
PhD Thesis

Nanostructured platforms for biosensing design

PhD student **Andreea Cernat**

PhD supervisors **Prof. Dr. Robert Săndulescu**

Dr. Fethi Bedioui



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	
1. Biosensors	17
1.1. Classical and new approaches immobilization techniques	18
1.2. Amperometric biosensors	21
1.2.1. Biosensors' clinical applications	21
2. Conductive polymers	25
2.1. New approaches in conductive polymers' development:	25
2.1.1. Bioanalytical applications	26
2.1.2. Conductive polymers' nanostructures fabrication	26
2.2. Polypyrrole	26
2.2.1. Polypyrrole's electrosynthesis mechanism	27
2.2.2. Polypyrrole's nanostructures fabrication	28
3. Nanostructured surfaces	29
3.1. Nanostructuring methods	29
3.1.1. Conventional methods	29
3.1.2. Alternative methods	30
3.2. Nanosphere lithography	31
3.2.1. Colloidal arrays' fabrication	31
3.2.2. Applications	33
4. Click chemistry	35
4.1. Click chemistry's mechanism	35
4.2. Applications	37
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Modified electrodes with HRP immobilized in polymeric films for paracetamol's analysis	43
1.1. Introduction	43
1.2. Materials and methods	45
1.2.1. Fabrication of polypyrrole and HRP modified electrode	46
1.3 Results and discussions	47
1.3.1. Glassy carbon electrodes modified with polypyrrole and HRP	47
1.3.2. Screen printed electrodes modified with polypyrrole and HRP	51
1.4. Conclusions	56

2. Structured platforms for click chemistry	57
2.1. Introduction	57
2.2. Materials and methods	58
2.2.1. Fabrication of the polystyrene template	58
2.2.2. The click chemistry reaction	59
2.3. Results and discussions	59
2.3.1. Fabrication of GC/structured-Poly(N-(10-azidodecyl)pyrrole)	60
2.3.2. Fabrication of GC/structured-Poly(4-azidobenzenediazonium)	63
2.3.3. Fabrication of GC/structured-Poly(N-(10-azidodecyl)pyrrole)-Ferrocene	66
2.3.4. Fabrication of GC/structured-Poly(4-azidobenzenediazonium)-Ferrocene	69
2.4. Conclusions	72
3. HRP nanopatterned electrodes by click chemistry: detection of paracetamol	75
3.1. Introduction	75
3.2. Materials and methods	76
3.2.1. Fabrication of the polystyrene template	76
3.2.2. The click chemistry reaction	77
3.3. Results and discussions	77
3.4. Conclusions	84
4. Nanopatterned surfaces modeling	87
4.1. Introduction	87
4.2. Materials and methods	90
4.2.1. Fabrication of the polystyrene template	91
4.2.2. Optimization by design of experiments	91
4.3. Results and discussions	91
4.4. Conclusions	97
5. General conclusions	99
6. Originality of the thesis	101
REFERENCES	103

Key words: nanosphere lithography, biosensors, click chemistry, HRP, paracetamol

The immobilization platform is of high importance for biosensors' development being involved in the stability of the enzyme and in consequence in the biosensors' performances. In order to achieve a higher immobilization surface area and to increase the amount of enzyme nanosphere lithography (NSL) was used. Recently, new methods for enzyme's immobilization were developed which can ensure the stability and prevent the loss of activity. Click chemistry reactions such as the cycloaddition, copper (I) catalyzed, between an azide group and an alkyne proved to be an appropriate method for biological compounds coupling on different type of functionalized polymers.

The main objective of this work is represented by polymeric nanostructured platforms' synthesis and characterization for biosensors' development. By using different diameter polystyrene (PS) beads as template, nano to microstructuration of polypyrrole (Ppy) was achieved by a two-step method which consisted in the PS beads' deposition, followed by the monomer's polymerization and template's removal.

Firstly, Horseradish peroxidase (HRP) was immobilized by entrapment in a Ppy film on both glassy carbon electrodes (GCE) and graphite based screen-printed electrodes (SPEs). There were tested three immobilization methods depending on the enzyme's concentration and Ppy's deposition. The two biosensors' configurations were tested towards paracetamol's detection and their performances were compared.

The main part of this study is represented by the nanostructuration of Ppy functionalized with azido functions. The properties of these systems were tested by electrochemical means following the coupling of a redox molecule such as ethynylferrocene via click chemistry reaction. The ferrocene's signal was studied on both unstructured and structured polymeric platforms and the surface apparent coverage in ferrocene active sites was evaluated. Also the surfaces were characterized by imagistic methods such as atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM).

After the protocol's optimization for nanostructured platforms' development, a biosensor for paracetamol's detection was designed. The HRP was immobilized on the polymeric layer by a two-step method: click chemistry reaction between the azido functions and ethynylbiotin and by a specific affinity reaction between biotin and HRP-avidin. The performances were also tested towards paracetamol's detection and they were evaluated on both unstructured and structured configurations.

The novelty of the studies resides in the immobilization of HRP via CuAAC click reaction on a polymeric platform, modified with azido functions, which was nanostructured by the means of NSL using a PS template.

The last part of this work presents an experimental design, which establishes the influence of several quantitative variables such as PS beads concentration and diameter and monomer concentration, on the nanopatterning of polymeric surfaces by using response surface modeling (RSM). The structured platforms were generated by a one-step method, which consisted in the simultaneous deposition of the PS template and monomer, followed by the PS beads' removal. After validation, the obtained model characterizes the controlled synthesis of nanopatterned platforms.

The combination between polymers' nanostructuration and CuAAC reaction can be also used for the immobilization of other enzymes in order to detect clinically important molecules. There can be also employed for antibodies and antigens coupling at the electrode's surface for immunosensors' development.

1. Aims of the thesis

- a. Development of modified electrodes with HRP immobilized in polymeric films for paracetamol's analysis on different types of electrodes;
- b. Generation of nano to microstructured platforms for click chemistry on conducting and insulating layers;
- c. Development of HRP nanopatterned electrodes by click chemistry;
- d. Nanopatterned surfaces modeling.

2. Study 1: Modified electrodes with HRP immobilized in polymeric films for paracetamol's analysis

HRP is an important enzyme with a heme-containing active center and it has been employed to the detection and quantification of neurotransmitters, immunoassays for tumor markers, antigens' detection, DNA analysis, and the detection of carnitine, cholesterol, glucose, lactate, clozapine, thiols, H₂O₂ and phenols^{1,2}.

2.1. Hypothesis

In order to immobilize HRP at the GCEs or at carbon (graphite) based SPEs, by entrapment into the electrochemically generated Ppy film, several methods were employed. The resulting devices were used to monitor the amperometric signal produced by the electrochemical reduction of the enzymatically-generated, electroactive oxidized species of paracetamol N-acetylbenzoquinoneimine (NAPQI) in the presence of hydrogen peroxide.

2.2. Results and discussion

The polymeric films' electric permeability was tested by cyclic voltammetry. The potential was swept between 0.5 and -0.4 V vs. Ag/AgCl at a scan rate of 0.05 V s⁻¹, in a 10⁻³ M K₃[Fe(CN)₆] solution in 0.1 M KCl. The presence of the reversible peaks of the redox couple proved a better electrical conductivity of the modified electrodes, and that the porous structure formed on the electrode's surface could accumulate the ferricyanide anions inside the positively charged films.

