Senzori za određivanje pesticida

Kovačević, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:611036

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Tea Kovačević

SENZORI ZA ODREĐIVANJE PESTICIDA

(SENSORS FOR PESTICIDES DETERMINATION)

Završni rad

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2022.

SAŽETAK

Pesticidi su tvari čija su glavne uloge sprečavanje bolesti biljaka i uklanjanje neželjenih vrsta u poljoprivredi. U današnje vrijeme postoji mnogo vrsta takvih molekula. Mogu biti sintetizirane kemijskim i prirodnim putem, a na tržištu su puno češći kemijski sintetizirani pesticidi. Pošto se radi o kemijskim spojevima, često pitanje je utjecaj njihovih ostataka na okoliš. Za analizu ostataka pesticida koriste se brojne metode od kojih su najčešće tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, masena spektrometrija i plinska kromatografija. U novije vrijeme većina tih metoda zamijenjene su senzorima. Razvijanje senzora može biti složen i skup proces. Senzori se najčešće koriste pri analizi za detekciju organofosfata. Od mnogih vrsta senzora u ovom radu naglasak je stavljen na fluorescentne i kolorimetrijske senzore koji kao signal daju vizualnu promjenu boje. Fluorescentni senzori mogu biti posredovani enzimom ili potpomognuti antitijelom ili „plastičnim antitijelom“ (molekularno utisnuti polimer, eng. *molecular imprinted polymer*, MIP). Fluorescentni senzori najčešće prate fluorescentni rezonantni prijenos energije (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) gdje postoje akceptorska i donorska boja, a prijelaz energije se događa pri pobuđenom stanju s donorske na akceptorsku boju. Kolorimetrijski senzori na bazi zlatnih nanočestica predstavljaju budućnost detekcije pesticida. Mogu se podijeliti na senzore na bazi aptamera, senzore na bazi antitijela i na enzimske senzore. Osim ove dvije već spomenute vrste senzora, razvijaju se i senzori na bazi Ramanovog raspršenja koji djeluju potpomognuti zlatnim ili srebrnim nanočesticama.

Ključne riječi: senzori, pesticidi, fluorescencija, kolorimetrija, nanočestice

ABSTRACT

Pesticides are substances whose main roles are to prevent plant diseases and eliminate unwanted species in agriculture. There are many types of such molecules nowadays. They can be synthesized chemically and naturally. Chemically synthesized pesticides are much more common on the market. Since these are chemical compounds, the impact of their residues on the environment is a question that is commonly asked. Numerous methods are used to analyze pesticide residues, the most common of which are high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, and gas chromatography. More recently, most of these methods have been replaced by sensors. Developing sensors can be complex and expensive process. Sensors are most commonly used for organophosphates detection. Out of the many types of sensors, in this paper emphasis is placed on fluorescent and colorimetric sensors that cause a visual change of color as a signal. Fluorescent sensors can be mediated by an enzyme, assisted by an antibody or polymer-assisted (molecular imprinted polymer, MIP). They ususally follow fluorescence resonance energy transfer (FRET) principles where there are acceptor and donor dyes present, and the energy transition occurs in the excited state from the donor to the acceptor dye. Colorimetric sensors based on gold nanoparticles represent the future of pesticides detection. They can be divided into aptamer-based sensors, antibody-based sensors, and enzyme-based sensors. In addition to these two already mentioned types of sensors, Raman-based sensors supported by gold or silver nanoparticles are also in high demand by scientists.

Keywords: sensors, pesticides, fluorescence, colorimetry, nanoparticles

SADRŽAJ

1. Uvod 1
2. Senzori 3
3. Način rada i građa senzora 5
   3.1. Element za prepoznavanje 5
   3.2. Pretvornici 5
4. Vrste senzora 6
5. Optički senzori 8
   5.1. Fluorescencijski optički senzori 9
      5.1.1. Enzimski posredovane metode 9
      5.1.2. Metode temeljene na molekularno utisnutim polimerima 13
      5.1.3. Antitijelom posredovane metode 15
      5.1.4. Senzori temeljeni na domaćin-gost interakciji 16
      5.1.5. Senzori temeljeni na aptameru 16
6. Senzori temeljeni na kolorimetriji 20
   6.1. Enzimski kolorimetrijski senzori 20
   6.2. Kolorimetrijski senzori temeljeni na aptameru 23
   6.3. Kolorimetrijski senzori temeljeni na antitijelu 24
7. Senzori temeljeni na Ramanovu raspršenju 25
8. Zaključak 27
9. Literatura 28

1. UVOD

Senzori su široko rasprostranjeni uređaji koji se koriste za detekciju, mjerenje i pretvorbu fizikalnih signala [1].

