženi su sa 0,5 μ g/mL pL ili 0,5 μ g/mL HER2 i inkubirani preko noći na 4°C. Ispiranje ploče je obavljeno 4 puta sa 200 μ L pufera za ispiranje (PBS + 0,05% Tween20 (Sigma Aldrich)). U narednom koraku, dodato je 100 μ L antitela Tmab i inkubirano 2 h na sobnoj temperaturi. Postupak ispiranja je ponovljen 4 puta sa 200 μ L pufera za ispiranje, a sekundarno antitelo dodato je u sledećem koraku. Naime, 100 μ L 1:1000 razblaženog kozjeg anti-humanog (AlexaFluor 488, anti-humani IgG) dodato je u bunarčiće ploče i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. Ploča je isprana 6 puta sa 200 μ L pufera za ispiranje i merenja su izvršena spektrofotometrom. Slika 3.25 sadrži rezultate fluorescencije u odnosu na koncentraciju Tmab u opsegu od 0,015 mg/mL do 1 mg/mL. Oba rezultata pokazuju događaje vezivanja: S-kriva je korišćena za fitovanje rezultata, pokazujući linearni trend u opsegu koncentracija od

0,03 mg/mL do 0,25 mg/mL, nakon čega se može primetiti zasićenje signala i za pL i HER2.



Slika 3.25: (a) Fluorescentni test vezivanja antigen HER2 - antitelo Tmab; (b) Fluorescentni test vezivanja pL - antitelo Tmab.

Prethodno prikazani rezultati potvrđuju vezivanje antitela Tmab za pL i HER2, što omogućava vezivanje i na površini elektrode. U narednom koraku, primenom Raman spektroskopije, potvrđeno je vezivanje MUA za površinu zlata, kao i pL za samoogranizujući sloj MUA na površini zlata. Na taj način je svaki od koraka vezivanja potvrđen i pored elektrohemijske detekcije, koja će biti opisana u nastavku.

3.7.4 Raman spektroskopija površine biosenzora

Ramanska spektroskopija predstavlja jednu od brzih tehnika analize materijala jer ne zahteva gotovo nikakvu pripremu uzorka. Pored jednostavnosti izvođenja eksperimenta, analizom spektara može se ustanoviti veliki broj informacija o strukturi materijala vezanih za njegovu uređenost, morfologiju i prisutne faze. Pri ramanskom rasejanju foton biva neelastično rasejan na kristalu formiranjem ili anihilacijom fonona. Ramansko rasejanje prvog reda uzrokovano je od strane fonona sa talasnim vektorom u centru Briluenove zone zbog očuvanja impulsa u procesu rasejanja svetlosti. Fononi predstavljaju "potpis" hemijskih veza i u spektru prvog reda može se utvrditi prisutnost faza, dok s druge strane Ramansko rasejanje drugog reda je često slabijeg intenziteta i daje mogućnost analize kristalne ili amorfne strukture materijala.

Pri primeni Ramanske spektroskopije za karakterizaciju koraka funkcionalizacije biosenzora, utvrđuje se postojanje novoformiranih veza za svaki korak funkcionalizacije na površini elektrode. U eksperimentalnom delu snimljeni su spektri zlata naparenog na staklenu podlogu, nakon nanošenja samoorganizujućeg sloja MUA i nakon vezivanja pL za površinu. Snimanja su vršena laserom talasne dužine 532 nm u opsegu talasnih brojeva od 100 do 2000 cm⁻¹, snagom 9 mW i 10 snimanja sa vremenom ekspozicije od 20 s. Za snimanje je korišćen Raman Horiba XploRA Plus.

U cilju utvrđivanja formiranog samoorganizujućeg monosloja na zlatu potrebno je utvrđivanje veze između tiolne grupe MUA i metala. Ranija istraživanja pokazuju da se -SH grupa vezuje za zlato hemisorpcijom [192, 193]. Pik koji potiče od Au-S veze detektovan je u spektru na 260 cm⁻¹, što je u skladu sa prethodnim objavljenim rezultatima [194–196], slika 3.26a. Za analizu Raman spektra nakon nanošenja pL, odrađena je dekonvolucija pikova u oblasti talasnih brojeva 1200 - 1800 cm⁻¹ u cilju detekcije amino grupa proteina L.

Sa Ramanovom spektroskopijom, nekoliko vibracionih modova može se koristiti za detekciju i analizu strukture proteina. Sledeća tri pika su od glavnog interesa za identifikaciju različitih potvrda proteinske strukture: amid I (vibracija istezanja C=O u opsegu 1600–1690 cm⁻¹), amid II (1480–1580 cm⁻¹) i amid III (oba povezana sa spregnutim C–N istezanjem i N–H savijajuće vibracije peptidne grupe 1230–1300 cm⁻¹). Talasni broj amidnih modova odražava strukturu glavnog polipeptidnog lanca bez obzira na bočne grupe [197]. Rezultati predstavljeni na slici 3.26b prikazuju pojavljivanje dva karakteristična pika na 1556 cm⁻¹ i na 1756 cm⁻¹ nakon nanošenja pL, što odgovara pikovima amid II i amid III veza.



Slika 3.26: (a) Raman spektroskopija zlata, zlata sa MUA, zlata sa MUA i proteinom L u opsegu od 100 do 2000 cm⁻¹; (b) Dekonvolucija pikova u u opsegu od 1200 do 1800 cm⁻¹ za zlato sa MUA, i nakon nanošenja pL.

Primenom Raman spektroskopije na uzorku zlata naparenog na staklenu podlogu, potvrđeno je postojanje veza između MUA i zlata, kao i imobilizacija pL na površini. Na ovaj način potvrđeno je postojanje veza funkcionalizacije na površini pre same elektrohemijske detekcije.

3.7.5 Elektrohemijska detekcija HER2

U cilju realizacije elektrohemijskog biosenzora za detekciju tumor biomarkera HER2, elektrohemijski je ispitano vezivanje svakog od slojeva funkcionalizacije za površinu radne elektrode, kao što je opisano u poglavlju 3.7.2. Elektrode na bazi zlatnih listića upoređene su sa komercijalnim Dropsens elektrodama u pogledu osetljivosti i dinamičkog opsega detekcije.

Rezultati na slici 3.27a i d, predstavljaju rezultate elektrohemijske karakterizacije elektrohemijskom impedansnom spektroskopijom nakon svakog od koraka funkcionalizacije za elektrodu na bazi zlatnih listića (GLE) i komercijalnu Dropsens elektrodu (DS). U cilju dobijanja potpunog polukruga sa difuzionim repom, koncentracija od 1 mM MUA korišćena je u slučaju elektroda na bazi zlatnih listića, dok je u slučaju DS elektroda korišćena koncentracija od 10 mM. U oba slučaja nakon nanošenja samoorganizujućeg sloja MUA, nanosi se 100 μ g/mL pL, a zatim i 50 μ g/mL BSA pripremljenim u PBS puferu. U oba slučaja, DS i GLE elektrode, pokazuju rast impedanse ukazujući na formiranje svakog od slojeva funkcionalizacije na površini.

Dalja procedura funkcionalizacije podrazumeva uzastopne inkubacije rastućih koncentracija Herceptina u opsegu 0,1 ng/mL do 1000 ng/mL, slika 3.27. Sa porastom koncentracije Tmab, raste i broj vezanih antitela za pL na površini elektrode, što se ogleda porastom impedanse. Konačno, ovako funkcionalizovana elektroda izložena je rastućoj koncentraciji tumor biomarkera HER2 u opsegu 0,1 ng/mL do 1000 ng/mL. Rezultati na slici 3.27c i f prikazuju rastući trend impedanse za porast koncentracije HER2, s tim da se u slučaju DS elektroda jasno uočava saturacija za koncentracije iznad 10 ng/mL, dok se kod elektroda na bazi zlatnih listića ne uočava saturacija ni za koncentraciju 1000 ng/mL.



Slika 3.27: (a) Koraci funkcionalizacije elektrode na bazi zlatnih listića; (b) Zasićenje elektrode na bazi zlatnih listića herceptinom (Tmab); (c) Detekcija tumor biomarkera

HER2 elektrode na bazi zlatnih listića; (d) Koraci funkcionalizacije Dropsens elektrode; (e) Zasićenje Dropsens elektrode herceptinom (Tmab); (f) Detekcija tumor biomarkera HER2 Dropsens elektrodom.

Konačno, rezultati su fitovani sa ekvivalentnim kolom predstavljenim na slici 3.3. Relativna promena signala izračunata je u odnosu na BSA funkcionalizovanu elektrodu za Tmab saturaciju, dok je za HER2 detekciju izračunata u odnosu na 1000 ng/mL Tmab. Rezultati na slici 3.28a pokazuju rastući trend sa porastom koncentracije antitela Tmab bez naznaka saturacije signala, dok se u slučaju komercijalne elektrode, slika 3.28a, saturacija javlja nakon 100 ng/mL. Odziv detekcije Tmab za GLE opisan je linearnom jednačinom $y = 39,978x + 62,195, R^2 = 0,9854$, dok je na Dropsens elektrodi odziv opisan sa $y = 14,118x + 17,774, R^2 = 0,9763$. Obe elektrode pokazuju dobru linearnost detekcije herceptina pomoću predložene konfiguracije. S druge strane, u slučaju detekcije tumor biomarkera, slika 3.28b, elektroda na bazi zlatnih listića pokazuje linearan rastući trend, $y = 12,145x + 24,589, R^2 = 0,9507$, dok se kod komercijalne elektrode kriva detekcije HER2 prikazuje tipičan sigmoidan oblik sa zasićenjem nakon 10 ng/mL.



Slika 3.28: Relativna promena signala elektrode na bazi zlatnih listića i komercijalnih Dropsens elektroda; (a) Za različite koncentracije herceptina (Tmab); (b) Za različite koncentracije tumor biomarkera HER2.

Prethodni rezultati pokazuju značajno bolje performanse detekcije senzora realizovanog pomoću elektroda na bazi zlatnih listića u poređenju sa komercijalnim elektrodama. U nastavku istraživanja, ispitana je specifičnost detekcije predloženog biosenzora sa nespecifičnim proteinima pripremljenim u PBS puferu. Takođe, finalna validacija specifičnosti detekcije odrađena je detekcijom tumor biomarkera u kompleksnoj matrici, ćelijskom medijumu, koji sadrži veliki broj nespecifičnih komponenata.

Grafik na slici 3.29 predstavlja upoređene odzive detekcije za različite koncentracije specifičnog biomarkera HER2 i nespecifičnih proteina kao što su antitelo za *E. coli*, BSA i fibrinogen (FBG), testirani u koncentraciji od 100 ng/mL. Predstavljeni rezultati pokazuju da je signal specifičnog biomarkera znatno veći u poređenju sa nespecifičnim, dok je odziv senzora za najmanju ispitanu koncentraciju od 0,1 ng/mL HER2 u nivou signala nespecifičnih proteina. U realnim uzorcima, retko se pronalaze velike koncentracije nespecifičnih proteina, tako da ovaj rezultat ne umanjuje potencijal detekcije predloženog senzora.



Specifičnost detekcije

Slika 3.29: Specifičnost detekcije HER2 senzora. Relativna promena otpora prenosu naelektrisanja izračunata je prema izrazu: $\delta(\%) = \frac{R_{ct}(cc) - R_{ct}(1000 \ ng/mL \ Tmab)}{R_{ct}(1000 \ ng/mL \ Tmab)}$

Sledeći korak u validaciji performansi senzora ispitan je za primenu biosenzora za detekciju u kompleksnoj matrici ćelijskog medijuma.

3.7.6 Detekcija HER2 u ćelijskom medijumu

Medijum za kultivaciju ćelija (Gibco CO₂ Independent Medium, Fisher Scientific) pripremljen je sa 10% seruma (Fetal Bovine Serum, Sigma), 1% antibiotika (Penicillin-Streptomycin, Sigma), 1% L-glutamina i 88% medijuma. Ovakav medijum razređen je u odnosu 1:10 sa DI vodom, a različite koncentracije tumor biomarkera HER2 pripremljene u opsegu od 0,1 ng/mL do 1000 ng/mL.

S obzirom na to da je medijum kompleksna matrica, gde postoji veliki broj nespecifičnih komponenata koje mogu prividno da doprinesu signalu i izazovu pogrešan utisak detekcije specifičnog biomarkera, kontrolni test zasićenja površine elektrode inkubacijom medijuma bez specifičnog biomarkera, odrađen je ponavljajućom inkubacijom medijuma na zasićenoj elektrodi. Naime, inicijalno zasićenje senzora odrađeno je tokom 2 h inkubacije medijuma bez tumor biomarkera, a nakon toga ponavljajuća inkubacija medijuma u toku 20 min urađena je da bi se potvrdila konstantnost signala bez tumor biomarkera, odnosno da bi se utvrdilo da doprinos signala potiče od specifičnog biomarkera, a ne od nespecifičnih komponenata medijuma, koji mogu ostati na površini usled elektrostatičkih ili drugih interakcija, slika 3.30. Grafik na slici 3.30 prikazuje relativnu promenu otpora prenosu naelektrisanja za ponavljajuće inkubacije medijuma na elektrodi u odnosu na elektrodu zasićenu inkubacijom tokom 2 h. Rezultati prikazuju konstantan signal nakon ponavljajuće inkubacije medijuma, što potvrđuje da je elektroda zasićena nespecifičnim komponentama iz medijuma i da doprinos porastu impedanse u eksperimentima sa specifičnim biomarkerom ne potiče od medijuma.