The NAPQI reduction potential for the chronoamperometric experiments was settled at -0.175 vs. SCE by performing cyclic voltammograms on the GC electrodes unmodified and modified with the Ppy film and the enzyme in a 0.01 M paracetamol solution in 0.1 M PBS pH 7.4.

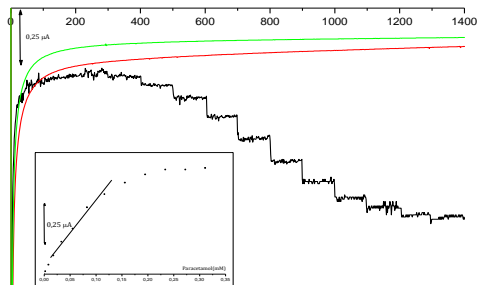


Fig. 1 Chronoamperograms obtained in PBS pH 7.4 on the Ppy-HRP modified GC electrode (1st method) during paracetamol additions in presence of 0.2 mM H₂O₂ (black line), during paracetamol additions in absence of 0.2 mM H₂O₂ (red line) and during PBS pH 7.4 additions in presence of 0.2 mM H₂O₂ (green line) Inset: calibration curve of the electrode; (working potential – 0.175 V vs. SCE).

Current–time recordings for successive addition of different volumes of 0.01 M paracetamol solution with the GC electrode modified with Ppy and HRP by the 1st method were performed at -0.175 V vs. SCE. The detection principle was represented by the enzymatically oxidation of paracetamol to NAPQI, which is subsequently reduced at the electrode’s surface. The enzyme was regenerated to its active form by hydrogen peroxide. The results indicated the compound’s role in the enzymatic turnover from the catalyzed oxidation of paracetamol. It should be mentioned that in the absence of hydrogen peroxide from the solution, the enzymatic oxidation of paracetamol might produce an electrical wiring of HRP by the polymer.

In the case of SPEs, the NAPQI’s reduction potential was settled at -0.35 V vs. Ag and current–time recordings for successive addition of different volumes of 0.01 M paracetamol solution were performed. As in the case of GC electrodes, the deviation from the linearity at higher concentrations of the substrate may occur from the saturation of the immobilized enzyme and/or inhibition of the immobilized enzyme.

In the case of the GC electrodes modified with Ppy films and HRP the dynamic linear detection range was the same for the three methods, suggesting that the film’s thickness and the amount of enzyme did not influence the amperometric response for paracetamol’s detection. The sensitivity results were higher for the biosensors’ developed on the SPEs than on the GC electrodes due to the higher working surface of the SPEs, which ensured a higher amount of immobilized HRP. For both electrodes configurations (GC/SPE), the highest sensitivity was obtained for the electrodes prepared by methods providing thicker and overoxidized Ppy films. This allows confirming that, in spite of the thickness of the native Ppy film, its overoxidation was efficient to ensure the easy accessibility of the incorporated enzyme.

3. Study 2: Structured platforms for click chemistry

The fabrication of micro to nanostructured platforms in a controlled manner plays an important role in extending and improving the functionalities of these systems. Polymers’ nanostructuring is able to generate different morphologies depending on their molecular constituents and their spatial orientation ^{3, 4}.

3.1. Hypothesis

By combining the nanosphere lithography (NSL) and the click chemistry concept, nanostructured surfaces with azide groups for CuAAC were fabricated. By applying NSL technique with a PS template were built polymeric structures modified with azide groups. These groups were used for the subsequently coupling with ethynylferrocene, as a model molecule via CuAAC reaction.

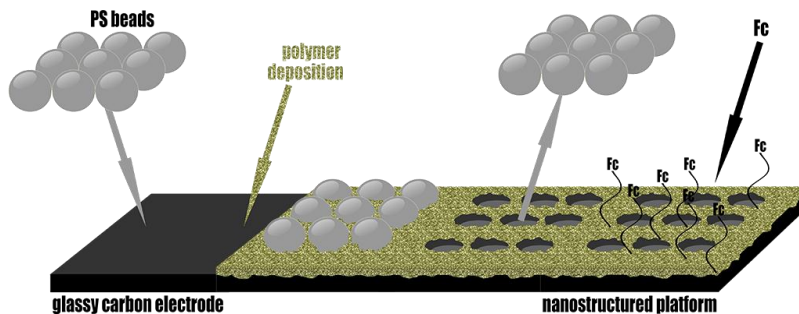


Fig. 2 Structured platforms' fabrication

3.2. Results and discussion

The electrodeposition of N-(10-azidodecyl)pyrrole (1) on the PS beads template was confirmed by the increase of the oxidation system at 0.6-0.7 V vs. Ag corresponding to the electroactivity of the steadily growing Ppy backbone. The AFM images proved a well-ordered network of pores formed after the template's removal step confirming the growth of the film surrounding the 900 nm PS spheres. The electrografting of 4-azidobenzenediazonium (2) was performed by cyclic voltammetry from a 0.1 M monomer solution in ACN. The presence of the aryldiazonium radical grafted at the electrode's surface was proved indirectly by its blocking properties.

Ethynylferrocene was coupled on the surface immobilized azide groups via the CuAAC reaction. The corresponding redox couple had a higher intensity in the case of the GC/structured-Poly1/2-Ferrocene, than in the GC/Poly1/2-Ferrocene case with a flat surface. The results confirmed that the patterning of Poly1/2 surface yielded an increased number of azide groups available for the click chemistry coupling with ethynylferrocene.

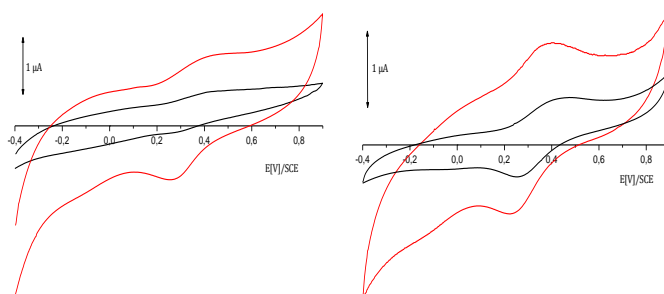


Fig. 3 Cyclic voltammetry of GC/Poly1/2-Ferrocene (black curve) and GC/structured- Poly1/2-Ferrocene in aqueous KPF_6 solution; (0.05 V s^{-1}).

The apparent surface coverage in electroactive ferrocene sites (Γ) was calculated from the integration of the electrical charge of the anodic/cathodic peaks of the cyclic voltammograms performed in 0.1 M KPF₆ solution on both electrodes configurations: GC/structured-Poly1/2-Ferrocene. The apparent surface coverage calculated for the GC/structured-Poly1-Ferrocene corresponded to almost one monolayer (ML), in comparison with the GC/Poly1-Ferrocene, which had less than one ML (0.1 ML). The structuration of the Poly1 generated a higher surface and an increase of almost ten times in ferrocene electroactive sites. In the case of GC/structured-Poly2-Ferrocene, the surface coverage was the equivalent of 3 ML, 3 times larger than in the case of GC/Poly2-Ferrocene. The results were in agreement with the influence of the film's thickness; in this case the reported literature values for aryldiazonium layers were lower than ones for the Ppy films.

Polymerization or electrografting of monomers bearing azide groups performed on a PS template generated a higher surface with specific, active groups for the coupling via CuAAC reaction of ethynylferrocene. The reported values of Γ indicate the advantages given by the matrix's structuration for having a larger specific area for the chemical anchorage of ferrocene. The coupling by click chemistry yielded an interesting route for the post-functionalization of electrodes and could be extended to other alkyne compounds. This approach offers potential applications such as engineering of porous materials for the immobilization of biomolecules such as enzymes, cells, bacteria, antibodies for bio/immunosensors' development

4. Study 3: HRP nanopatterned electrodes by click chemistry: detection of paracetamol

Several approaches were developed for the HRP immobilization via click chemistry⁵. Most of them were focused on the functionalization of the electrodes with azide or ethynyl functions, followed by the direct click coupling of the enzyme or by a two-step protocol, which consist in the coupling of azido-biotin and, then, of the avidin-enzyme by specific affinity between biotin and avidin^{6,7}.

4.1. Hypothesis

By combining the NSL with the CuAAC click reaction for the HRP immobilization on nanostructured azido-derivatized GC electrode by electropolymerization of N-(10 azidodecyl)pyrrole on a PS template, the sensitivity in paracetamol detection was improved.

4.2. Results and discussion

Using a two-step protocol HRP was coupled on the GC/structured-Poly1. First the biotin-acetylene was clicked to the azide functions via the CuAAC reaction in the presence of copper (I), which was generated in situ from the reaction between ascorbic acid and CuSO₄. The final immobilization of the enzyme was performed by attaching avidin-HRP to the already clicked biotin molecule by the means of specific affinity interactions between avidin and biotin. The detection principle of paracetamol was represented by the enzymatically oxidation to its electroactive, oxidized species,

NAPQI. NAPQI was reduced at the electrode's surface by maintaining the potential at -0.2 V vs. SCE. The HRP regeneration to its oxidized state was assured by H_2O_2 , which was added in the reaction environment.

The results showed a large increase of the sensitivity of the structured electrode's configuration compared with the non-structured one, which was indicated by the large increase of the plateau current after each paracetamol addition. The explanation was that the patterned surface presented a higher number of azido functions available for the HRP coupling, which led to a larger amount of enzyme immobilized at the electrode's surface and to the improvement of the parameters.

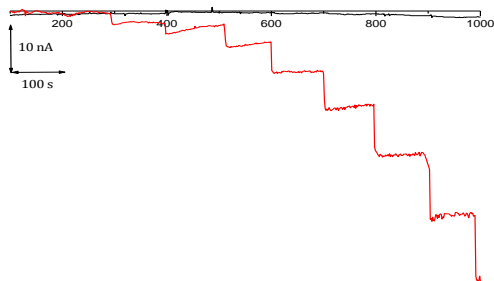


Fig. 4 Chronoamperograms obtained in PBS during paracetamol additions on the GC/Poly1-HRP (red line) and on GC/structured-Poly-HRP (black line). Paracetamol standard additions: $4 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $34.8 \mu\text{M}$, $54.6 \mu\text{M}$, $84.1 \mu\text{M}$, (final concentrations).

Sensitivity and LOD were improved for the structured platforms due to the larger immobilization surface. The sensitivity was increased 13 times and the LOD was improved 40 times for a 20% increase by nanostructuring of the available immobilization surface area. The NSL structuration yielded a greater number of azido functions available for biotin clicking, followed by the final coupling of avidin-HRP.

5. Study 4: Nanopatterned surfaces modeling

The *two-step method* of NSL consists, first in creating the pattern, and second performing the electrodeposition of the conductive or insulating polymeric films, followed by the removal of the PSB. The disadvantage is that obtaining the pattern is difficult to achieve and with a lower rate of reproducibility. An alternative to this method is the *one-step method* that can ensure the concomitant electrodeposition of the PSB and the polymeric film, followed by the removal of the PS.

5.1. Hypothesis

Using RSM (Modde 9.1, Umetrics AB), with a limited number of experiments (CCF) design, it was performed the study of the influence on nanopatterning of several quantitative variables, such as: PS beads' concentration or dimension and the monomer's concentration. The followed responses were the resulted film's thickness and the density of the nanopatterned surface. PSB of $100/900$ nm were polymerized in one step with Py and the spheres were dissolved in THF at room temperature for 24 h.

The obtained nanostructured layer was studied by AFM and the obtained results served for the design of the mathematical model (response surface model) best describing the correlations between variables and responses ⁸.

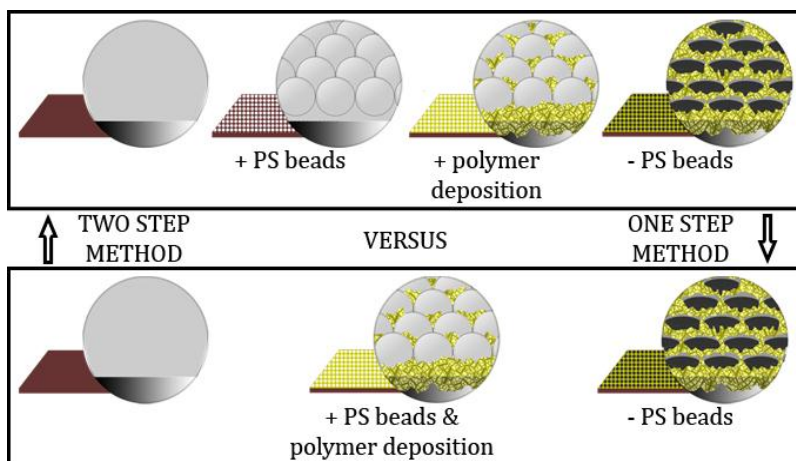


Fig. 5 Nanopatterned surfaces fabrication (two-step method vs. one step method)

5.2. Results and discussion

The three experimental parameters (molar concentration of Py, concentration of PS beads (wt. %) and the number of electropolymerization cycles) were able to influence the characteristics of the obtained nanopatterned layer, thus being considered the quantitative factors, and the layer thickness (nm) and the pattern surface density (number of cavities/analyzed surface) as responses. The matrix contained 10 model terms (the three variables, their interaction and a free term). Since two responses have been measured, the model was fitted simultaneously representing the variation of both responses to the variation of the studied factors. Partial Least Squares (PLS) is a multivariate method of estimating the model for all the responses simultaneously, which deals with many responses simultaneously, taking their covariance's into account.

The scaled and centered regression coefficients for both layer thickness and surface density reveal a strong positive influence of the Py concentration and by a much lesser extent a positive influence of the number of electropolymerization cycles. The concentration of the PS beads has a statistically insignificant effect on the followed responses, probably because the presently investigated concentration interval does not have a limiting effect. Lowering its concentration would most probably reveal its real effect on the measured responses.

For both responses a very good model fit is observed (Layer thickness $R^2=0.959$ and Surface density $R^2=0.891$), but most importantly the model shows and estimate of a very good prediction precision (Layer thickness $Q^2=0.873$ and Surface density $Q^2=0.793$).

The prediction capacity of the model could be further improved in the future if the concentration of 100 nm PS beads used in the model training would be adapted to a lower range, where its real influence on the studied responses could be accounted for.