Slika 3.30: Kontrolna merenja sa ponavljajućom inkubacijom medijuma. Relativna promena otpora prenosu naelektrisanja izračunata je prema izrazu: $\delta(\%) = \frac{R_{ct}(cc) - R_{ct}(medijum)}{R_{ct}(medijum)}$

Finalna validacija detekcije tumor biomarkera u medijumu odrađena je inkubacijom tokom 20 min za rastuće koncentracije tumor biomarkera na elektrodi prethodno zasićenoj medijumom. Rezultati odziva senzora za različite koncentracije tumor biomarkera predstavljeni su na slici 3.31. Grafik na slici 3.31a prikazuje oblik Nikvistovog dijagrama bez difuzionog repa i iz tog razloga predloženo električno kolo za fitovanje rezultata, predstavljeno na unutrašnjem grafiku, ne sadrži Varburgov element. Takođe, rezultati pokazuju rastući trend impedanse za porast koncentracije tumor biomarkera HER2. Kriva zavisnosti relativne promene otpora prenosu naelektrisanja, predstavljena je na slici 3.31b, gde se vidi linearna zavisnost detekcije, opisana jednačinom $y = 16,62x + 29,765, R^2 = 0,9431$. Predstavljeni rezultati prikazuju odličan potencijal detekcije predloženog senzora i u kompleksnim uzorcima, poput ćelijskog medijuma.



Slika 3.31: (a) Nikvistovi dijagrami za različite koncentracije HER2 u medijumu; Unutrašnji grafik: Električno kolo za fitovanje rezultata; Tačke na grafiku predstavljaju merenja, dok kriva predstavlja fitovane rezultate; (b) Relativna promena otpora prenosu naelektrisanja u zavisnosti od koncentracije HER2 u medijumu.

3.7.7 Diskusija i zaključak

U okviru doktorske disertacije razvijen je senzor za detekciju tumor biomarkera HER2 na bazi novog načina imobilizacije Herceptina posredstvom proteina L. Vezivanje Herceptina i proteina L, kao i proteina L i HER2 potvrđeno je fluorescentnim testom. Imobilizacija samoorganizujućeg monosloja MUA potvrđena je Raman spektroskopijom, kao i vezivanje proteina L za karboksilne grupe MUA. Na taj način potvrđeno je vezivanje svih komponenata sloja bioprepoznatljivih elemenata i pre same elektrohemijske detekcije. Elektrohemijskom impedansnom spektroskopijom potvrđeno je vezivanje svake od komponenata na elektrodama na bazi zlatnih listića. Potencijal detekcije predloženog biosenzora validiran je detekcijom HER2 biomarkera u ćelijskom medijumu. Pored predstavljene primene senzora za detekciju HER2 biomarkera, predloženi senzor pokazuje i potencijal detekcije samih antitela (Herceptina) posredstvom proteina L, što može potencijalno imati primenu u farmaceutskoj industriji.

U okviru doktorske disertacije prvi put je upotrebljen protein L za orijentisanu imobilizaciju antitela na površini elektrode. Naime, direktna imobilizacija antitela na površini biosenzora u opštem slučaju ne garantuje optimalnu orijentaciju vezanih antitela. Iz tog razloga u literaturi su predložene imobilizacije proteina A i G, proteina bakterijskog porekla, koji se uglavnom koriste u prečišćavanju antitela kao kovalentno vezani za agarozu ili kao biokonjugovane nanočestice [198, 199]. Prednost proteina L u odnosu na proteine A i G ogleda se u njegovoj mogućnosti vezivanja pored monoklonalnih antitela i fragmenata antitela, s obzirom na region antitela za koji se vezuje

[200].

Kao što je rečeno u krvi zdravih osoba nalazi se u opsegu 4 - 14 ng/mL, dok se kod pacijentkinja sa karcinomom dojke nalazi u opsegu 15 - 75 ng/mL. Rezultati istraživanja pokazuju da je predloženi senzor na bazi zlatnih listića uspešno detektovao ove opsege koncentracija. Limit detekcije procenjen je na osnovu srednje vrednosti izmerenog signala bez biomarkera i standardne devijacije merenja. Naime dodavanjem trostruke vrednosti standardne devijacije srednjoj vrednosti signala bez biomarkera i procenjena na osnovu kalibracione krive. Limiti detekcije procenjeni su na 0,02 ng/mL u PBS puferu, dok je 0,03 ng/mL limit detekcije procenjen u medijumu što je značajno manje od vrednosti HER2 koja se detektuje kod zdravih osoba i kod HER2 pozitivnih pacijentkinja.

Tabela 3.4 poredi predložene biosenzore za HER2 iz literature. Naime, predloženi senzori koriste napredne nanotehnologije u cilju povećanja osetljivosti detekcije senzora. Kao i kod prethodnih senzora najčeše korišćene podloge za elektrohemijsku detekciju su zlatne [201, 202] i ugljenične elektrode [203–207]. U cilju povećanja efektivne površine pomenutih elektroda primenjuju se nanomaterijali poput nanočestica zlata [206, 208], rodijuma [190], gvožđa [208], itd., dok se često koriste i 2D nanomaterijali poput grafena i grafen oksida [190]. Novija istraživanja koriste i metaloorganske mreže (eng. Metal-organic framework, MOF) za realizaciju biosenzora sa izuzetno osetljivim osobinama detekcije [208, 209]. Svaki od predloženih senzora limitom detekcije i dinamičkim opsegom detekcije odgovara potrebama osetljivosti i specifičnosti detekcije HER2 tumor biomarkera. Međutim, predložene tehnologije zahtevaju skupu opremu, hemikalije i obučeno osoblje za realizaciju svakog od opisanih senzora. Iako pojedina rešenja imaju bolji limit i dinamički opseg detekcije, s obzirom na opseg detekcije neophodan za komercijalnu upotrebu, ove osobine nisu neophodne za upotrebu u praksi. S druge strane, predloženo rešenje na bazi zlatnih listića prevazilazi sva druga rešenja u pogledu jednostavnosti i cene izrade senzora za direktnu detekciju HER2 biomarkera bez dodatnih pojačavača signala. Na ovaj način elektrode na bazi zlatnih listića, pored detekcije bakterija, pokazale su veliki potencijal i za primenu u detekciji biomarkera.

Tabela 3.4: Metode detekcije, dinamički opsezi i limit detekcije HER2 iz prethodnih
istraživanja.

Metod detekcije	Materijal	Dinamički	LD	Ref.
		opseg (ng/mL)	(ng/mL)	
Diferencijalna pulsna voltametrija	Grafenom modifikovane nanočestice rodijuma	10 - 500	0,667	[190]
Diferencijalna pulsna voltametrija	GCE sa PEDOT i peptidni hidrogel	0,1 - 1000	45×10 ⁻³	[203]
Voltametrija	Cd ²⁺ -			
pravougaonog	aptamer@AMNFs@ZIF-67	0 - 1	$4,8 \times 10^{-6}$	[209]
impulsa	nanokompozit			
Diferencijalna				
pulsna	GCE sa PEG i peptidom	0,001 - 1000	$4,4 \times 10^{-4}$	[205]
voltametrija				
Voltametrija	Zlatne elektrode	0,001 - 0,1	4,7×10 ⁻⁵	[201]
pravougaonog				
impulsa				
Diferencijalna				
pulsna	Zlatne elektrode	0,1 - 100	0,08	[202]
voltametrija				
Diferencijalna	Ugljenične elektrode			
pulsna	modifikovane Fe ₃ O ₄	5×10^{-4} - 50	2×10^{-5}	[207]
voltametrija	nanočesticama			
Diferencijalna	Zlatne nanočestice@HRP@ZIF-8	$50 \times 10^{-6} - 50$	16,8×10 ⁻⁶	[208]
pulsna				
voltametrija				
Elektrohemijska	Elektrode na bazi zlatnih listića	0,1 - 1000	0,02	Rezultati
impedansna				
spektroskopija				

3.8 LOC platforma za monitoring glukoze u realnom vremenu u tečnim analitima

Senzori za glukozu¹⁷ (Glc) predstavljaju važan aspekt istraživanja i razvoja u biomedicini i zdravstvu. Potreba za naprednim senzorima proizlazi iz važnosti praćenja glukoze u različitim biološkim uzorcima, uključujući krv, urin, intersticijsku tečnost, znoj, dah, pljuvačku i očne tečnosti [210, 211]. Pored toga, monitoring glukoze često se koristi u prehrambenom sektoru za kontrolu kvaliteta i bezbednosti hrane [212]. S obzirom na to da je glukoza glavni nutrijent za rast ćelija, biosenzori za monitoring glukoze nalaze primenu i u ćelijskim kulturama zbog važnosti uvida u njihov metabolizam. Ramanova spektroskopija, tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i druge skupe i dugotrajne spektroskopske tehnike mogu se koristiti za praćenje glukoze u ćelijskoj kulturi [213].

Do sada su predložene različite metode za detekciju glukoze, kao što su enzimski testovi [214], kolorimetrijski testovi [215] i biosenzori [216]. Enzimski testovi koriste enzime kao što je glukoza oksidaza¹⁸ (GOx) za pretvaranje glukoze u vodonik peroksid (H_2O_2), koji se zatim detektuje pomoću kolorimetrijskog indikatora. Biosenzori na bazi fluorescencije [217] ili elektrohemijski biosenzori [218], omogućavaju precizno praćenje nivoa glukoze u realnom vremenu, omogućavajući zamenu medijuma po potrebi kako bi se obezbedio optimalan rast i produktivnost ćelija. Najčešći metod za detekciju glukoze u mikrofluidičnim sistemima zasniva se na enzimskim reakcijama, gde enzim katalizuje oksidaciju glukoze da bi se stvorio vodonik peroksid. Detekcija vodonik peroksida može se vršiti korišćenjem različitih tehnika, kao što su elektrohemijske ili optičke metode.

Senzori za glukozu su od suštinskog značaja u mnogim aspektima biomedicinskog istraživanja i razvoja, a novija istraživanja kombinuju prethodno pomenute principe sa kontrolom i manipulacijom tečnostima na submilimetarskoj skali, čineći senzore delovima kompleksnih minijaturizovanih sistema za analizu i eksperimente na mikroskali [219–221]. Kao što je opisano u uvodnom delu disertacije LOC sistemi sadrže više integrisanih operacija kao što su mešanje na mikroskali [222], separacija čestica [223], DNK ekstrakcija i amplifikacija [224], detekcija [225] itd.

Važni delovi LOC sistema su mikrofluidični mešači [226, 227], koji se mogu klasifikovati kao aktivni ako spoljašnja energija aktuatora ubrzava proces mešanja, ili pasivni koji radi bez spoljašnjih aktuatora. Nedavno predloženi aktivni mikromešači koriste akustičko aktiviranje [228], električno polje [229], magneto-hidrodinamičku silu [230], itd., kao eksterni aktuator mešanja. Aktivni mešači omogućavaju brže mešanje i kraću

¹⁷engl. *Glucose*, Glc

¹⁸engl. *Glucose oxidase*, GOx

dužinu miksera od pasivnih, ali njihova integracija u složene sisteme je izazovan zadatak. S druge strane, pasivni mešači sadrže složene oblike mikrofluidičnih kanala da stimulišu proces mešanja i njihovo vreme mešanja je veće od vremena mešanja aktivnih mikromešača. U literaturi su predloženi različiti pasivni mešači zasnovani na različitim geometrijskim oblicima, uključujući serpentine [231], meandre [232] i paralelogramske barijere [233], ili 3D topologije kao što su T-mešač, mešači oblika gusenice ili Teslinog ventila [234].

3.8.1 Mikrofluidika i tehnologije izrade mikrofluidičnih čipova

Iako se pod mikrofluidikom podrazumeva nauka i tehnologija o toku i manipulaciji fluida na mikroskali, novija istraživanja pod mikrofluidikom podrazumevaju i manipulaciju malim količinama tečnosti kako unutar kanala i tako van kanala, kao i LOC sisteme sa integrisanim senzorima.

Naime, ponašanje fluida na mikroskali, gde je dominantan laminaran tok, značajno se razlikuje u odnosu na makroskalu. Osnovna razlika između makro i mikrotoka ogleda se u dominaciji površinskih sila u odnosu na zapreminske. Efekti trenja, elektrostatička i viskozna sila rastu sa smanjenjem veličine sistema. Na taj način osobine fluida koje su funkcije površine imaju veći uticaj na fluid nego svojstva koja zavise od zapremine fluida. Takođe, fundamentalna razlika između mikro i makrotoka postoji i usled uticaja zidova kanala u kojima se tečnost kreće na sam tok. Fluid u tankom sloju u blizini zida kanala oseća njegov uticaj, dok je fluid izvan te oblasti okarakterisan veličinama za unutrašnji deo toka – njegovom brzinom i temperaturom. Dominantan uticaj zidova kanala na mikrotok, može se iskoristiti za kontrolu i manipulaciju toka neuporedivo više u odnosu na makrotokove. Osobine uređenosti i predvidivosti laminarnog toka na mikroskali čine ga dobrim okruženjem za ispitivanje bioloških sistema [235, 236].

Brojne tehnologije korišćene su za realizaciju mikrofluidičnih čipova kao što su PDMS (polidimetilsiloksan), mikromolding, mikromašinska obrada, 3D štampa, ili ksirografija. Iako PDMS tehnologija proizvodi dugotrajne čipove koji su optički transparentni i biokompatibilni, njihov proces proizvodnje je složen, dugotrajan i skup [237]. Štaviše, PDMS tehnologija zahteva složen proces litografije i optimizaciju dizajna, što zahteva ponavljanje kompletnog toka proizvodnje. Novija istraživanja koriste polimere kao zamenu za dobro uspostavljene tehnologije izrade na bazi silicijuma i stakla, posebno sa razvojem novih termoplastičnih materijala. Jedna od tehnologija zasnovana je na PMMA polimeru koji ima odličnu optičku transparentnost i stoga se široko koristi u biomedicinskim primenama. PMMA se obično mikromašinski obrađuje pomoću CNC mašine¹⁹ (kompjuterska numerički kontrolisana mašina) ili lasera, dok tehnike lami-

¹⁹engl. Computer Numeric Control

nacije više slojeva zahtevaju korišćenje pritiska ili hemijskog tretmana [238]. S druge strane, mikromolding je tehnika za proizvodnju mikrofluidičnih čipova u polimerima korišćenjem kalupa sa negativom željene geometrije. Iako tehnologija mikromoldinga zahteva nekoliko koraka uključujući pripremu kalupa, otisak polimera materijala, očvršćavanja polimera, može se koristiti u mnogim biomedicinskim primenama [239–241]. Pored toga, u literaturi su predložene mnoge tehnologije hibridne izrade kako bi se prevazišli postojeći nedostaci prethodno navedenih tehnologija i smanjila cena i vreme izrade. Jedna od hibridnih tehnologija, nedavno predložena, kombinuje proces laserske mikromašinske obrade nesinterovane staklokeramike sa ksirografijom, nudi brzu jeftinu proizvodnju čipova i omogućava realizaciju složenih i višeslojnih geometrija kanala [242].

Takođe, novija istraživanja sve više koriste tehnologiju 3D štampe za izradu mikrofluidičnih komponenti. Kao tehnologija koja može da obezbedi geometrijski složene strukture u jednom koraku na mikroskali uz obezbeđivanje pristupačne i vremenski efikasne proizvodnje, 3D štampa je postala perspektivan proizvodni proces za mikrofluidične sisteme [243, 244]. Postoje brojne metode 3D štampanja koje se mogu koristiti za različite primene kao što su modelovanje fuzionog taloženja²⁰ [245], selektivno lasersko sinterovanje²¹ [246], fotopolimerna inkjet štampa²² [247], proizvodnja laminiranih objekata²³ [248], stereolitografija²⁴ [249], itd. Stereolitografski (SLA) štampači uneli su novine u mnoge proizvodne procese svojom sposobnošću da lako proizvode precizne strukture. U ovom procesu, laser se koristi za očvršćavanje slojeva fotopolimerne smole. Procedura počinje deljenjem 3D modela na slojeve, nakon čega sledi projektovanje lasera na podlogu od fotopolimerne smole. Laser selektivno očvršćava smolu, sloj po sloj, konstruišući željeni dizajn. Zbog svoje visoke rezolucije i preciznosti, SLA je obično poželjan izbor za proizvodnju, razvoj i testiranje različitih dizajnova i struktura kanala. Nedavne studije pokazuju da na ovaj način proizvedeni mikrofluidični uređaji mogu da se koriste u širokom spektru primena, od ćelijske kulture [250] do hemijske sinteze [251] i biosenzora [252].

U nastavku disertacije biće predstavljen princip elektrohemijske detekcije na bazi reakcije enzima i glukoze, koji je iskorišćen za detekciju glukoze unutar LOC platforme.

3.8.2 Elektrohemijsko-enzimsko određivanje koncentracije glukoze

Osnovni princip detekcije korišćen u implementiranom senzoru bazira se na elektrohemijskoj detekciji vodonik peroksida, koji nastaje usled reakcije između glukoze i

²⁰engl. Fused Deposition Modeling

²¹engl. Selective Laser Sintering

²²engl. Photopolymer Inkjet Printing

²³engl. Laminated Object Manufacturing

²⁴engl. *stereolithography*

enzima glukoza oksidaze. Reakcija može biti izražena na sledeći način:

glukoza +
$$O_2$$
 + $H_2O \xrightarrow{GO_x}$ glukonska kiselina + H_2O_2 . (3.8.1)

Oksidacijom vodonik peroksida do O_2 i H⁺ dobijaju se dva elektrona. Ova struja, koja se detektuje u hronoamperometriji, odgovara elektronima generisanim tokom reakcija oksidacije ili redukcije. Važno je napomenuti da vrednost potencijala na kojem se odvija oksidacija specifična je za hemijski sistem koji se proučava i zavisi od tipa referentne elektrode. Za svaku mol β -D-glukoze u uzorku, oksidacija enzima GOx proizvodi jedan mol glukonske kiseline i jedan mol H₂O₂. Elektrohemijski, H₂O₂ može proći kroz dvostruku oksidaciju elektronima kako bi se formirali O₂ i H⁺, što je izraženo u sledećoj reakciji:

$$H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H^+ + 2e^-.$$
 (3.8.2)

Ovaj proces omogućava identifikaciju prisustva i koncentracije H_2O_2 , čime se posredno meri koncentracija β -D-glukoze u uzorku [253]. Aktivnost enzima glukoza oksidaze najbolja je u opsegu pH vrednosti od 5,1 do 5,5. Iz tog razloga neophodno je prilagoditi pH uzorka na taj opseg vrednosti, da bi enzim bio maksimalno efikasan. Iz tog razloga predložena LOC platforma sadrži dva mikromešača, jedan za prilagođavanje pH vrednosti uzorka, a drugi za mešanje malih količina uzorka i enzima.

3.8.3 Teorijska i numerička analiza

Kao što je rečeno, predstavljena LOC platforma sadrži dva mikrofluidična miksera sa dizajnom serpentine i prostor za integraciju komercijalnih DropSens elektroda, slika 3.32. Opisani čip može se povezati sa bioreaktorom iz kog se periodično uzima tečni uzorak. Prvi mikromešač koristi se za mešanje ćelijskog medijuma i sirćetne kiseline da bi se pH mešanog rastvora podesio na 5,1, s obzirom na to da je aktivnost enzima najbolja u opsegu pH od 5,1 do 5,5. Analitičkim proračunom procenjen je odnos zapremina mešanja ili odnos brzina protoka medijuma i sirćetne kiseline, na osnovu pH vrednosti medijuma i sirćetne kiseline na dva ulaza. Nakon prvog mikromešača, drugi mikromešač meša medijum (sa prilagođenim pH) sa enzimom, GOx, i usmerava mešani analit u senzorsku komoru, gde se nalazi integrisana elektroda. Na osnovu merenja na elektrodi, vrši se procena koncentracije glukoze, što će biti detaljno opisano u sekciji sa rezultatima.



Slika 3.32: Šematski prikaz koncepta detekcije glukoze.

Proračun odnosa protoka medijuma i sirćetne kiseline vrši se na osnovu poznate jednačine za mešanje dva analita sa različitim pH vrednostima i definicije protoka. Procena pH vrednosti smeše dve tečnosti sa različitim pH vrednostima opisana je izrazom (3.8.3):

$$[H^+]_1 V_1 + [H^+]_2 V_2 = [H^+]_{uk} V_{uk}, (3.8.3)$$

gde su $[H^+]_1$, $[H^+]_2$, $[H^+]_{uk}$ koncentracije vodonikovih jona u ćelijskoj sredini, sirćetne kiseline i u ukupnom mešanom rastvoru, respektivno, dok su V_1 , V_2 i V_{uk} odgovarajuće zapremine. S obzirom na to da je vreme toka jednako za obe tečnosti, ukupna zapremina se može izraziti preko odnosa protoka sirćetne kiseline i medijuma, Q_2/Q_1 , izraz (3.8.4):

$$V_{uk} = V_1 \left(1 + \frac{Q_2}{Q_1} \right). \tag{3.8.4}$$

Konačno, zamenom izraza (3.8.4) u izraz (3.8.3) dobija se odnos protoka enzima i medijuma na ulazima u čip:

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{[H^+]_{uk} - [H^+]_1}{[H^+]_2 - [H^+]_{uk}}.$$
(3.8.5)

Na osnovu poznate pH vrednosti medijuma, koja se uglavnom meri kao parametar tokom procesa kultivacije ćelija, može se napraviti algoritam za automatski tok tečnosti kroz LOC platformu da bi se postigla konstantna pH vrednost na senzoru.

3.8.4 Optimizacija performansi mešanja primenom softera *Comsol Multiphysics*

Performanse predloženog mikrofluidičnog mešača analizirane su korišćenjem softvera *Comsol Multiphysics 6.0*® (Švedska). Softver rešava parcijalne diferencijalne jednačine primenom metoda konačnih elemenata²⁵. Za simulacije mešanja na mikroskali, korišćeni su moduli laminarnog toka (engl. *Laminar flow*) i transporta razređenih materija (engl. *Transport of Diluted species*). Modul laminarnog toka opisuje fiziku toka fluida na mikroskali, a jednačine kojima se kretanje fluida opisuje su Navijer-Stoksova jednačina i jednačina kontinuiteta [254]. S druge strane, modul transporta razređenih materija omogućava mešanje različitih koncentracija boja na osnovu Fikovog zakona difuzije [255].

Model mešača na bazi serpentine predstavljen je na slici 3.33a. U simulacijama su mešane tečnosti nalik vodi sa gustinom fluida od 1000 kg/m³ i dinamičkom viskoznošću od $8,9 \times 10^{-4}$ Pa · s. U simulacijama je korišćen tzv. *no-slip* granični uslov koji podrazumeva da je brzina fluida u sloju koji je u direktnom kontaktu sa zidom kanala identičan brzini zida kanala. Da bi se ispitale performanse mešača u simulacijama, mešanje dve tečnosti sa koncentracijom boje 0 i 1 mol/m³ simulirane su za različite protoke. Mera homogenosti izmešanih tečnosti duž poprečnog preseka kanala ispitana je na probama (engl. *probe*) na ulazu, prvoj, drugoj i trećoj serpentini, poslednjoj serpentini i na izlazu, slika 3.33a. Performanse mešača opisane su sa indeksom mešanja²⁶(MI). Indeks mešanja uzmi vrednosti između 0 i 1, za potpuno neizmešane i izmešane tečnosti, respektivno. Izrazom (3.8.6) opisan je MI duž poprečnog preseka kanala:

$$MI = 1 - \frac{\int |c - c_{\infty}| \, dx}{\int |c_0 - c_{\infty}| \, dx'},$$
(3.8.6)

gde *c* predstavljaju normalizovanu koncentraciju duž poprečnog preseka kanala, c_{∞} je normalizovana koncentracija za izmešane tečnosti (u našem slučaju 0,5) i c_0 normalizovana koncentracija inicijalnog mešanja tečnosti (u našem slučaju 1). Ukoliko indeks mešanja uzima vrednosti veće od 0,9 tečnosti se mogu smatrati potpuno pomešanim, dok se dobre performansama mešanja mogu smatrati i za vrednosti veće od 0,8.

U predloženoj LOC platformi, prvi mikromešač se koristi za mešanje sirćetne kiseline (pH 4,5) i ćelijskog medijuma (pH 7,4) za prilagođavanje pH vrednosti, dok se drugi mešač koristi za mešanje enzima i izmešane tečnosti iz prvog mešača. Iz izraza (3.8.5) i odnosa protoka na ulazima prvog mikromešača, analiza izmešanih tečnosti urađena je za odnos protoka jednak 0,33. Rezultati mešanja MI predstavljeni su za

²⁵engl. Finite Element Metod

²⁶engl. *mixing index*, MI

simuliranje vrednosti protoka u opsegu 10 μ L/min do 150 μ L/min za različite probe u strukturi, slika 3.33b. Generalno, u slučaju manjih vrednosti protoka, dominantan mehanizam mešanja je proces difuzije. S druge strane, za vrednosti Rejnoldsovog broja veće od 1, bočna konvekcija postaje dominantnija u poređenju sa difuzijom. Posledično, indeks mešanja opada. Međutim, s obzirom na to da predloženi mešači sadrže 35 ponavljajućih jedinica, dobre performanse mešanja dobijaju se čak i za veće vrednosti protoka.

U drugom mešaču, cilj je mešanje enzima i medijuma u istom odnosu zapremina. Da bi se to postiglo, neophodno je da je protok enzima koji ulazi u drugi mikromešač bude jednak zbiru protoka sirćetne kiseline i medijuma koji ulaze u prvi mešač. Drugim rečima, zbug protoka na ulazu prvog mešača treba da bude jednak protoku na ulazu u drugi mešač. Iz tog razloga, slika 3.33c predstavlja validaciju rezultata za protok jednak 67 μ L/min primenjen na oba ulaza, koji odgovaraju zbiru protoka od $Q_1 = 50 \,\mu$ L/min i $Q_2 = 16.7 \,\mu$ L/min. Rezultati na slici 3.33c pokazuju dobro pokalapanje rezultata simulacija i eksperimenata mešanja.



Slika 3.33: (a) Dizajn mikromešača sa obeleženim probama korišćenim u simulacijama. Dimenzije na slici su u mm; (b) Vrednosti indeksa mešanja za odnos protoka jednak 0,33; (c) Poređenje rezultata simulacija i eksperimenta mešanja boja u mikrofluidičnom mešanju za protok jednak 67 μ L/min na ulazima, nakon prve serpentine i na izlazu.

3.8.5 Izrada i karakterizacija LOC platforme

Predložena LOC platforma realizovana je kao višeslojna struktura, sa srednjim slojem sa mikrofluidičnim kanalima napravljenim u SLA tehnologiji na štampaču Formlabs Form3. LOC platforma je realizovana u hibridnoj tehnologiji izrade, koja koristi PMMA potporne slojeve i 3D štampani sloj sa mikrofluidičnim kanalima. Mikrofluidični kanali realizovani su tehnologijom stereolitografije (SLA). Savitljiva transparentna smola sa 80A tvrdoće po Šoru korišćena je za izradu sloja mikrofluidičnih kanala. Ovaj materijal je odabran s obzirom na to da nakon štampe ima odgovarajuću savitljivost i dobro prijanja na PMMA slojeve. Zatvaranje kanala i dobra adhezija omogućeni su primenom male sile, odnosno spajanjem slojeva šrafovima. U toku inicijalnih ispitivanja predloženi čip je izdržao protoke i do 15 mL/min bez curenja.



Slika 3.34: (a) Višeslojna struktura predložene LOC platforme; (b) 3D profil mikrofluidičnog kanala dobijenog stereolitografijom; (c) Finalni izgled LOC platforme sa integrisanom Dropsens elektrodom.

Predložena smola i tehnologija 3D štampe omogućavaju izradu kanala dimenzije 200 μ m × 200 μ m. Visina kanal podešena je na 100 μ m, dok su ostali parametri odabrani da prate uputstvo proizvođača [256]. Model je štampan direktno na ploču štampača tako da kanali budu usmereni na gore, da bi se izbegla potreba za potpornim strukturama. Nakon štampe, kanali su detaljni isprani izopropanolom (Sigma-Aldrich) i nakon toga ostavljeni potopljeni u izopropanolu 20 min. Nakon toga, mikrofluidiči kanali su dodatno isprani sa izopropanolom pod pritiskom iz šprica da bi se uklonili ostaci rezina iz unutračnjosti kanala. Nakon ispiranja, štampani sloj ostavljen je da se osuši u toku noći, nakon čega se u procesu učvršćivanja izlaže UV svetlu u opsegu talasnih dužina 365 nm i 400 nm (Anycubic Wash and Cure v1).