The obtained and well-characterized chemometric model after its proper validation proves to be a useful tool for the controlled synthesis of nanopatterned platforms. This chemometrically assisted nanopatterning protocol opens up new possibilities towards rational design and reproducible surface patterning for biosensing platforms.

6. Final conclusions

The aim of this study was the synthesis of nanostructured surfaces via NSL, using a PS beads pattern with different diameter sizes for biosensors' design. The chosen model enzyme was HRP, which was immobilized by two methods: entrapment in a polymeric film and coupling via the CuAAC click reaction. In both cases the biosensors were tested towards NAPQI's detection, the enzymatically oxidized species of paracetamol.

In the case of HRP entrapment in the Ppy film, two electrodes configurations such as GC electrodes and graphite based SPEs were tested. The evaluated biosensors' performances were similar for the two electrode types, due to the limitations of the immobilization method, which did not maintain the catalytic activity of the enzyme. The differences among the amount of immobilized enzyme and thickness of the film did not reflect in the improvement of biosensors' performances.

One objective of this work was represented by the nanopatterning of Ppy modified with azido functions by NSL. The obtained structures by the two-step method were characterized by AFM and they proved to be well-defined two-dimensional honeycomb structures. The nanostructuration assured an increase of the available surface area for coupling several molecules. The platforms were tested also by coupling a redox molecule, ethynylferrocene by the CuAAC click reaction. The voltammetric response showed an increase of current intensity for the molecule immobilized on the structured surface in comparison with the one on the flat platform. The apparent coverage in active sites of ferrocene was evaluated and the same increase of the ferrocene amount was observed on the patterned platforms.

The main objective of this work was to test an innovative approach for enzymes' immobilization on nanopatterned polymeric platforms by the CuAAC click chemistry reaction. The coupling of HRP on the Ppy film functionalized with azido groups was achieved by a two-step protocol, which consisted in the CuAAC click reaction between the azido functions and ethynyl-biotin, followed by the specific affinity interactions between biotin and avidin-HRP. The NSL structuration yielded a greater number of azido functions available for the clicking of biotin, followed by the final coupling of avidin-HRP, ensuring a bigger amount of immobilized enzyme.

The biosensors' performances were also improved for the configuration where the enzyme was immobilized by the CuAAC click reaction technique than in the case of

polymeric entrapment, suggesting that the covalent immobilization of HRP maintained its tridimensional configuration and catalytic activity.

The influence of some experimental parameters, such as PS beads' diameter and concentration and monomer's concentration on the film's thickness and nanopatterned surface's density was studied by experimental design. The one-step can represent a suitable alternative for the classical method, for controlled structured platforms' fabrication and biosensors' development.

In conclusion, the biosensors' fabrication methodology developed in this work, which consists in a combination between polymers' nanostructuring and CuAAC reaction can be also used for the immobilization of other types of enzymes in order to detect clinically important molecules or for biofuels' fabrication.

7. References

1. Sima V, Cristea C, Bodoki E, Duțu G, Săndulescu R. Screen-printed electrodes modified with HRP-zirconium alcoxide film for the development of a biosensor for acetaminophen detection. *Central European Journal of Chemistry*. 2010; 8:1034-1040.
2. Cernat A, Tertis M, Griveau S, Bedioui F, Sandulescu R. New modified electrodes with HRP immobilized in polymeric films for paracetamol analysis. *Farmacia*. 2012;60:1-12.
3. Santos L, Ghilane J, Lacroix J-C. Surface patterning based on nanosphere lithography and electroreduction of in situ generated diazonium cation. *Electrochemistry Communications*. 2012;18:20-23.
4. Cernat A, Griveau S, Martin P, Lacroix JC, Farcau C, Sandulescu R, et al. Electrografted nanostructured platforms for click chemistry. *Electrochemistry Communications*. 2012; 23:141-144.
5. Hayat A, Marty J-L, Radi A-E. Novel Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Azide Covalently Immobilized on Ethynyl-Modified Screen-Printed Carbon Electrode via Click Chemistry. *Electroanalysis*. 2012; 24:1446-1452.
6. Ran Q, Peng R, Liang C, Ye SG, Xian YZ, Zhang WJ, Jin LT. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on electrografted 4-ethynylphenyl film via click chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 697:27-31.
7. Cernat A, Griveau S, Richard C, Bedioui F, Săndulescu R. Horseradish peroxidase nanopatterned electrodes by click chemistry: Application to the electrochemical detection of paracetamol. *Electroanalysis*. 2013; 25:1369-1372.
8. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikstrom C, Wold S. *Design Of Experiments: Principles And Applications*. Umetrics AB; 2008.

Teză de doctorat

Platforme nanostructurate pentru design-ul biosenzorilor

Student **Andreea Cernat**

Codirectori științifici **Prof. dr. Robert Săndulescu**
Dr. Fethi Bedioui



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



INTRODUCERE	13
--------------------	----

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Biosenzori	17
1.1. Tehnici de imobilizare clasice și de actualitate	18
1.2. Biosenzori amperometrici	21
1.2.1. Aplicațiile clinice ale biosenzorilor	21
2. Polimeri conductori	25
2.1. Noi abordări în dezvoltarea polimerilor conductori	25
2.1.1. Aplicații bioanalitice	26
2.1.2. Fabricare de nanostructuri polimerice conductoare	26
2.2. Polipirol	26
2.2.1. Mecanismul de electrosinteză al polipirolului	27
2.2.2. Fabricarea de nanostructuri ale polipirolului	28
3. Suprafețe nanostructurate	29
3.1. Metode de nanostructurare	29
3.1.1. Metode convenționale	29
3.1.2. Metode alternative	30
3.2. Litografia nanosferică	31
3.2.1. Fabricarea structurilor coloidale	31
3.2.2. Aplicații	33
4. Chimia click	35
4.1. Mecanismul chimiei click	35
4.2. Aplicații	37

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Electrozi modificați cu HRP imobilizată în filme polimerice pentru detecția paracetamolului	43
1.1. Introducere	43
1.2. Materiale și metode	45
1.2.1. Prepararea electrozilor modificați cu polipirol și HRP	46
1.3. Rezultate și discuții	47
1.3.1. Electrozi din carbon vitros modificați cu polipirol și HRP	47
1.3.2. Electrozi planari imprimați modificați cu polipirol și HRP	51
1.4. Concluzii	56

2. Platforme structurate pentru chimia click	57
2.1. Introducere	57
2.2. Materiale și metode	58
2.2.1. Fabricarea modelului din polistiren	58
2.2.2. Reacția de chimie click	59
2.3. Rezultate și discuții	59
2.3.1. Fabricarea GCE/structurat Poli(N-(10-azidodecil)pirol)	60
2.3.2. Fabricarea GCE/structurat-Poli(4-azidobenzenediazonium)	63
2.3.3. Fabricarea GCE/structurat Poli(N-(10-azidodecil)pirol)-Ferocen	66
2.3.4. Fabricarea GCE/structurat-Poli(4-azidobenzenediazonium)-Ferocen	69
2.4. Concluzii	72
3. Electrozi nanostructurați și modificați prin chimie click cu HRP pentru detecția paracetamolului	75
3.1. Introducere	75
3.2. Materiale și metode	76
3.2.1. Fabricarea modelului din polistiren	76
3.2.2. Reacția de chimie click	77
3.3. Rezultate și discuții	77
3.4. Concluzii	84
4. Modelarea de suprafețe nanostructurate	87
4.1. Introducere	87
4.2. Materiale și metode	90
4.2.1. Fabricarea modelului din polistiren	91
4.2.2. Optimizarea prin desing experimental	91
4.3. Rezultate și discuții	91
4.4. Concluzii	97
5. Concluzii generale	99
6. Originalitatea tezei	101
REFERINȚE	103