Mikrofluidični mešači, realizovani u sloju 2, sadrže tri ulaza za medijum, sirćetnu kiselinu i enzim. Na kraju drugog mešača nalazi se komora sa integrisanom Dropsens elektrodom na koju se dalje nadovezuje izlaz iz čipa. Sloj 2, zajedno sa Dropsens elektrodom nalazi se između slojeva 1 i 3, koji su realizovani tehnologijom laserskog mikromašinstva u PMMA slojevima debljine 2 mm i 6 mm, respektivno. Dodatno, sloj 3 sadrži prostor za ubacivanje elektrode, dobijen graviranjem površine pomoću CO_2 lasera (parametri: snaga 35 W, brzina 15 mm/s). 3D profil realizovanog mikrokanala pokazuje jasno definisane ivice i uniformne zidove kanala, slika 3.34b, dok slika 3.34c predstavlja realizovani čip sa integrisanom elektrodom. Ukupne dimenzije čipa su 69,25 mm × 46,65 mm sa poluprečnikom ulaza od 1 mm, poluprečnikom šrafova 1,5 mm i poluprečnikom komore od 4 mm. Takođe, dužina mešača je 38,4 mm, dok je njegova širina 8,2 mm.

3.8.6 Rezultati detekcije glukoze

U svim elektrohemijskim eksperimentima, sito-štampane Dropsens elektrode korišćene su nakon čišćenja u 0,5 M sumpornoj kiselini u opsegu potencijala od -0,2 V do 1,5 V u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu, brzinom skeniranja 0,5 V/s i brojem ciklusa 60. Nakon čišćenja, elektrode su isprane MiliQ vodom i integrisane u LOC plaformu.

Princip detekcije glukoze zasniva se na elektrohemijskoj detekciji vodonik peroksida, koji predstavlja proizvod reakcije glukoze i glukoza oksidaze. Da bi se pronašao potencijal oksidacije vodonik peroksida, ciklična voltametrija je odrađena sa malom brzinom skeniranja od 0,05 V/s da bi se omogućilo manuelno dodavanje dodatne kapi na površinu elektrode (opseg potencijala -0,2 V do 1,5 V vs. Ag/AgCl RE, 8 ciklusa). Na taj način omogućeno je praćenje reakcije u realnom vremenu. Nakon toga hronoamperometrija je iskorišćena za različite koncentracije glukoze tokom 60 s na fiksnom potencijalu oksidacije vodonik peroksida, 0,9 V vs. Ag/AgCl RE. Rastvori glukoze, glukoza oksidaze i fruktoze napravljeni su u 50 mM acetatnom puferu (pH 5,1).

U predloženoj LOC platformi sa integrisanim senzorom, molekuli glukoze (D-(+)-Glukoza, Sigma-Aldrich) se oksiduju u hemijskoj reakciji sa enzimom, GOx (Glukoza oksidaza od Aspergillus Niger, Tip X-S, Sigma-Aldrich), duž mikrofluidičnog toka. Nakon potpunog mešanja sa medijumom (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high, Sigma-Aldrich) od interesa i određenog vremena, proizvod reakcije, vodonik peroksid se oksiduje i proizvodi elektrohemijski signal na određenom potencijalu.

Na slici 3.35a prikazani su rezultati eksperimenta ciklične voltametrije gde se ispituju specifičnost i potencijal oksidacije vodonik peroksida. U ovom eksperimentu,

nakon svaka dva ciklusa dodaje se dodatna kap od 40 μ L analita. Prva dva ciklusa u cikličnom voltamogramu, prikazanom na slici 3.35a, sadrže signal od acetatnog pufera. Ciklusi 3 i 4 predstavljaju signal nakon dodavanja kapi od 1 mg/mL GOx, a ciklusi 5 i 6 predstavlja signal nakon dodavanja kapi od 5 mg/mL fruktoze. Intenzitet oksidacionih pikova na 0,9 V prikazan je na slici 3.35b. Rezultati pokazuju da mešavina fruktoze i enzima nije dala odgovor, što je i očekivano s obzirom na to da je GOx nespecifičan enzim za fruktozu. Pored toga, ciklusi 5 i 6 pokazuju da se nakon dodavanja kapi glukoze proizvodi tipičan otisak prsta vodonik peroksida u voltamogramu, što rezultira povećanjem struje.

Kalibracija elektrohemijskog senzora urađena je u acetatnom puferu. Rezultati hronoamperometrije za različite koncentracije glukoze u acetatnom puferu tokom vremena predstavljene su na slici 3.35c. Koncentracija glukoze izmerena je u opsegu od 0,1 mg/mL do 50 mg/mL. Kalibraciona kriva detekcije glukoze u acetatnom puferu prikazana je na slici 3.35d, gde je signal za različite koncentracije glukoze predstavljen kao relativna promena u odnosu na odgovor acetatnog pufera izmeren posle 60 s reakcije. Može se videti da se koncentracija vodonik peroksida povećava sa povećanjem koncentracije glukoze, što rezultira eksponencijalnim povećanjem izlazne struje. Područje od interesa za detekciju glukoze u ćelijskom medijumu predstavljeno je na unutrašnjem grafiku slike 3.35d.



Slika 3.35: Rezultati elektrohemijske detekcije glukoze; (a) Ispitivanje potencijala oksidacije vodonik peroksida (H₂O₂); Ciklusi 1-2 snimljeni su u acetatnom puferu. Ciklusi 3-4 snimljeni nakon dodavanja kapi GOx. Ciklusi 5-6 snimljeni nakon dodavanja kapi fruktoze. Ciklusi 7-8 snimljeni nakon dodavanja kapi glukoze; (b) Intenzitet pika oksidacije sa slike (a) na 0,9 V vs. Ag/AgCl RE; (c) Rezultati hronoamperometrije za detekciju glukoze pripremljene u acetatnom puferu; Unutrašnji grafik: Uvećani prikaz kontrolnih merenja i malih koncentracija Glc; (d) Kalibraciona kriva detekcije glukoze u acetatnom puferu. Signal je predstavljen kao relativna promena vrednosti u odnosu na signal acetatnog pufera, $\delta(\%) = 100 \times (I_{konc.} - I_{pufer})/I_{pufer}$; Unutrašnji grafik: Uvećani prikaz kalibracione krive za glukozu u opsegu 0,05 - 2,5 mg/mL.

S obzirom na to da je sadržaj glukoze jedan od najvažnijih parametara u procesu kultivisanja ćelija, koncentracija glukoze je takođe izmerena u medijumima za gajenje ćelija. Rezultati hronoamperometrije za različite koncentracije glukoze u ćelijskom medijumu prikazani su na slici 3.36a. Medijum sa 4,5 mg/mL glukoze razblažen je da bi se detektovale različite koncentracije glukoze, dok je pH vrednost medijuma konstantna. S obzirom na to da je pH medijuma 7,4, njegova pH vrednost se prvo podešava na 5,1 podešavanjem odgovarajućih brzina protoka na 0,33 na ulazu u prvi mešač, kao što je predstavljeno u rezultatima simulacija, slika 3.33b. Mešanje inicijalnog uzorka dovodi do smanjenja ukupne koncentracije glukoze u uzorku, ali rezultira bržim vremenom reakcije sa enzimom. Rezultati merenja nakon mešanja sa enzimom i detekcije

prikazani su na slici 3.36a za različite koncentracije glukoze, uključujući razblaženja sirćetnom kiselinom (Acetic Acid ACS Reagent >=99.7%, Sigma-Aldrich) i enzimom. Signal u medijumu je niži u poređenju sa čistim acetatnim puferom (unutrašnji grafik na slici 3.35d) zbog prisustva drugih jona u medijumu, kao što su L-glutamin, natrijum piruvat, natrijum bikarbonat, itd. Za praktičnu primenu važno je da se ponovo izračuna početna koncentracija glukoze u makrosistemu, pre ulaska u LOC, razblaži se sirćetnom kiselinom i reaguje sa enzimom. Kalibraciona kriva detekcije glukoze u ćelijskom medijumu prikazana je na slici 3.36b, gde je odgovor senzora predstavljen u funkciji stvarne koncentracije glukoze, pre ulaska u LOC. Signal je predstavljen kao relativna promena u odnosu na acetatni pufer. Konačno, može se videti da predloženi sistem omogućava merenje glukoze u realnom vremenu u tečnom analitu sa linearnom promenom struje sa koncentracijom glukoze.



Slika 3.36: (a) Rezultati hronoamperometrije za različite koncentracije glukoze u ćelijskom medijumu. Unutrašnji grafik: Kalibraciona kriva za medijum; (b) Kalibraciona kriva u ćelijskom medijumu na ulazu u LOC platformu; Realna koncentracija je izračunata množenjem izmerene koncentracije sa odnosom protoka i faktorom 2 koji predstavlja razblaženje nakon mešanja u čipu. Signal je izračunat sledećim izrazom: $\delta(\%) = 100 \times (I_{konc.} - I_{pufer})/I_{pufer}$.

3.8.7 Diskusija i zaključak

Predloženi koncept ima nekoliko prednosti za potencijalnu upotrebu u različitim biomedicinskim primenama. Naime, koncentracija glukoze u krvi je najrasprostranjenija mera za praćenje nivoa šećera u krvi. Normalni nivoi glukoze u krvi su između 0,7 i 1 mg/mL [257], a sve više od toga može ukazivati na dijabetes ili neko drugo zdravstveno stanje. Pljuvačka takođe sadrži glukozu, ali je koncentracija mnogo niža u odnosu na krv, obično se kreće od 5×10^{-4} do 10^{-3} mg/mL [258]. Koncentracija glukoze u pljuvački koristi se za praćenje promena nivoa šećera u krvi, a koristi se i u nekim dijagnostičkim testovima. Koncentracija glukoze u urinu varira u zavisnosti od nivoa glukoze u krvi, u rasponu od 0 - 0,20 mg/mL ili više, u zavisnosti od nivoa glukoze u krvi [259]. Predloženi koncept omogućava detekciju prethodnih opsega koncentracija i stoga se može koristiti za primene sa ovim tečnim uzorcima.

Pored toga, zbog sistema protoka kroz LOC platformu, nema potrebe za imobilizacijom enzima na površini senzora što omogućava dužu upotrebu senzora jer se izbegava zasićenje imobilisanog enzima. Nedavno su predložena različita rešenja za detekciju glukoze zasnovana na LOC sistemima koji uključuje mikromešače. Detekcija glukoze unutar LOC platformi rađena je spektroskopskim [260, 261], kolorimetrijskim [262] ili elektrohemijskim metodama [263]. Međutim, nijedan od ovih predloženih sistema nije testiran na stvarnim uzorcima, i nijedan od njih nije dizajniran za integraciju sa velikim sistemima poput bioreaktora. Predloženi koncept detekcije može automatski prikupljati uzorke bez potrebe za ručnim uzorkovanjem i može omogućiti merenja u realnom vremenu. Predloženi čip može da omogući praćenje hranljivih materija u ćelijskom medijumu dok, u isto vreme, sprečava potencijalnu kontaminaciju medijuma tokom procesa uzorkovanja. Pored toga, predloženi čip omogućava prilagođavanje reakcije prema pH vrednosti, što je pogodno za merenja u procesu kultivacije ćelija gde se glukoza i pH menjaju tokom vremena.

U ovom radu predložen je novi 3D štampani mikrofluidični čip sa integrisanim mikromešačima na bazi serpentina i elektrohemijskim senzorom za detekciju glukoze u tečnom analitu. Izvršene su numeričke simulacije za optimizaciju performansi mešanja i korišćen je teorijski model mešanja fluida za podešavanje ulaznih protoka fluida prema pH vrednostima uzorka. Potencijal detekcije predstavljen je na primeru merenja koncentracija glukoze u acetatnom puferu i medijumu ćelijske kulture. Predloženi čip koristi male količine uzoraka i reagenasa, a rezultati pokazuju linearni odziv i dobru osetljivost. Na osnovu predstavljenih rezultata vidi se veliki potencijal za direktno praćenje parametara u realnom vremenu u makrosistemima kao što su bioreaktori gde se glukoza i pH menjaju tokom vremena. Predložena platforma ima veliki potencijal za različite primene u procesima gde mikrosistem može da omogući praćenje relevantnih parametara za makrosisteme kao što su bioreaktori.

Zaključak

U okviru doktorske disertacije analizirano je nekoliko senzorskih i biosenzorskih rešenja za primene u kontroli kvaliteta hrane i životne sredine, ćelijskoj poljoprivredi i biomedicini. Razvijena je LOC platforma sa integrisanim mikrotalasnim senzorom za identifikaciju i detekciju mešanja jestivih ulja, kao i LOC platforma sa integrisanim impedansnim senzorom za monitoring rasta ćelija unutar mikrobioreaktora. Takođe, ispitan je potencijal nove tehnologije izrade elektroda na bazi zlatnih listića za detekciju bakterija *E. coli, S.*Typhimurium i tumor biomarkera HER2. Integracija elektrohemijskog senzora u LOC platformu sa mikrofluidičnim mešačima realizovana je za primenu u detekciji glukoze u ćelijskom medijumu.

Mikrotalasni senzori, iako su korisni u mnogim aplikacijama, često nisu dovoljno osetljivi za detekciju malih promena u dielektričnoj permitivnosti. U tom kontekstu, fenomeni površinskih plazmonskih polaritona i dizajniranih površinskih plazmonskih polaritona predstavljaju obećavajuću opciju za izuzetno osetljive senzore. Kroz simulacije, optimizaciju i eksperimentalnu verifikaciju, u okviru ove doktorske disertacije razvijena je LOC platforma sa integrisanim senzorom zasnovanim na SSPP talasima za identifikaciju jestivih ulja. Eksperimentalna verifikacija senzora potvrdila je visoku osetljivost predloženog senzora na male promene dielektrične permitivnosti uzorka, a senzor je pokazao i odlične osobine linearnosti detekcije. Takođe, hibridni pristup izrade ovog senzora omogućio je brzu i jednostavnu pripremu, smanjenje količine uzoraka potrebnih za testiranje i visoku osetljivost, bez potrebe za skupom opremom i složenim procedurama.

U okviru doktorske disertacije istraženo je rešenje za praćenje biomase primenom LOC pristupa za kultivaciju ćelija, integracijom novog impedansnog senzora u mikrobioreaktor. Predstavljeno istraživanje ispituje mogućnosti dva pristupa za monitoring rasta ćelija unutar minijaturizovanog sistema za praćenje biomase tokom vremena: impedansnog pristupa i pristupa obrade slike. Rezultati su pokazali da se metod obrade slike može koristiti za grubu procenu biomase. Međutim, u slučaju većih bioreaktora, primena ove metode je limitirana zbog nepraktičnosti dobijanja slika bez dodatnih manipulacija ili uzorkovanja. S druge strane, predloženo rešenje merenja impedanse može se koristiti za detekciju svih faza rasta ćelija sa visokom pouzdanošću. Predloženi impedansni senzor može biti prilagođen i redizajniran za integraciju u različite komercijalne bioreaktore za monitoring biomase. Pored svih navedenih prednosti, LOC platforma je realizovana u isplativnoj i jednostavnoj tehnologiji, koja omogućava brzu izradu minijaturizovanih sistema, što otvara mogućnost za širok spektar primena u biotehnološkim i medicinskim istraživanjima.

Biosenzorske tehnologije doživljavaju nagli razvoj poslednjih godina zbog mogućnosti osetljive detekcije malih koncentracija bakterija, virusa, tumor biomarkera itd. Ovi biosenzori imaju potencijal za brzu i tačnu analizu, čime pružaju značajnu prednost u dijagnostici, kontroli kvaliteta hrane, i zdravstvenoj zaštiti u poređenju sa drugim rešenjima i standardnim laboratorijskim metodama detekcije. U okviru doktorske disertacije razvijena je nova tehnologija izrade elektroda na bazi zlatnih listića, gde se pojedinačna podloga za realizaciju senzora može realizovati po ceni i do 10 puta manjoj od tržišne cene. Takođe, doprinos istraživanjima ostvaren je i u razvoju protokola funkcionalizacije površine zlata za imobilizaciju antitela na površini elektrode. Na ovaj način realizovani su senzori za detekciju bakterija E. coli i Salmonella Typhimurium sa limitima detekcije od 2 cfu/mL i 71 cfu/mL, respektivno, što predstavlja značajno manje koncentracije od infektivnih doza ovih bakterija. Takođe, u okviru doktorske disertacije razvijen je novi protokol imobilizacije antitela na površini zlata posredstvom proteina L, koji pored orijentisane imobilizacije antitela, nudi mogućnost i detekcije ili imobilizacije i fragmenata antitela. Na ovom principu realizovan je senzor za tumor biomarker HER2 sa veoma niskim limitom detekcije od 0,02 ng/mL, što je niže od koncentracije koja se sreće kod HER2 pozitivnih pacijentkinja, a i kod zdravih ljudi.

Integracija elektrohemijskih biosenzora u LOC platformu realizovana je u 3D štampanom mikrofluidičnom čipu sa integrisanim mešačima na bazi serpentina. Primenom softverskog alata *Comsol Multiphysics* optimizovane su performanse mešanja, a potencijal detekcije LOC platforme pokazan je na primeru detekcije glukoze u acetatnom puferu i medijumu za kultivaciju ćelija. Predložena LOC platforma pokazuje značajan potencijal za praćenje parametara ćelijskog medijuma u realnom vremenu u makrosistemima poput bioreaktora.

Konačno, doktorska disertacija predstavlja multidisciplinarni pristup primenjen u oblastima senzora i biosenzora, istražujući širok spektar primena, od analize hrane i životne sredine do praćenja bioloških procesa i dijagnostike. Predstavljeni rezultati imaju potencijal da unaprede razumevanje i rešavanje ključnih problema u različitim oblastima, uz primenu brzih i jeftinih tehnoloških rešenja. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u četiri rada kategorije M21, jednim radom kateogrije M22 i četiri konferencijska rada. Takođe, očekuje se publikacija još jednog rada u naučnom časopisu.

Bibliografija

- 1. Garcia-Vidal, F. J. *i dr.* Spoof surface plasmon photonics. *Rev. Mod. Phys.* **94**, 025004 (2022.).
- 2. Liu, Y. & Zhang, X. Metamaterials: a new frontier of science and technology. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2494–2507 (2011.).
- 3. Fan, J. *i dr*. A review of additive manufacturing of metamaterials and developing trends. *Materials Today* **50**, 303–328 (2021.).
- 4. Xiao, S. *i dr.* Active metamaterials and metadevices: a review. *Journal of Physics D: Applied Physics* **53**, 503002 (2020.).
- Kumar, R., Kumar, M., Chohan, J. S. & Kumar, S. Overview on metamaterial: History, types and applications. *Materials Today: Proceedings* 56. 3rd International Conference on Contemporary Advances in Mechanical Engineering, 3016–3024 (2022.).
- 6. Abdolrazzaghi, M., Nayyeri, V. & Martin, F. Techniques to Improve the Performance of Planar Microwave Sensors: A Review and Recent Developments. *Sensors* **22** (2022.).
- Cao, Y., Ruan, C., Chen, K. & Zhang, X. Research on a high-sensitivity asymmetric metamaterial structure and its application as microwave sensor. *Scientific Reports* 12 (2022.).
- 8. Rashedul Islam, M. *i dr*. Metamaterial sensor based on reflected mirror rectangular split ring resonator for the application of microwave sensing. *Measurement* **198**, 111416 (2022.).
- 9. Govind, G. & Akhtar, M. J. Metamaterial-Inspired Microwave Microfluidic Sensor for Glucose Monitoring in Aqueous Solutions. *IEEE Sensors Journal* **19**, 11900–11907 (2019.).
- Podunavac, I., Radonic, V., Bengin, V. & Jankovic, N. Design of Spoof Surface Plasmon Polariton-based Sensor for Low Dielectric Constant Liquid Samples. 2021 15th International Conference on Advanced Technologies, Systems and Services in Telecommunications (TELSIKS), 121–124 (2021.).
- Podunavac, I., Radonic, V., Bengin, V. & Jankovic, N. Microwave Spoof Surface Plasmon Polariton-Based Sensor for Ultrasensitive Detection of Liquid Analyte Dielectric Constant. *Sensors* 21 (2021.).

- 12. Saadat-Safa, M., Nayyeri, V., Ghadimi, A., Soleimani, M. & Ramahi, O. M. A pixelated microwave near-field sensor for precise characterization of dielectric materials. *Scientific reports* **9**, 13310 (2019.).
- 13. Muñoz-Enano, J. *i dr.* Planar phase-variation microwave sensors for material characterization: A review and comparison of various approaches. *Sensors* **21**, 1542 (2021.).
- Tiwari, N. K., Singh, S. P. & Akhtar, M. J. Novel Improved Sensitivity Planar Microwave Probe for Adulteration Detection in Edible Oils. *IEEE Microwave and Wireless Components Letters* 29, 164–166 (2019.).
- Zhang, X., Ruan, C., Wang, W. & Cao, Y. Submersible High Sensitivity Microwave Sensor for Edible Oil Detection and Quality Analysis. *IEEE Sensors Journal* 21, 13230–13238 (2021.).
- 16. Erdoğan, M. *i dr.* Determination of frying sunflower oil usage time for local potato samples by using microwave transmission line-based sensors. *Measurement* **163**, 108040 (2020.).
- 17. Rossignol, J. *i dr.* Critical influence of dielectric sensitive material and manufactured process in microwave gas-sensing: Application of ammonia detection with an interdigital sensor. *ACS omega* **5**, 11507–11514 (2020.).
- Bogner, A. *i dr*. Planar microstrip ring resonators for microwave-based gas sensing: Design aspects and initial transducers for humidity and ammonia sensing. *Sensors* 17, 2422 (2017.).
- 19. Li, F., Zheng, Y., Hua, C. & Jian, J. Gas sensing by microwave transduction: Review of progress and challenges. *Frontiers in Materials* **6**, 101 (2019.).
- Li, Z., Xue, Q., Wang, Q., Zhang, H. & Duan, X. Biomolecules detection using microstrip sensor with highly-ordered nanowires array u 2019 IEEE SENSORS (2019.), 1–4.
- Jha, A. K., Havelka, D., Krivosudsky, O. & Cifra, M. TRL calibrated coplanar microwave sensor for characterization of biomolecules u 2017 IEEE MTT-S International Microwave and RF Conference (IMaRC) (2017.), 1–5.
- 22. Omer, A. E. *i dr.* Low-cost portable microwave sensor for non-invasive monitoring of blood glucose level: Novel design utilizing a four-cell CSRR hexagonal configuration. *Scientific Reports* **10**, 1–20 (2020.).
- 23. Zapasnoy, A. S. *i dr.* Application of broadband microwave near-field sensors for glucose monitoring in biological media. *Applied Sciences* **11**, 1470 (2021.).
- 24. Fu, L. *i dr*. A miniaturized differential microwave microfluidic sensor with high decoupling. *IEEE Microwave and Wireless Components Letters* **31**, 909–912 (2021.).

- 25. Jankovic, N. & Radonic, V. A microwave microfluidic sensor based on a dualmode resonator for dual-sensing applications. *Sensors* **17**, 2713 (2017.).
- Galindo-Romera, G., Herraiz-Martinez, F. J., Gil, M., Martinez-Martinez, J. J. & Segovia-Vargas, D. Submersible printed split-ring resonator-based sensor for thin-film detection and permittivity characterization. *IEEE Sensors journal* 16, 3587–3596 (2016.).
- 27. Qureshi, S. A. *i dr.* Millimetre-wave metamaterial-based sensor for characterisation of cooking oils. *International Journal of Antennas and Propagation* **2021**, 1–10 (2021.).
- 28. Erdoğan, M. *i dr.* Determination of frying sunflower oil usage time for local potato samples by using microwave transmission line based sensors. *Measurement* **163**, 108040 (2020.).
- 29. Huang, J., Li, J.-S., Xu, G. & Wei, Z. A microfluidic sensor based on meta-surface absorber for rapid and nondestructive identification of edible oil species. *Progress In Electromagnetics Research C* **96**, 153–163 (2019.).
- Yadav, R. & Patel, P. N. Experimental study of adulteration detection in fish oil using novel PDMS cavity bonded EBG inspired patch sensor. *IEEE Sensors Journal* 16, 4354–4361 (2016.).
- 31. Ritchie, R. H. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Phys. Rev.* **106**, 874–881 (1957.).
- 32. Maier, S. *Plasmonics: Fundamentals and Applications* ISBN: 9780387378251 (Springer US, 2007.).
- 33. Anwar, R. S., Ning, H. & Mao, L. Recent advancements in surface plasmon polaritons-plasmonics in subwavelength structures in microwave and terahertz regimes. *Digital Communications and Networks* **4**, 244–257 (2018.).
- 34. Uqaili, J. A. *i dr*. Research on spoof surface plasmon polaritons (SPPS) at Microwave Frequencies: A bibliometric review. *Plasmonics* **17**, 1203–1230 (2022.).
- 35. Tang, W. X., Zhang, H. C., Ma, H. F., Jiang, W. X. & Cui, T. J. Concept, Theory, Design, and Applications of Spoof Surface Plasmon Polaritons at Microwave Frequencies. *Advanced Optical Materials* **7**, 1800421 (2019.).
- 36. Berry, S., Campbell, T., Hibbins, A. P. & Sambles, J. R. Surface wave resonances supported on a square array of square metallic pillars. *Applied Physics Letters* **100** (2012.).
- 37. Liu, L. *i dr.* Dual-band trapping of spoof surface plasmon polaritons and negative group velocity realization through microstrip line with gradient holes. *Applied physics letters* **107** (2015.).

- 38. Garcia-Vidal, F., Martin-Moreno, L. & Pendry, J. Surfaces with holes in them: new plasmonic metamaterials. *Journal of optics A: Pure and applied optics* **7**, S97 (2005.).
- 39. Zhang, J., Zhang, L. & Xu, W. Surface plasmon polaritons: physics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* **45**, 113001 (2012.).
- 40. He, P. H. *i dr*. A novel spoof surface plasmon polariton structure to reach ultrastrong field confinements. *Opto-Electronic Advances* **2**, 190001 (2019.).
- 41. Liu, L., Wang, J., Yin, X. & Chen, Z. N. Wide-angle beam scanning leaky-wave antenna using spoof surface plasmon polaritons structure. *Electronics* **7**, 348 (2018.).
- 42. Farokhipour, E., Mehrabi, M., Komjani, N. & Ding, C. A spoof surface plasmon polaritons (SSPPs) based dual-band-rejection filter with wide rejection bandwidth. *Sensors* **20**, 7311 (2020.).
- 43. Jaiswal, R. K., Pandit, N. & Pathak, N. P. Spoof surface plasmon polariton-based reconfigurable band-pass filter using planar ring resonator. *Plasmonics* **14**, 631–646 (2019.).
- 44. Guo, Y.-J., Xu, K.-D., Deng, X., Cheng, X. & Chen, Q. Millimeter-wave on-chip bandpass filter based on spoof surface plasmon polaritons. *IEEE Electron Device Letters* **41**, 1165–1168 (2020.).
- 45. Zhao, H. *i dr*. Tri-band band-pass filter based on multi-mode spoof surface plasmon polaritons. *IEEE Access* **8**, 14767–14776 (2020.).
- Cao, D., Li, Y. & Wang, J. A millimeter-wave spoof surface plasmon polaritonsfed microstrip patch antenna array. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation* 68, 6811–6815 (2020.).
- 47. Liu, L., Chen, M. & Yin, X. Single-layer high gain endfire antenna based on spoof surface plasmon polaritons. *IEEE Access* **8**, 64139–64144 (2020.).
- 48. Zhang, D., Zhang, K., Wu, Q. & Jiang, T. Efficient propagation of spoof surface plasmon polaritons supported by substrate integrated waveguide with bandpass features. *Journal of Physics D: Applied Physics* **53**, 425104 (2020.).
- 49. Pan, B. C., Luo, G. Q., Liao, Z., Cai, J. L. & Cai, B. G. Wideband miniaturized design of complementary spoof surface plasmon polaritons waveguide based on interdigital structures. *Scientific Reports* **10**, 3258 (2020.).
- 50. Le Zhang, Q. & Chan, C. H. Compact spoof surface plasmon polaritons waveguide integrated with blind vias and its applications. *IEEE Transactions on Circuits and Systems II: Express Briefs* **67**, 3038–3042 (2020.).