Cuvinte cheie: litografie nanosferică, biosenzori, chimie click, HRP, paracetamol

Platforma de imobilizare are o importanță majoră în dezvoltarea biosenzorilor, fiind implicată în stabilitatea enzimei și, în consecință, în performanțele biosenzorilor. Litografia nanosferică (NSL) a fost utilizată în vederea generării unei suprafețe de imobilizare mai mari și a creșterii cantității de enzimă imobilizată. În general, nanostructurarea polimerilor a îmbunătățit și extins performanțele acestora. Recent, s-au dezvoltat noi metode de imobilizare ale enzimelor, care pot asigura stabilitatea și preveni pierderea activității biologice. Reacțiile chimice, de tipul cicloadiției azidă-alchină, catalizată de cupru (I) s-au dovedit a fi o metodă adecvată de imobilizare a compușilor biologici pe suprafața filmelor polimerice funcționalizate.

Principalul obiectiv al acestei teze este reprezentat de sinteza și caracterizarea de platforme nanostructurate pentru elaborarea de biosenzori. A fost realizată nano/microstructurarea polipiroulului (Ppy) prin utilizarea ca model a sferelor de polistiren de diferite diametre. Procedeu a constat în două etape: prima a fost reprezentată de depunerea sferelor, urmată de polimerizarea monomerului, iar la final de îndepărtarea modelului.

Inițial, peroxidaza din hrean (HRP) a fost imobilizată în filme de Ppy pe electrozi din carbon vitros (GCE) și planari imprimați (SPE) pe bază de grafit. Au fost testate trei metode de imobilizare în funcție de concentrația enzimei și a Ppy. Cele două configurații de biosenzori au fost testate față de paracetamol și performanțele lor au fost comparate.

Partea principală a acestui studiu este reprezentată de nanostructurarea filmelor de Ppy funcționalizate cu grupări azidice. Proprietățile acestor sisteme au fost testate prin metode electrochimice prin cuplarea prin chimie click a unei molecule redox de tipul etinilferocenului. A fost studiat semnalul ferocenului pe platformele nestructurate și structurate și a fost evaluată densitatea aparentă în grupări active de ferocen. Suprafețele au fost caracterizate și prin metode imagistice de tipul microscopiei cu forță atomică (AFM) și a microscopiei cu flux de electroni.

După optimizarea protocolului de dezvoltare al platformelor nanostructurate, rezultatele au fost utilizate în vederea realizării de biosenzori pentru detecția paracetamolului. HRP a fost imobilizată printr-un protocol în două etape: reacția de chimie click între grupările azidice de pe filmul polimeric și etinilbiotina, urmată de reacția de afinitate specifică între biotină și avidină-HRP. Performanțele biosenzorilor au fost evaluate față de detecția paracetamolului pentru ambele tipuri de suprafețe nestructurate, respectiv structurate.

Originalitatea studiilor rezidă în imobilizarea HRP prin chimie click la nivelul platformelor structurate, funcționalizate cu grupări azidice.

Ultima parte a lucrării reprezintă elaborarea unui design experimental, în vederea stabilirii influenței diferitelor variabile cantitative, cum ar fi concentrația și diametrul sferelor din polistiren și concentrația monomerului prin modelarea suprafețelor de răspuns. În acest caz, platformele structurate generate prin metoda într-o singură etapă, care constă în depunerea concomitentă a sferelor din polistiren și a monomerului, etapă urmată de îndepărtarea modelului. După validare, modelul obținut a caracterizat sinteza controlată a platformelor nanostructurate.

Combinăția între structurarea polimerului și reacția de chimie click poate fi utilizată și pentru imobilizarea altor tipuri de enzime în vederea detecției unor analiți clinici importanți. De asemenea, prin aceasta metodă pot fi imobilizați anticorpii sau antigenele în vederea elaborării de imunosenzori.

1. Obiectivele tezei

- e. Elaborarea de electrozi modificați cu HRP înglobată în filme polimerice pentru detecția paracetamolului;
- f. Generarea de platforme nano/microstructurate pentru chimia click pe filme polimerice conductoare sau izolante;
- g. Elaborarea de electrozi nanostructurați în vederea imobilizării HRP prin chimie click pentru detecția paracetamolului;
- h. Obținerea controlată de suprafețe structurate prin design experimental.

2. Studiul 1: Elaborarea de electrozi modificați cu HRP înglobată în filme polimerice pentru detecția paracetamolului

HRP este o enzimă cu un centru activ pe bază de o moleculă hem și a fost utilizată pentru detecția și cuantificarea de neurotransmițători, markeri tumorali, antigene, analiză ADN, detecția de carnitină, colesterol, glucoză, lactate, clozapină, tioli, peroxid de hidrogen și fenoli ^{1,2}.

2.1. Ipoteză de lucru

În scopul imobilizării HRP, pe suprafața electrozilor de GCE sau SPE pe bază de grafit au fost utilizate mai multe metode. Biosenzorii au fost utilizați pentru monitorizarea semnalului amperometric generat de reducerea electrochimică a N-acetilbenzochinoniminei (NAPQI), specia electroactivă, produsă prin oxidarea enzimatică a paracetamolului, în prezență de peroxid de hidrogen.

2.2. Rezultate și discuții

Permeabilitatea electrică a filmului polimeric a fost testată prin voltametrie ciclică. Potențialul a fost scanat între 0.5 și -0.4 V vs. Ag/AgCl cu o viteză de scanare de 0.05 V s⁻¹, într-o soluție 10⁻³ M K₃[Fe(CN)₆] în 0.1 M KCl. Prezența cuplului redox Fe³⁺/Fe²⁺ a demonstrat o bună conductivitate electrică a filmului polimeric, demonstrând că structura poroasă de pe suprafața electrodică poate acumula anioni fericianură în filmul încărcat pozitiv.

Potențialul de reducere al NAPQI, necesar pentru experimentele cronoamperometrice a fost stabilit la -0.175 vs. ECS prin efectuarea de voltamograme ciclice într-o soluție de 0.01 M paracetamol în 0.1 M tampon fosfat, pH 7.4 pe electrozii din GCE nemodificați și modificați cu Ppy și enzimă.

Au fost efectuate înregistrări curent-timp în urma adărilor succesive a diferite volume de soluție de 0.01 M paracetamol pe electrozii din GCE modificați cu Ppy și HRP.

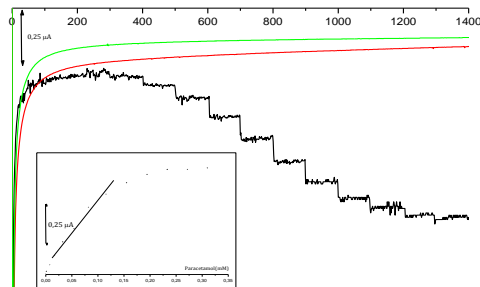


Fig. 1 Cronoamperograme în tampon fosfat pH 7.4 pe electrozii Ppy-HRP din GCE modificați prin prima metodă în timpul adăugării de paracetamol în prezență de H_2O_2 0.2 mM (curba neagră), în absență de H_2O_2 (curba roșie) și în timpul adăugărilor de tampon fosfat pH 7.4 în prezență de H_2O_2 0.2 mM (curba albastră); Inset: curbă de calibrare a electrodului, potențial de lucru – 0.175 V vs. ECS

Principiul detecției de paracetamol a fost reprezentat de oxidarea enzimatică a paracetamolului la NAPQI, care a fost redus ulterior la suprafața electrodului. Enzima a fost regenerată la forma sa activă în prezența peroxidului de hidrogen. În absența peroxidului de hidrogen, oxidarea enzimatică a paracetamolului poate produce o conectare electrică a enzimei la polimer.

În cazul SPE, potențialul de reducere al NAPQI a fost stabilit la -0.35 V vs. Ag, fiind efectuate înregistrări curent-timp în urma adăugărilor succesive de volume de 0.01 M de paracetamol. La fel ca în cazul electrozilor din GCE, deviația de liniaritate la concentrații crescute poate fi determinată de saturarea și/sau inhibarea enzimei imobilizate.

Performanțele biosenzorilor au fost evaluate prin intermediul domeniului de liniaritate, sensibilitate și limita de detecție

În cazul electrozilor din GCE modificați cu Ppy și HRP, domeniul de liniaritate a fost același pentru toate cele trei metode, sugerând că grosimea filmului și cantitatea de enzimă imobilizată nu au influențat răspunsul amperometric în cazul detecției paracetamolului. Rezultatele de sensibilitate au fost mai bune pentru SPE decât pentru GCE, datorită suprafeței mai mari de imobilizare a SPE, care a asigurat o cantitate mai mare de enzimă imobilizată. În ambele configurații, cea mai bună sensibilitate a fost obținută pentru electrozii elaborați după metodele care asigurau o grosime mai mare a filmului supraoxidat. Rezultatele au confirmat că, în ciuda grosimii filmului de Ppy, supraoxidarea acestuia a asigurat accesibilitatea la enzima încorporată.

3. Studiul 2: Platforme nanostructurate pentru chimia click

Fabricarea într-o manieră controlată a platformelor nano/microstructurate constituie un rol important în extinderea funcționalităților acestor sisteme. Structurarea polimerilor poate genera o varietate de morfologii în funcție de constituenții moleculari și de orientarea lor spațială^{3,4}.

3.1. Ipoteză de lucru

Prin combinarea NSL cu reacția de chimie click, au fost generate platforme structurate, funcționalizate cu grupări azido, în vederea imobilizării de diferite

componente. Prin aplicarea tehnicii NSL și utilizarea unui model cu sfere de polistiren au fost fabricate platforme structurate cu grupări azidice, la nivelul cărora a fost cuplat etinilferocenu.

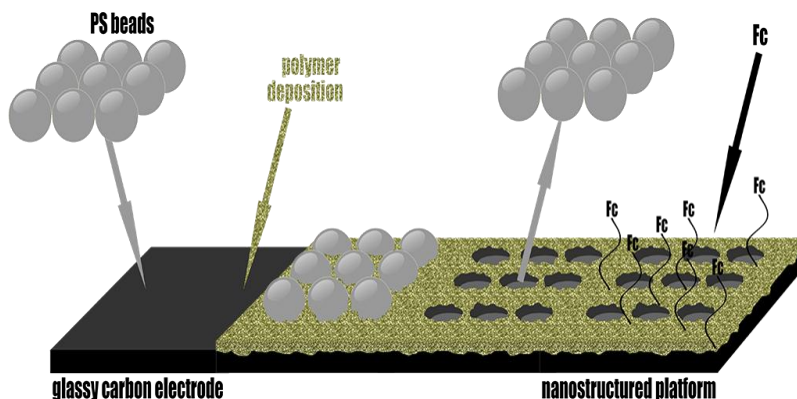


Fig. 2 Protocolul de fabricare al suprafețelor structurate

3.2. Rezultate și discuții

Electrodepunerea N-(10-azidodecil)pirolului (1) pe modelul din sfere de polistiren a fost confirmată de creșterea sistemului de oxidare la 0.6-0.7 V vs. Ag, corespunzând electroactivității Ppy. Imaginile AFM au demonstrat formarea unei rețele ordonate de pori după îndepărtarea sferelor de polistiren, confirmând creșterea filmului polimeric în jurul sferelor cu diametru de 900 nm.

Electrografarea 4-azidobenzenediazoniumului (2) a fost efectuată prin voltametrie ciclică dintr-o soluție de monomer 0.1 M în ACN. Prezența radicalului arildiazoniului grefat pe suprafața electrodică a fost demonstrată indirect prin proprietățile blocante.

După caracterizarea suprafețelor, etinilferocenu a fost cuplat prin intermediul chimiei click. Cuplul redox corespunzător a prezentat o intensitate mai mare în cazul GCE/structurat-Poli1/2-Ferocen datorită suprafeței de imobilizare mai mare decât în cazul GCE/Poli1/2-Ferocen. Rezultatele au confirmat faptul că structurarea suprafeței Poli1/2 a generat un număr crescut de grupări azidice disponibile pentru cuplarea prin reacție click a etinilferocenu.

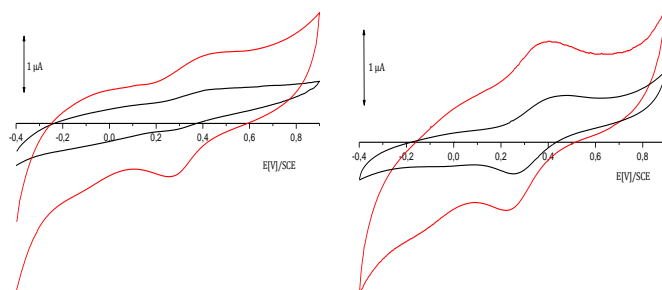


Fig. 3 Voltametrie ciclică pe GCE/Poli1/2-Ferocen (curba neagră) și GCE/structurat-Poli1/2-Ferocene KPF₆ (curba roșie); (0.05 V s⁻¹)

A fost calculată densitatea în centre electroactive de ferocen (Γ) prin integrarea sarcinii electrice a peak-urilor anodice/catodice ale voltamogramelor efectuate într-o soluție de apoasă de 0.1 M KPF₆ pe ambele configurații electrodice: GCE/structurat-Poli1/2-Ferocen. În cazul GC/structurat-Poli1-Ferocen, suprafața aparent acoperită în centre active de ferocen a corespuns aproximativ unui monostrat, în comparație cu GCE/Poli1-Ferocen, care a prezentat aproximativ 0.1 monostraturi. Chiar și în acest caz, structurarea Poli1 a generat o creștere de 10 ori mai mare în centre active de ferocen. În cazul GCE/structurat-Poli2-Ferocen, suprafața acoperită a reprezentat echivalentul a trei monostraturi, de trei ori mai mare decât în cazul platformei nestructurate. Rezultatele au fost în concordanță cu influența grosimii filmului, în acest caz valorile obținute pentru filme de diazoniu fiind mai reduse decât în cazul celor conductoare de Ppy.