- 51. Chen, X. & Fan, W. Ultrasensitive terahertz metamaterial sensor based on spoof surface plasmon. *Scientific reports* **7**, 2092 (2017.).
- 52. Liu, G., Cheng, D., Zhang, B., Shu, G. & Wang, J. A microwave biosensor based on spoof surface plasmon polaritons for in vivo measurement of the water content of human skin tissues. *Journal of Physics D: Applied Physics* **52**, 205401 (2019.).
- 53. Liu, L. & Jiang, D. A microwave detector based on spoof surface plasmon polaritons structure. *AIP Advances* **11**, 035008 (2021.).
- Cselyuszka, N., Sakotic, Z., Crnojević-Bengin, V., Radonić, V. & Janković, N. Microwave Surface Plasmon Polariton-Like Sensor Based on Half-Mode Substrate Integrated Waveguide for Highly Sensitive Dielectric Constant Detection. *IEEE Sensors Journal* 18, 9984–9992 (2018.).
- 55. Wang, C. *i dr.* A Sensor for Characterisation of Liquid Materials with High Permittivity and High Dielectric Loss. *Sensors* **22** (2022.).
- 56. Nogueira, J. K. A., Oliveira, J. G. D., Paiva, S. B., Neto, V. P. S. & D'Assunção, A. G. A Compact CSRR-Based Sensor for Characterization of the Complex Permittivity of Dielectric Materials. *Electronics* **11** (2022.).
- 57. Shahzad, W. *i dr*. A Low-Cost Metamaterial Sensor Based on DS-CSRR for Material Characterization Applications. *Sensors* **22** (2022.).
- 58. Kitić, G. & Crnojević-Bengin, V. A Sensor for the Measurement of the Moisture of Undisturbed Soil Samples. *Sensors* **13**, 1692–1705 (2013.).
- 59. Kitic, G., Radonic, V. & Crnojević-Bengin, V. Soil moisture sensors based on metamaterials. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **34**, 689–693 (2012.).
- Khaled, D. E., Novas, N., Gazquez, J. A., Garcia, R. M. & Manzano-Agugliaro, F. Fruit and Vegetable Quality Assessment via Dielectric Sensing. *Sensors* 15, 15363–15397 (2015.).
- 61. Karuppuswami, S., Kaur, A., Arangali, H. & Chahal, P. P. A Hybrid Magnetoelastic Wireless Sensor for Detection of Food Adulteration. *IEEE Sensors Journal* **17**, 1706–1714 (2017.).
- Zeng, S., Trontz, A., Xiao, H. & Dong, J. Determining Dielectric Constants for Complex Solvent Mixtures by Microwave Sensing and Model Prediction. *The Journal of Physical Chemistry A* 125, 10245–10254 (2021.).
- 63. Altintas, O. *i dr.* Fluid, Strain and Rotation Sensing Applications by Using Metamaterial Based Sensor. *Journal of The Electrochemical Society* **164**, B567 (2017.).

- Zhang, L., Chen, J., Jing, B., Dong, Y. & Yu, X. New method for the discrimination of adulterated flaxseed oil using dielectric spectroscopy. *Food Analytical Methods* 12, 2623–2629 (2019.).
- 65. Valantina, S. R. *i dr.* Experimental investigation of electro-rheological properties of modeled vegetable oils. *Journal of food science and technology* **53**, 1328–1337 (2016.).
- 66. Lizhi, H., Toyoda, K. & Ihara, I. Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition. *Journal of food engineering* **88**, 151–158 (2008.).
- 67. Cataldo, A., Piuzzi, E., Cannazza, G., De Benedetto, E. & Tarricone, L. Quality and anti-adulteration control of vegetable oils through microwave dielectric spectroscopy. *Measurement* **43**, 1031–1039 (2010.).
- 68. Khaled, A. Y., Abd Aziz, S. & Rokhani, F. Z. Capacitive sensor probe to assess frying oil degradation. *Information Processing in Agriculture* **2**, 142–148 (2015.).
- 69. Liu, M. *i dr*. Frying oil evaluation by a portable sensor based on dielectric constant measurement. *Sensors* **19**, 5375 (2019.).
- Zhang, X., Ruan, C., Wang, W. & Cao, Y. Submersible high sensitivity microwave sensor for edible oil detection and quality analysis. *IEEE Sensors Journal* 21, 13230–13238 (2021.).
- 71. Kraszewski, A. Prediction of the dielectric properties of two-phase mixtures. *Journal of Microwave Power* **12**, 216–222 (1977.).
- 72. Sairin, M. A., Nizar, N. N. A., Abd Aziz, S. & Rokhani, F. Z. Study of dielectric permittivity and fatty acid composition for fats and oil in wide frequency spectroscopy measurement at 0.5–50 GHz u 2016 10th International Conference on Sensing Technology (ICST) (2016.), 1–5.
- 73. Sonkamble, A. A. *i dr.* Relaxation dynamics and thermophysical properties of vegetable oils using time-domain reflectometry. *European Biophysics Journal* **46**, 283–291 (2017.).
- 74. Xu, X.-Q., Tran, V. H., Palmer, M., White, K. & Salisbury, P. Chemical and physical analyses and sensory evaluation of six deep-frying oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 1091–1099 (1999.).
- 75. Ibrahim, N. A. & Zaini, M. A. A. Microwave-assisted solvent extraction of castor oil from castor seeds. *Chinese journal of chemical engineering* **26**, 2516–2522 (2018.).
- 76. Castiaux, A. D., Spence, D. M. & Martin, R. S. Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems. *Analytical Methods* **11**, 4220–4232 (2019.).

- 77. Coluccio, M. L. *i dr.* Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectronic Engineering* **208**, 14–28 (2019.).
- Paul, K. & Herwig, C. Scale-down simulators for mammalian cell culture as tools to access the impact of inhomogeneities occurring in large-scale bioreactors. *Engineering in life sciences* 20, 197–204 (2020.).
- 79. Ho, P. *i dr.* Reproduction of large-scale bioreactor conditions on microfluidic chips. *Microorganisms* **7**, 105 (2019.).
- 80. Marques, M. P. & Szita, N. Bioprocess microfluidics: applying microfluidic devices for bioprocessing. *Current opinion in chemical engineering* **18**, 61–68 (2017.).
- 81. Sengupta, P., Khanra, K., Chowdhury, A. R. & Datta, P. u *Bioelectronics and medical devices* 47–95 (Elsevier, 2019.).
- Verma, N. & Pandya, A. Challenges and opportunities in micro/nanofluidic and lab-on-a-chip. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 186, 289–302 (2022.).
- 83. Feng, J. J. & Hedtrich, S. A similarity scaling approach for organ-on-chip devices. *Lab on a Chip* **22**, 3663–3667 (2022.).
- 84. Wikswo, J. P. *i dr.* Scaling and systems biology for integrating multiple organson-a-chip. *Lab on a Chip* **13**, 3496–3511 (2013.).
- 85. Broucke, K., Van Pamel, E., Van Coillie, E., Herman, L. & Van Royen, G. Cultured meat and challenges ahead: A review on nutritional, technofunctional and sensorial properties, safety and legislation. *Meat Science* **195**, 109006 (2023.).
- 86. Alexander, P. *i dr*. Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? *Global Food Security* **15**, 22–32 (2017.).
- 87. Lynch, J. & Pierrehumbert, R. Climate impacts of cultured meat and beef cattle. *Frontiers in sustainable food systems*, 5 (2019.).
- O'Neill, E. N., Cosenza, Z. A., Baar, K. & Block, D. E. Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 686–709 (2021.).
- 89. https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_ to_Feed_the_World_in_2050.pdf?pwm=2414.
- 90. https://www.efsa.europa.eu/en/news/safety-cell-culture-derived-food-ready-scientific-evaluation.
- 91. Djisalov, M. *i dr.* Cultivating multidisciplinarity: Manufacturing and sensing challenges in cultured meat production. *Biology* **10**, 204 (2021.).

- 92. Pajčin, I. *i dr.* Bioengineering outlook on cultivated meat production. *Micromachines* **13**, 402 (2022.).
- 93. Chen, C. *i dr.* Cytotoxic effects of basic FGF and heparin binding EGF conjugated with cytotoxin saporin on vascular cell cultures. *Journal of Surgical Research* **75**, 35–41 (1998.).
- 94. Tamburini, E., Marchetti, M. G. & Pedrini, P. Monitoring key parameters in bioprocesses using near-infrared technology. *Sensors* **14**, 18941–18959 (2014.).
- 95. Shohan, S., Zeng, Y., Chen, X., Jin, R. & Shirwaiker, R. Investigating dielectric spectroscopy and soft sensing for nondestructive quality assessment of engineered tissues. *Biosensors and Bioelectronics* **216**, 114286 (2022.).
- 96. Ozturk, S., Thrift, J., Blackie, J. & Naveh, D. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnology and bioengineering* **53**, 372–378 (1997.).
- 97. Biechele, P., Busse, C., Solle, D., Scheper, T. & Reardon, K. Sensor systems for bioprocess monitoring. *Engineering in Life sciences* **15**, 469–488 (2015.).
- 98. Eyer, K. & Heinzle, E. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and bioengineering* **49**, 277–283 (1996.).
- 99. Linz, G. *i dr.* 3D-Printed Bioreactor with Integrated Impedance Spectroscopy for Cell Barrier Monitoring. *Advanced Materials Technologies* **6**, 2100009 (2021.).
- 100. Marziano, M. *i dr.* Monitoring Caco-2 to enterocyte-like cells differentiation by means of electric impedance analysis on printed sensors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1863**, 893–902 (2019.).
- 101. Hassan, Q., Ahmadi, S. & Kerman, K. Recent advances in monitoring cell behavior using cell-based impedance spectroscopy. *Micromachines* **11**, 590 (2020.).
- 102. Xu, Y. *i dr.* A review of impedance measurements of whole cells. *Biosensors and Bioelectronics* **77**, 824–836 (2016.).
- 103. Lei, K. F. Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment. *Micromachines* **5**, 1–12 (2014.).
- 104. Wei, M. *i dr.* A cell viability assessment approach based on electrical woundhealing impedance characteristics. *Biosensors and Bioelectronics* **124**, 25–32 (2019.).
- 105. De Ninno, A. *i dr.* High-throughput label-free characterization of viable, necrotic and apoptotic human lymphoma cells in a coplanar-electrode microfluidic impedance chip. *Biosensors and Bioelectronics* **150**, 111887 (2020.).

- 106. Morgan, H., Sun, T., Holmes, D., Gawad, S. & Green, N. G. Single cell dielectric spectroscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics* **40**, 61 (2006.).
- Carvell, J. P. & Dowd, J. E. On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance. *Cytotechnology* 50, 35–48 (2006.).
- Yoo, T. *i dr.* The real-time monitoring of drug reaction in HeLa cancer cell using temperature/impedance integrated biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 291, 17–24 (2019.).
- Pan, Y. *i dr.* 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing. *Biosensors and Bioelectronics* 130, 344–351 (2019.).
- 110. Nasir, N. & Al Ahmad, M. Cells electrical characterization: dielectric properties, mixture, and modeling theories. *Journal of Engineering* **2020**, 1–17 (2020.).
- 111. Metze, S., Ruhl, S., Greller, G., Grimm, C. & Scholz, J. Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors. *Bioprocess and biosystems engineering* **43**, 193–205 (2020.).
- 112. Matarèse, B. F. *i dr.* Use of SU8 as a stable and biocompatible adhesion layer for gold bioelectrodes. *Scientific reports* **8**, 5560 (2018.).
- 113. Nemani, K. V., Moodie, K. L., Brennick, J. B., Su, A. & Gimi, B. In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C* 33, 4453–4459 (2013.).
- Berni, A., Mennig, M. & Schmidt, H. u Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users (urednici Aegerter, M. A. & Mennig, M.) 89–92 (Springer US, Boston, MA, 2004.).
- 115. Huang, T., Yang, G. & Tang, G. A fast two-dimensional median filtering algorithm. *IEEE transactions on acoustics, speech, and signal processing* **27**, 13–18 (1979.).
- 116. Pizer, S. M. *i dr.* Adaptive histogram equalization and its variations. *Computer vision, graphics, and image processing* **39,** 355–368 (1987.).
- 117. Canny, J. A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 679–698 (1986.).
- 118. Sobel, I. & Feldman, G. An Isotropic 3x3 Image Gradient Operator 2015.
- 119. Soille, P. *i dr. Morphological image analysis: principles and applications* **3** (Springer, 1999.).
- 120. Ragoisha, G. & Bondarenko, A. EIS spectrum analyser 2016.
- 121. Dai, G. *i dr.* Electrochemical determination of salmonella typhimurium by using aptamer-loaded gold nanoparticles and a composite prepared from a metal-organic framework (type UIO-67) and graphene. *Microchimica Acta* **186** (2019.).
- 122. Ma, X., Lin, X., Xu, X. & Wang, Z. Fabrication of gold/silver nanodimer SERS probes for the simultaneous detection of salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. *Microchimica Acta* **188** (2021.).
- 123. Chen, M., Pan, L. & Tu, K. A fluorescence biosensor for salmonella typhimurium detection in food based on the nano-self-assembly of alendronic acid modified upconversion and gold nanoparticles. *Analytical Methods* **13**, 2415–2423 (2021.).
- 124. Bruno, J. G. Syringe filter-based DNA aptamer-enzyme-linked colorimetric assay of salmonella on lettuce. *Journal of Microbiological Methods* **193**, 106406 (2022.).
- 125. Wang, L. & Lin, J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: From separation to detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **128**, 115915 (2020.).
- 126. Sumitha, M. & Xavier, T. Recent advances in electrochemical biosensors A brief review. *Hybrid Advances* **2**, 100023 (2023.).
- 127. Singh, A. *i dr.* Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors* **11** (2021.).
- 128. Wu, J., Liu, H., Chen, W., Ma, B. & Ju, H. Device integration of electrochemical biosensors. *Nature Reviews Bioengineering* **1**, 346–360 (2023.).
- 129. Pereira da Silva Neves, M. M., González-García, M. B., Hernández-Santos, D. & Fanjul-Bolado, P. Future trends in the market for electrochemical biosensing. *Current Opinion in Electrochemistry* **10**, 107–111 (2018.).
- 130. Bard, A. J., Faulkner, L. R. & White, H. S. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (Wiley, 2022.).
- 131. Brett, C. & Brett, A. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications* ISBN: 9780198553885 (Oxford University Press, 1993.).
- 132. Bagotsky, V. Fundamentals of Electrochemistry ISBN: 9780471700586 (Wiley, 2005.).
- 133. Fisher, A. *Electrode Dynamics* ISBN: 9780191848988 (Oxford University Press, 2009.).
- 134. Guozhang Cao, W. Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications By Guozhang Cao.* ISBN: 1-86094-415-9. (Imperial College Press, 2004.).
- 135. Ozkan, S. A. *i dr. Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences voltammetry, Amperometry, biosensors, applications* (Springer Berlin, 2016.).
- 136. Elgrishi, N. *i dr*. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **95**, 197–206 (2017.).