Polimerizarea, respectiv electrografarea monomerilor funcționalizați cu grupări azidice efectuată pe un model din polistiren, a generat platforme cu suprafețe crescute, cu grupări active, disponibile cuplării etinilferocenului prin reacția de chimie click. Valorile Γ calculate au demonstrat avantajul determinat de structurare în vederea obținerii unei suprafețe crescute pentru cuplarea chimică a ferocenului. Cuplarea de molecule prin intermediul chimiei click a evidențiat o metodă de postfuncționalizare a electrozilor, care ar putea fi extinsă și altor compuși cu grupări alchilice. Această abordare poate constitui un punct de plecare spre alte posibile aplicații cum ar fi dezvoltarea de materiale poroase în vederea imobilizării de biomolecule, de tipul enzimelor, celulelor, bacteriilor sau anticorpilor.

4. Studiul 3: Imobilizarea HRP la nivelul platformelor structurate prin reacție de chimie click

Literatura menționează mai multe abordări de imobilizarea ale HRP prin intermediul reacției de chimie click ⁵. În mare parte acestea pun accent pe funcționalizarea electrozilor cu grupări azidă sau etinil, urmată fie de cuplarea directă prin reacție click a enzimei, fie de cuplare printr-un protocol în două etape, mai întâi prin cuplarea azidobiotinei și apoi, printr-o reacție de afinitate specifică a avidin-enzimei ^{6,7}.

4.1. Ipoteză de lucru

Prin combinarea NSL cu reacția de chimie click în vederea imobilizării HRP pe electrozi nanostructurați, modificați cu grupări azidice, prin electropolimerizarea N-(10azidodecil)pirol pe un model din polistiren, sensibilitatea în detecția paracetamolului a fost îmbunătățită.

4.2. Rezultate și discuții

Prin utilizarea unui protocol în doi pași, HRP a fost cuplată la nivelul grupărilor azidice din GCE/structurat-Poli1. Inițial, etinilbiotina a fost cuplată la nivelul grupărilor azidice prin reacția de chimie click, în prezența Cu(I), generat *in situ* prin reacția dintre acidul ascorbic și CuSO₄. Imobilizarea finală a enzimei a fost realizată prin atașarea avidinei-HRP la biotină. Principiul de detecție al paracetamolului e reprezentat prin

oxidarea enzimatică la varianta sa oxidată, electroactivă, NAPQI. NAPQI a fost redus la suprafața electrodică prin fixarea potențialului la -0.2 V vs. ECS. Regenerarea enzimei la forma sa oxidată a fost asigurată de peroxidul de hidrogen, prezent în mediul de reacție.

Rezultatele au demonstrat o creștere a sensibilității în cazul suprafeței structurate, față de cea nestructurată. Acest fapt a fost dovedit de scăderea curentului după fiecare adăugare de paracetamol. Îmbunătățirea performanțelor biosenzorului construit pe suprafața structurată s-a datorat unei cantități mai mari de enzimă imobilizată la nivelul grupărilor azidice.

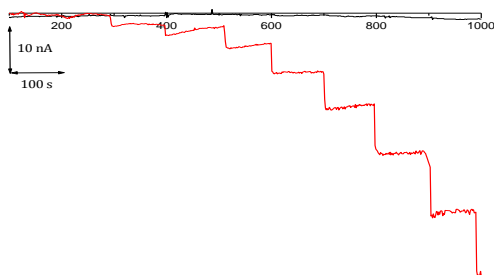


Fig. 4 Cronoamperograme în tampon fosfat în timpul adăugărilor de paracetamol pe GCE/Poli1-HRP (curba roșie) și pe GCE/structurat-Poli-HRP (curba neagră). Adiții standard de paracetamol: $4 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$, $34.8 \mu\text{M}$, $54.6 \mu\text{M}$, $84.1 \mu\text{M}$ (concentrații finale).

Atât sensibilitatea, cât și limita de detecție au fost îmbunătățite, datorită creșterii suprafeței de imobilizare. O creștere cu 20% a suprafeței de imobilizare a determinat o îmbunătățire de 13 ori a sensibilității și de 40 de ori a limitei de detecție. Structurarea prin NSL a generat o creștere a numărului de grupări azidice, disponibile pentru cuplarea biotinei, urmată de cea a avidinei-HRP. Această strategie de imobilizare poate fi aplicată și pentru alte tipuri de enzime, în vederea elaborării de biosenzori pentru detecția unor compuși farmaceutici și biomedicali. Poate fi abordată, de-asemena, și pentru imobilizarea anticorpilor și antigenelor pentru design-ul biosenzorilor.

5. Studiul 4: Modelarea de suprafețe nanostructurate

Metoda NSL în două etape constă în crearea modelului din polistiren, electropolimerizarea filmului polimeric conductor sau izolant, iar, la final, îndepărtarea sferelor de polistiren. Dezavantajul acestei tehnici este reprezentat de faptul că realizarea modelului este dificilă, cu o reproductibilitate redusă. O alternativă este reprezentată de metodă într-o singură etapă, care constă în depunerea concomitentă a sferelor de polistiren și a monomerului, urmată de îndepărtarea sferelor de polistiren.

5.1. Ipoteză de lucru

Prin utilizarea RSM (Modde 9.1, Umetrics AB) cu un număr redus de experimente a fost studiată influența diferitelor variabile (dimensiunea și concentrația

sferelor de polistiren și concentrația pirolului) asupra nanostructurării. Răspunsurile studiate au fost reprezentate de grosimea filmului și densitatea suprafeței structurate. Sfere de polistiren cu diametru de 100 sau 900 nm au fost polimerizate concomitent cu Py, iar sferile au fost dizolvate în THF.

Structurile obținute au fost studiate prin intermediul AFM, iar rezultatele obținute au fost utilizate pentru elaborarea modelului matematic, care a descris cel mai bine corelațiile între variabile și răspunsuri ⁸.

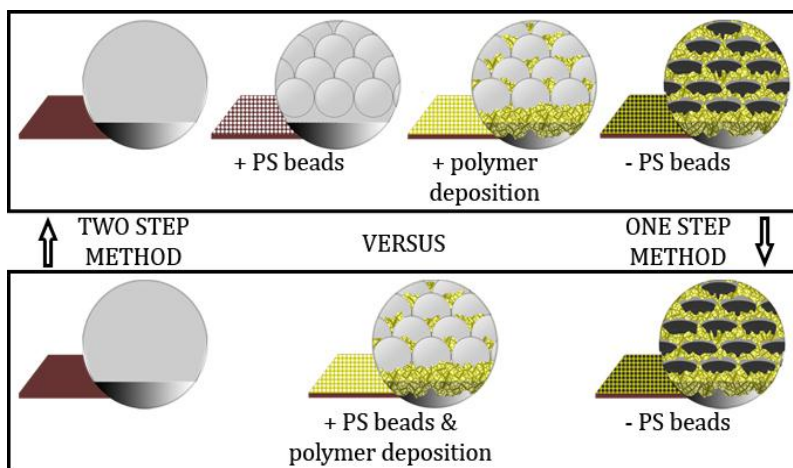


Fig. 5 Fabricarea suprafețelor nanostructurate prin metoda în două etape și într-o etapă

5.2. Rezultate și discuții

Caracteristicile filmului nanostructurat au fost influențate de 3 factori experimentali (concentrația molară a Py, concentrația sferelor de polistiren (wt %) și numărul de cicluri de polimerizare), care au fost considerați factori cantitativi, iar grosimea filmului (nm) și densitatea suprafeței structurate (numărul de cavități/suprafața analizată) au fost considerate răspunsuri.