- 137. Chowdhury, D. R., Spiccia, L., Amritphale, S. S., Paul, A. & Singh, A. A robust iron oxyhydroxide water oxidation catalyst operating under near neutral and alkaline conditions. *J. Mater. Chem. A* **4**, 3655–3660 (2016.).
- 138. Paixão, T. R. Measuring electrochemical surface area of nanomaterials versus the randlesševčík equation. *ChemElectroChem* **7**, 3414–3415 (2020.).
- 139. Lazanas, A. C. & Prodromidis, M. I. Electrochemical Impedance SpectroscopyA Tutorial. *ACS Measurement Science Au* **3**, 162–193 (2023.).
- 140. Bobrinetskiy, I. *i dr*. Advances in nanomaterials-based electrochemical biosensors for foodborne pathogen detection. *Nanomaterials* **11**, 2700 (2021.).
- Vidic, J. *i dr.* Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes. *Analytical Chemistry* 79, 3280–3290 (2007.).
- 142. Sui, Y. & Zorman, C. A. Inkjet printing of metal structures for electrochemical sensor applications. *Journal of The Electrochemical Society* **167**, 037571 (2020.).
- 143. Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P. & Jabbour, G. E. Inkjet printing—process and its applications. *Advanced materials* **22**, 673–685 (2010.).
- 144. Bernalte, E., Marın-Sánchez, C., Pinilla-Gil, E. & Brett, C. M. Characterisation of screen-printed gold and gold nanoparticle-modified carbon sensors by electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **709**, 70–76 (2013.).
- 145. https://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html.
- 146. https://www.palmsens.com/knowledgebase-article/screen-printed-and-film-electrodes/.
- 147. https://www.nanoshel.com/product/screen-printed-electrodes-biosensors.
- 148. Prasertying, P. *i dr.* Gold leaf electrochemical sensors: Applications and nanostructure modification. *Analyst* **146**, 1579–1589 (2021.).
- 149. Matsui, Y., Hamamoto, K., Kitazumi, Y., Shirai, O. & Kano, K. Diffusion-controlled mediated electron transfer-type bioelectrocatalysis using microband electrodes as ultimate amperometric glucose sensors. *Analytical Sciences* **33**, 845–851 (2017.).
- 150. Zamani, M. *i dr*. Surface requirements for optimal biosensing with disposable gold electrodes. *ACS Measurement Science Au* **2**, 91–95 (2021.).
- 151. https://barnabasgold.com/how-is-gold-leaf-made/.
- 152. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://ramontxrf. 260mb.net/Periodic_Table_and_X-ray_Energies.pdf.

- 153. Manges, A. R. *i dr.* Global extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) lineages. *Clinical microbiology reviews* **32**, 10–1128 (2019.).
- 154. Kotsiri, Z. *i dr.* Sensitive detection of E. coli in artificial seawater by aptamercoated magnetic beads and direct PCR. *Applied Sciences* **9**, 5392 (2019.).
- 155. Marin, M., Nikolic, M. V. & Vidic, J. Rapid point-of-need detection of bacteria and their toxins in food using gold nanoparticles. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **20**, 5880–5900 (2021.).
- 156. Tang, Y., Li, Z., Luo, Q., Liu, J. & Wu, J. Bacteria detection based on its blockage effect on silicon nanopore array. *Biosensors and Bioelectronics* **79**, 715–720 (2016.).
- 157. Dastider, S. G., Barizuddin, S., Dweik, M. & Almasri, M. A micromachined impedance biosensor for accurate and rapid detection of E. coli O157: H7. *RSC advances* **3**, 26297–26306 (2013.).
- 158. Zhang, J. *i dr.* An on-site, highly specific immunosensor for Escherichia coli detection in field milk samples from mastitis-affected dairy cattle. *Biosensors and Bioelectronics* **165**, 112366 (2020.).
- 159. El Ichi, S. *i dr*. Microconductometric immunosensor for label-free and sensitive detection of Gram-negative bacteria. *Biosensors and bioelectronics* **54**, 378–384 (2014.).
- 160. Bonnet, R. *i dr.* Highly labeled methylene blue-ds DNA silica nanoparticles for signal enhancement of immunoassays: application to the sensitive detection of bacteria in human platelet concentrates. *Analyst* **143**, 2293–2303 (2018.).
- 161. Vidic, J. & Manzano, M. Electrochemical biosensors for rapid pathogen detection. *Current Opinion in Electrochemistry* **29**, 100750 (2021.).
- Dos Santos, M. B. *i dr.* Highly sensitive detection of pathogen Escherichia coli O157: H7 by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 45, 174–180 (2013.).
- Maalouf, R. *i dr.* Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Analytical chemistry* **79**, 4879–4886 (2007.).
- 164. Laczka, O. *i dr.* Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 3633–3640 (2011.).
- 165. Ropero-Vega, J. L., Redondo-Ortega, J. F., Galvis-Curubo, Y. J., Rondón-Villarreal, P. & Flórez-Castillo, J. M. A bioinspired peptide in TIR protein as recognition molecule on electrochemical biosensors for the detection of E. coli O157: H7 in an aqueous matrix. *Molecules* 26, 2559 (2021.).

- 166. Varshney, M. & Li, Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle–antibody conjugates for detection of Escherichia coli O157: H7 in food samples. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2408–2414 (2007.).
- Gunasekaran, D., Gerchman, Y. & Vernick, S. Electrochemical detection of waterborne bacteria using bi-functional magnetic nanoparticle conjugates. *Biosensors* 12, 36 (2022.).
- 168. Lin, Y.-H. *i dr.* Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen Escherichia coli O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1832–1837 (2008.).
- 169. Safavieh, M., Ahmed, M. U., Tolba, M. & Zourob, M. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of Escherichia coli. *Biosensors and Bioelectronics* **31**, 523–528 (2012.).
- 170. Fatema, K. N., Liu, Y., Cho, K. Y. & Oh, W.-C. Comparative study of electrochemical biosensors based on highly efficient mesoporous ZrO2-Ag-G-SiO2 and In2O3-G-SiO2 for rapid recognition of E. coli O157: H7. ACS omega 5, 22719– 22730 (2020.).
- 171. Khan, S. *i dr*. In Silico and electrochemical studies for a ZnO–CuO-based immunosensor for sensitive and selective detection of E. coli. *ACS omega* **6**, 16076–16085 (2021.).
- 172. Galikowska, E. *i dr.* Specific detection of Salmonella enterica and Escherichia coli strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* **30**, 1067–1073 (2011.).
- 173. Jung, Y. *i dr.* Prevalence, Levels, and Viability of Salmonella in and on Raw Chicken Livers. *Journal of Food Protection* **82**, 834–843 (2019.).
- 174. https://collections.plos.org/collection/ferg2015/.
- 175. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal).
- 176. Authority, E. F. S. & European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **20**, e07666 (2022.).
- 177. Kothary, M. H. & Babu, U. S. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers : A Review. *Journal of Food Safety* **21**, 49–68 (2001.).

- 178. Park, S. *i dr*. Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. *Journal of food protection* **75**, 2055–2081 (2012.).
- 179. Hanning, I. B., Nutt, J. & Ricke, S. C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne pathogens and disease* **6**, 635–648 (2009.).
- 180. Kang, D., Rhee, M. & Costello, M. Development of a miniaturized four-culture method for the rapid enumeration of four bacterial groups in ground beef. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 197–202 (2003.).
- Kumar, R., Surendran, P. & Thampuran, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of Salmonella in seafood. *Letters in Applied Microbiology* 46, 221–226 (2008.).
- 182. Santos, P. D., Widmer, K. W. & Rivera, W. L. PCR-based detection and serovar identification of salmonella in retail meat collected from wet markets in Metro Manila, Philippines. *PLOS ONE* **15** (2020.).
- 183. Khalid, S. A., Hassan, R. Y. A., El Nashar, R. M. & El-Sherbiny, I. M. Voltammetric determination of Salmonella typhimurium in minced beef meat using a chip-based imprinted sensor. *RSC Adv.* **12**, 3445–3453 (6 2022.).
- 184. Bu, S.-J. *i dr.* Ferrocene-functionalized nanocomposites as signal amplification probes for electrochemical immunoassay of Salmonella typhimurium. *Microchimica Acta* **187**, 1–8 (2020.).
- 185. Huang, F. *i dr.* An ultrasensitive impedance biosensor for Salmonella detection based on rotating high gradient magnetic separation and cascade reaction signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **176**, 112921 (2021.).
- 186. Xiang, C. *i dr*. Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosangold nanoparticles composite film. *Talanta* **140**, 122–127 (2015.).
- Afonso, A. S. *i dr*. Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 40. Selected Papers from the World Congress on Biosensors, 121–126 (2013.).
- 188. Ranjbar, S., Shahrokhian, S. & Nurmohammadi, F. Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of Salmonella typhimurium. *Sensors and Actuators B: Chemical* 255, 1536–1544 (2018.).

- Sheikhzadeh, E., Chamsaz, M., Turner, A., Jager, E. & Beni, V. Label-free impedimetric biosensor for Salmonella Typhimurium detection based on poly [pyrroleco-3-carboxyl-pyrrole] copolymer supported aptamer. *Biosensors and Bioelectronics* 80, 194–200 (2016.).
- 190. Sadeghi, M., Kashanian, S., Naghib, S. M. & Arkan, E. A high-performance electrochemical aptasensor based on graphene-decorated rhodium nanoparticles to detect HER2-ECD oncomarker in liquid biopsy. *Scientific Reports* **12** (2022.).
- 191. Dieci, M. V., Miglietta, F., Griguolo, G. & Guarneri, V. Biomarkers for HER2positive metastatic breast cancer: Beyond hormone receptors. *Cancer Treatment Reviews* 88, 102064 (2020.).
- 192. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical reviews* **96**, 1533–1554 (1996.).
- 193. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Selfassembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews* **105**, 1103–1170 (2005.).
- 194. Nyamekye, C. K., Weibel, S. C. & Smith, E. A. Directional Raman scattering spectra of metal–sulfur bonds at smooth gold and silver substrates. *Journal of Raman Spectroscopy* **52** (2021.).
- 195. Holze, R. The adsorption of thiophenol on gold–a spectroelectrochemical study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 21364–21372 (2015.).
- 196. Levin, C. S. *i dr.* Chain-length-dependent vibrational resonances in alkanethiol self-assembled monolayers observed on plasmonic nanoparticle substrates. *Nano Letters* **6**, 2617–2621 (2006.).
- 197. Rygula, A. *i dr.* Raman spectroscopy of proteins: A Review. *Journal of Raman Spectroscopy* **44**, 1061–1076 (2013.).
- 198. Parkkila, P., Härkönen, K., Ilvonen, P., Laitinen, S. & Viitala, T. Protein A/Gbased surface plasmon resonance biosensor for regenerable antibody-mediated capture and analysis of nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **654**, 130015 (2022.).
- 199. Romih, T. *i dr.* The Effect of Preconditioning Strategies on the Adsorption of Model Proteins onto Screen-Printed Carbon Electrodes. *Sensors* **22** (2022.).
- 200. Kittler, S., Besleaga, M., Ebner, J. & Spadiut, O. Protein L—More Than Just an Affinity Ligand. *Processes* **9** (2021.).
- 201. Shen, C. *i dr.* Self-Assembled DNA Generated Electric Current Biosensor for HER2 Analysis. *Analytical Chemistry* **89**, 10264–10269 (2017.).