Matricea a conținut 10 termeni model (3 variabile, interacțiunile dintre ele și un termen liber). Din moment ce două răspunsuri au fost înregistrate, modelul a fost fitat simultan, reprezentând variația ambelor răspunsuri la variația ambilor factori studiați. Coeficienții de regresie normalizați și centrați determinați atât pentru grosimea filmului, cât și pentru densitatea de suprafață au demonstrat o puternică influență pozitivă a concentrației de Py și o influență pozitivă, mai redusă a numărului de cicluri de electropolimerizare. Concentrația sferelor de polistiren a avut un efect statistic nesemnificativ asupra răspunsurilor urmărite, deoarece intervalul de concentrație ales nu a avut efect limitant.

Analiza datelor statistice ale modelului generat a demonstrat o foarte bună fitare a modelului pentru ambele răspunsuri studiate (grosimea filmului $R^2=0.959$ și densitatea suprafeței $R^2=0.891$), dar cel mai important este că modelul a estimat o foarte bună precizie a predicției (grosimea filmului $Q^2=0.873$ și densitatea suprafeței $Q^2=0.793$). Capacitatea de predicție a modelului poate fi îmbunătățită în viitor, dacă

intervalul de concentrație al sferelor de polistiren de 100 nm, ar putea fi adaptat unor valori mai reduse, unde reala lor influență asupra răspunsurilor ar putea fi evidențiată.

Modelul chemometric caracterizat după validarea sa, s-a dovedit a fi o metodă utilă în vederea sintezei controlate a platformei nanostructurate. Metoda de structurare într-o singură etapă poate constitui o alternativă a metodei clasice în două etape. Protocolul de nanostructurare, asistat chemometric, deschide noi posibilități față de design-ul rațional și sinteza reproductibilă a platformelor structurate pentru elaborarea de biosenzori.

6. Concluzii finale

Scopul acestui studiu a fost reprezentat de generarea de suprafețe nanostructurate prin intermediul NSL, prin utilizarea unui model cu sfere de polistiren, de diferite diametre pentru design-ul biosenzorilor, în vederea detecției unor compuși farmaceutici. Enzima model aleasă a fost reprezentată de HRP, care a fost imobilizată prin două metode: înglobarea în filme polimerice și cuplarea prin intermediul chimiei click. În ambele cazuri, biosenzorii au fost testați față de detecția NAPQI, specia generată de oxidarea enzimatică a paracetamolului.

În cazul înglobării HRP în filmul de Ppy au fost testate două configurații de electrozi: GCE și SPE pe bază de grafit. Performanțele biosenzorilor au fost similare în cele două cazuri datorită limitelor determinate de metoda de imobilizare, care nu a menținut activitatea catalitică a enzimei. Diferențele determinate de cantitatea de enzimă imobilizată și grosimea filmului nu au reflectat îmbunătățirea performanțelor.

Un alt obiectiv a fost reprezentat de structurarea prin NSL a filmelor polimerice funcționalizate cu grupări azidice. Structurile obținute prin metoda în două etape au fost caracterizate prin tehnici AFM și au demonstrat generarea unor suprafețe bidimensionale, de tip figure de miere.

Nanostructurarea a determinat o creștere a suprafeței disponibile pentru cuplarea mai multor molecule. Platformele au fost testate prin cuplarea unei molecule redox de tipul etinilferocenului prin intermediul chimiei click. Răspunsul voltametric a prezentat o creștere a intensității semnalului moleculei imobilizate pe suprafața structurată, în comparație cu cea nestructurată.

Obiectivul principal al acestei teze a fost prezentarea unei noi abordări în imobilizarea unei enzime, și anume reacția de chimie click pe o suprafață polimerică structurată. Cuplarea HRP pe filmul polimeric funcționalizat cu grupări azidice a fost efectuat în două etape: reacția de cuplare a etinilbiotinei, urmată de interacțiunile de afinitate specifică între biotină și avidină-HRP. Structurarea prin NSL a generat un număr crescut de grupări azidice, disponibile pentru cuplarea biotinei, urmată de imobilizarea avidinei-HRP, asigurând un număr crescut de grupări azidice.

Performanțele biosenzorilor au fost îmbunătățite pentru configurația de biosenzor în care HRP a fost imobilizată printr-o reacție de chimie click, comparativ cu înglobarea în filme polimerice, sugerând că imobilizarea covalentă a enzimei a contribuit la menținerea configurației tridimensionale și a activității catalitice.

Prin design experimental a fost studiată influența unor parametri experimentali cum ar fi diametrul și concentrația sferelor de polistiren și pirol asupra grosimii filmului și a densității de suprafață. Modelul chemometric validat s-a dovedit a fi o metodă adecvată generării controlate de platforme nanostructurate, având o capacitate de predicție bună. În acest caz, metoda într-o singură etapă reprezintă o alternativă a metodei clasice pentru fabricarea controlată de platforme structurate pentru elaborarea de biosenzori.

7. Bibliografie selectivă

1. Sima V, Cristea C, Bodoki E, Duțu G, Săndulescu R. Screen-printed electrodes modified with HRP-zirconium alcoxide film for the development of a biosensor for acetaminophen detection. *Central European Journal of Chemistry*. 2010;8:1034-1040.
2. Cernat A, Tertis M, Griveau S, Bedioui F, Sandulescu R. New modified electrodes with HRP immobilized in polymeric films for paracetamol analysis. *Farmacia*. 2012;60:1-12.
3. Santos L, Ghilane J, Lacroix J-C. Surface patterning based on nanosphere lithography and electroreduction of in situ generated diazonium cation. *Electrochemistry Communications*. 2012;18:20-23.
4. Cernat A, Griveau S, Martin P, Lacroix JC, Farcau C, Sandulescu R, et al. Electrografted nanostructured platforms for click chemistry. *Electrochemistry Communications*. 2012;23:141-144.
5. Hayat A, Marty J-L, Radi A-E. Novel Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Azide Covalently Immobilized on Ethynyl-Modified Screen-Printed Carbon Electrode via Click Chemistry. *Electroanalysis*. 2012;24:1446-1452.
6. Ran Q, Peng R, Liang C, Ye SG, Xian YZ, Zhang WJ, Jin LT. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on electrografted 4-ethynylphenyl film via click chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 697:27-31.
7. Cernat A, Griveau S, Richard C, Bedioui F, Săndulescu R, Horseradish peroxidase nanopatterned electrodes by click chemistry: Application to the electrochemical detection of paracetamol. *Electroanalysis*. 2013;25:1369-1372.
8. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikstrom C, Wold S. *Design Of Experiments: Principles And Applications*. Umetrics AB; 2008.