- 202. Ou, D. *i dr*. A dual-aptamer-based biosensor for specific detection of breast cancer biomarker HER2 via flower-like nanozymes and DNA nanostructures. *J. Mater. Chem. B* **7**, 3661–3669 (2019.).
- 203. Wang, W., Han, R., Chen, M. & Luo, X. Antifouling Peptide Hydrogel Based Electrochemical Biosensors for Highly Sensitive Detection of Cancer Biomarker HER2 in Human Serum. *Analytical Chemistry* **93**, 7355–7361 (2021.).
- 204. Wignarajah, S., Chianella, I. & Tothill, I. E. Development of Electrochemical Immunosensors for HER-1 and HER-2 Analysis in Serum for Breast Cancer Patients. *Biosensors* 13 (2023.).
- 205. Yang, X. *i dr.* An electrochemical biosensor for HER2 detection in complex biological media based on two antifouling materials of designed recognizing peptide and PEG. *Analytica Chimica Acta* **1252**, 341075 (2023.).
- 206. Li, D., Zhang, W., Miao, M., Liu, Y. & Yang, H. A high-performance PEDOT:PSS platform electrochemical biosensor for the determination of HER2 based on carboxyl-functionalized MWCNTs and ARGET ATRP. *New J. Chem.* 47, 15579–15587 (2023.).
- 207. Shamsipur, M., Emami, M., Farzin, L. & Saber, R. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on in situ silver deposition for determination of serum level of HER2 in breast cancer patients. *Biosensors and Bioelectronics* 103, 54–61 (2018.).
- 208. Wang, L. *i dr.* An electrochemical biosensor to identify the phenotype of aggressive breast cancer cells. *Chem. Commun.* **59**, 3890–3893 (2023.).
- 209. Zhang, Y. *i dr*. A novel electrochemical biosensor based on AMNFs@ZIF-67 nano composite material for ultrasensitive detection of HER2. *Bioelectrochemistry* **150**, 108362 (2023.).
- 210. Bruen, D., Delaney, C., Florea, L. & Diamond, D. Glucose sensing for diabetes monitoring: recent developments. *Sensors* **17**, 1866 (2017.).
- 211. Chen, C. *i dr.* Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Advances* **3**, 4473–4491 (2013.).
- 212. Mishra, G. K., Barfidokht, A., Tehrani, F. & Mishra, R. K. Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods* **7**, 141 (2018.).
- 213. Matthews, T. E. *i dr.* Glucose monitoring and adaptive feeding of mammalian cell culture in the presence of strong autofluorescence by near infrared Raman spectroscopy. *Biotechnology progress* **34**, 1574–1580 (2018.).
- 214. Amor-Gutiérrez, O., Costa-Rama, E. & Fernández-Abedul, M. T. based enzymatic electrochemical sensors for glucose determination. *Sensors* **22**, 6232 (2022.).

- 215. Xiao, J. *i dr.* Microfluidic chip-based wearable colorimetric sensor for simple and facile detection of sweat glucose. *Analytical chemistry* **91**, 14803–14807 (2019.).
- 216. Scognamiglio, V. & Arduini, F. The technology tree in the design of glucose biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **120**, 115642 (2019.).
- 217. Gong, P. *i dr.* Optical fiber sensors for glucose concentration measurement: A review. *Optics & Laser Technology* **139**, 106981 (2021.).
- Yu, M. *i dr*. Gold nanostructure-programmed flexible electrochemical biosensor for detection of glucose and lactate in sweat. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 882, 115029 (2021.).
- 219. Nunes, J. & Stone, H. *Introduction: Microfluidics* **7**, 6919–6920 (ACS Publications, 2022.).
- 220. Convery, N. & Gadegaard, N. 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering* **2**, 76–91 (2019.).
- 221. Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bırcă, A. C. & Grumezescu, A. M. Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 2011 (2021.).
- Agarwal, A., Salahuddin, A., Wang, H. & Ahamed, M. J. Design and development of an efficient fluid mixing for 3D printed lab-on-a-chip. *Microsystem Technologies* 26, 2465–2477 (2020.).
- 223. Hochstetter, A. Lab-on-a-chip technologies for the single cell level: Separation, analysis, and diagnostics. *Micromachines* **11**, 468 (2020.).
- 224. Cunha, M. L. *i dr.* Sample preparation for lab-on-a-chip systems in molecular diagnosis: a review. *Analytical Chemistry* **94**, 41–58 (2021.).
- 225. Dkhar, D. S., Kumari, R., Malode, S. J., Shetti, N. P. & Chandra, P. Integrated labon-a-chip devices: Fabrication methodologies, transduction system for sensing purposes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **223**, 115120 (2023.).
- 226. Li, Z. *i dr*. A review of microfluidic-based mixing methods. *Sensors and Actuators A: Physical*, 113757 (2022.).
- 227. Bayareh, M., Ashani, M. N. & Usefian, A. Active and passive micromixers: A comprehensive review. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification* **147**, 107771 (2020.).
- 228. Chen, Z. *i dr.* Acoustofluidic micromixers: From rational design to lab-on-a-chip applications. *Applied Materials Today* **26**, 101356 (2022.).

- 229. Ding, H. *i dr*. Mixing mechanism of a straight channel micromixer based on lightactuated oscillating electroosmosis in low-frequency sinusoidal AC electric field. *Microfluidics and Nanofluidics* **25**, 1–15 (2021.).
- 230. Chen, Y., Fan, X. & Kim, C. N. A new electromagnetic micromixer for the mixing of two electrolyte solutions. *Journal of Mechanical Science and Technology* **33**, 5989–5998 (2019.).
- 231. Raza, W., Hossain, S. & Kim, K.-Y. Effective mixing in a short serpentine splitand-recombination micromixer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **258**, 381–392 (2018.).
- 232. Pradeep, A., Raveendran, J., Ramachandran, T., Nair, B. G. & TG, S. B. Computational simulation and fabrication of smooth edged passive micromixers with alternately varying diameter for efficient mixing. *Microelectronic Engineering* 165, 32–40 (2016.).
- 233. Duša, A., Podunavac, I., Kojić, S. & Radonić, V. Design and Simulation of Microfluidic Micro-Mixer with Parallelogram Barriers u IEEE EUROCON 2019-18th International Conference on Smart Technologies (2019.), 1–3.
- 234. Enders, A., Siller, I. G., Urmann, K., Hoffmann, M. R. & Bahnemann, J. 3D printed microfluidic mixers—a comparative study on mixing unit performances. *Small* 15, 1804326 (2019.).
- 235. Tabeling, P. Introduction to Microfluidics ISBN: 9780199588169 (OUP Oxford, 2010.).
- 236. Sushanta K. Mitra, S. C. *Microfluidics and Nanofluidics Handbook* ISBN: 9780429093371 (CRC Press, 2012.).
- 237. Raj M, K. & Chakraborty, S. PDMS microfluidics: A mini review. *Journal of Applied Polymer Science* **137**, 48958 (2020.).
- 238. Sivashankar, S. *i dr*. A "twisted" microfluidic mixer suitable for a wide range of flow rate applications. *Biomicrofluidics* **10** (2016.).
- 239. Papautsky, I. & Peterson, E. Micromolding. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics; Li, D., Ed.; Springer US: Boston, MA, USA,* 1256–1267 (2008.).
- 240. Tsao, C.-W. & Wu, Z.-K. Polymer Microchannel and Micromold Surface Polishing for Rapid, Low-Quantity Polydimethylsiloxane and Thermoplastic Microfluidic Device Fabrication. *Polymers* **12**, 2574 (2020.).
- 241. Phan, T. H. T. & Kim, S.-J. Super-hydrophobic microfluidic channels fabricated via xurography-based polydimethylsiloxane (PDMS) micromolding. *Chemical Engineering Science* **258**, 117768 (2022.).

- 242. Kojic, S. P., Stojanovic, G. M. & Radonic, V. Novel cost-effective microfluidic chip based on hybrid fabrication and its comprehensive characterization. *Sensors* **19**, 1719 (2019.).
- 243. Yazdi, A. A. *i dr.* 3D printing: an emerging tool for novel microfluidics and lab-on-a-chip applications. *Microfluidics and Nanofluidics* **20**, 1–18 (2016.).
- 244. Au, A. K., Huynh, W., Horowitz, L. F. & Folch, A. 3D-printed microfluidics. *Angewandte Chemie International Edition* **55**, 3862–3881 (2016.).
- 245. Salentijn, G. I., Oomen, P. E., Grajewski, M. & Verpoorte, E. Fused deposition modeling 3D printing for (bio) analytical device fabrication: procedures, materials, and applications. *Analytical chemistry* 89, 7053–7061 (2017.).
- 246. Gao, B., Zhao, H., Peng, L. & Sun, Z. A review of research progress in selective laser melting (SLM). *Micromachines* **14**, 57 (2022.).
- 247. Hayes, B., Hainsworth, T. & MacCurdy, R. Liquid-solid co-printing of multimaterial 3D fluidic devices via material jetting. *Additive Manufacturing* **55**, 102785 (2022.).
- 248. Kojić, S. *i dr*. Optimization of hybrid microfluidic chip fabrication methods for biomedical application. *Microfluidics and Nanofluidics* **24**, 66 (2020.).
- 249. Lakkala, P., Munnangi, S. R., Bandari, S. & Repka, M. Additive manufacturing technologies with emphasis on stereolithography 3D printing in pharmaceutical and medical applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 100159 (2023.).
- 250. Dogan, A. A. & Dufva, M. Customized 3D-printed stackable cell culture inserts tailored with bioactive membranes. *Scientific Reports* **12**, 3694 (2022.).
- 251. Rossi, S., Puglisi, A., Raimondi, L. M. & Benaglia, M. Stereolithography 3Dprinted catalytically active devices in organic synthesis. *Catalysts* **10**, 109 (2020.).
- 252. Remaggi, G., Zaccarelli, A. & Elviri, L. 3D printing technologies in biosensors production: Recent developments. *Chemosensors* **10**, 65 (2022.).
- 253. Nelson, D., Lehninger, A. & Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry ISBN: 9780716771081 (W. H. Freeman, 2008.).
- 254. https://doc.comsol.com/5.5/doc/com.comsol.help.cfd/cfd_ug_fluidflow_ single.06.008.html.
- 255. https://doc.comsol.com/5.6/doc/com.comsol.help.battery/battery_ug_ chemsptrans.09.127.html.
- 256. https://formlabs-media.formlabs.com/datasheets/2001418-TDS-ENUS-0.pdf.

- 257. https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/ 2380.
- 258. Gupta, S. *i dr.* Correlation of salivary glucose level with blood glucose level in diabetes mellitus. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP* **21**, 334 (2017.).
- 259. Cowart, S. L. & Stachura, M. E. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition* (Butterworths, 1990.).
- 260. Kim, D. J., Oh, H. J., Park, T. H., Choo, J. B. & Lee, S. H. An easily integrative and efficient micromixer and its application to the spectroscopic detection of glucose-catalyst reactions. *Analyst* **130**, 293–298 (2005.).
- Pawinanto, R. E., Yunas, J. & Hashim, A. M. Micropillar based active microfluidic mixer for the detection of glucose concentration. *Microelectronic Engineering* 234, 111452 (2020.).
- 262. Comina, G., Suska, A. & Filippini, D. Low cost lab-on-a-chip prototyping with a consumer grade 3D printer. *Lab on a Chip* **14**, 2978–2982 (2014.).
- 263. Moon, B.-U. *i dr*. An enzymatic microreactor based on chaotic micromixing for enhanced amperometric detection in a continuous glucose monitoring application. *Analytical chemistry* **82**, 6756–6763 (2010.).

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања Развој и имплементација нових сензорских и биосензорских решења применом концепта Лабораторија-на-чипу Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање а) Универзитет у Новом Саду, Институт БиоСенс, Нови Сад б) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију, Нови Сад B) Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање Докторске студије (доктор наука – физика), докторска дисертација 1. Опис података 1.1 Врста студије Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају У оквиру докторске дисертације развијено је неколико сензорских и биосензорских решења применом концепта Лабораторија-на-чипу (ЛОЦ). 1.2 Врсте података а) <u>квантитативни</u> б) <u>квалитативни</u> 1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту г) административни подаци: навести врсту ______ д) узорци ткива: навести врсту

Национални портал отворене науке - open.ac.rs

1		1	1 .		
h)	снимши	MOTOP	пафите.	навести	BUCTA
י ן	оптици,	φυισι	րսարդշ.	nabeern	ppery

е) текст, навести врсту научни радови, студије, књиге

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

a) Excel фајл, датотека .csv, .xlsl

b) SPSS фајл, датотека /

- с) РDF фајл, датотека .pdf
- d) Текст фајл, датотека .docx
- е) ЈРБ фајл, датотека .jpg, .png
- f) Остало, датотека .m, .dxf, .cst, .mph

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 5 варијабли

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број мерења

1.3.3. Поновљена мерења

а) <u>да</u>

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је недељу дана

б) варијабле које се више пута мере односе се на квалитет детекције сензора

 в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као одговарајући датум експеримента

Напомене:

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) <u>Да</u>

б) Не

Ако је одговор не, образложити _

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип - лабораторијски експеримент

б) корелационо истраживање, навести тип /

ц) анализа текста, навести тип – научни радови, студије, књиге

д) остало, навести шта /

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Потенциостат/Галваностат/Анализатор импедансе,

Векторски анализатор мреже

Скенирајући електронски микроскоп

Микроскоп

Раманов спектрометар

Спектрофотометар

Профилометар

Гониометар

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да <u>Не</u>

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података?

- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет полатака? Описати					
Серијом контролних мерења и применом долатних метода утврђена је веродостојност и					
квалитет података.					
2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?					
Анализом података на основу релевантне стручне литературе.					
3. Третман података и пратећа документација					
3.1. Третман и чување података					
3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијум докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.					
3.1.2. URL adpeca https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf					
3.1.3. DOI					
3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?					
а) <u>Да</u>					
б) Да, али после ембарга који ће трајати до					
e) He					
Ако је одговор не, навести разлог					
3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.					
Образложење					
·					
3.2 Метаподаци и документација података					
3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?					
3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.					

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Трајно архивирани

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да <u>Не</u>

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да <u>Не</u>

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да <u>Не</u>

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (<u>https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html</u>) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да <u>Не</u>

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да <u>Не</u>

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

- 5.1. Подаци ће бити
- а) <u>јавно доступни</u>
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ивана Кундачина, ivana.kundacina@biosense.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ивана Кундачина, ivana.kundacina@biosense.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ивана Кундачина, ivana.kundacina@biosense.rs