U ovom radu fokus će biti na senzorima koji se koriste pri detekciji pesticida. Pesticidima se nazivaju spojevi čija je primarna namjena zaštita biljaka od bolesti, korova, grinja, insekata i drugih štetnih organizama. Mogu biti kemijskog i biološkog porijekla [2].

Postoji veliki broj podjela pesticida, a najpoznatija i najkorištenija je podjela na organokloride, organofosfate, sintetičke pesticide, karbamate i anorganske pesticide [3]. Detaljnija podjela pesticida prema kemijskom sastavu vidljiva je u tablici 1.

Tablica 1: Podjela pesticida s obzirom na kemijski sastav [4]

Anorganski spojevi	živa, fluor, barij, sumpor, bakar, klorati, borati, cijanovodik (HCN), ugljikov monoskid (CO)	
Organski spojevi	Organoklorni	diklor-difenil-trikloretan (DDT), toksafen, endrin, heptaklor, heksaklorcikloheksan (HCH) i dr.
	Organofosforni	paration, malation, bromfos, diklorvos, tetraklorvinfos i dr.
	Derivati karbaminske, tio- i ditiokarbaminske kiseline	kabaril, cineb, maneb i dr.
	Dušikovi derivati fenola	4,6-dinitro-*o*-crezol (DNOC), dinobuton i dr.
	Derivati fenoksioctene kiseline	2,4-diklorfenoksioctena kiselina (2,4-D), 2,4,5-triklorfenoksioctena kiselina (2,4,5-T) i dr.
	Piretrini i piretroidi	Alfametrin, aletrin, cipermetrin, deltamerin, prirodni piretrin i dr.
	Organoživine tvari	Etilživin klorid i dr.
	Ftalamidi	Kaptan i dr.
	Triazini, derivati karbamida	
	Mineralna ulja	

Organokloridi su najstariji poznati pesticidi koji su se koristili. Zaostaci ove vrste pesticida predstavljaju veliki problem pri njihovu uklanjanju iz okoliša. Vrlo su kratkog poluživota pa su brzo bili zamijenjeni organofosfatima [3].

Prema namjeni, pesticidi se mogu podijeliti na: fungicide, insekticide, nematicide, rodenticide, fitohormone itd.

Pesticide je moguće kemijski sintetizirati, ali u novije vrijeme postoji težnja za njihovim sintetiziranjem iz prirodnih materijala. Tako nastali pesticidi nazvani su biopesticidima, a njihovi glavni predstavnici su: bialafos, karvon i laminarin [5].

Veliki dio pesticida je još uvijek kemijski sintetiziran čime se javlja problem ostataka tih spojeva koji mogu kontaminirati hranu što može dovesti do trovanja ljudi. Vlada i zakonodavstvo svake države donose odluke o regulaciji upotrebe pesticida i dozvoljenim količinama njihovih ostataka u hrani. U današnje vrijeme postoje pesticidi čiji mehanizam djelovanja nije poznat, ali se svejedno svakodnevno koriste. Upravo to je glavni razlog važnosti kontrole razine ostataka pesticida u okolišu čime se ujedno kontroliraju kvaliteta i sigurnost hrane te sigurnost ljudi općenito [6].

Poznate su brojne metode detekcije pesticida od kojih su najbitnije:

- tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC);
- tankoslojna kromatografija;
- plinska kromatografija;
- masena spektrometrija;
- kapilarna elektroforeza.

Primjenom ovih metoda nailazi se na veliki broj problema poput složene pripreme uzorka, dugotrajnosti metode i visoke cijene.

Alternativa koja je zamijenila ostale metode je uporaba senzora. Najveće prednosti su njihova isplativost zbog brzine analize zajedno s visokom osjetljivošću i selektivnom detekcijom [5].

2. SENZORI

Senzorom se nazivaju uređaji koji mjere fizikalne veličine kao što su tlak, vlažnost zraka i temperatura te ih pretvaraju u oblik signala koji je pogodan za obradu. Prilikom izrade senzora teži se što većoj funkcionalnosti pri što manjoj veličini. Primarni fokus kod odabira senzora je njegova točnost mjerenja. Postoji mnogo načina i vrsta podjele senzora od kojih su najčešće podjele prema: mjernoj veličini, karakteristikama, načinu detekcije, tipu pretvaranja, području primjene i materijalu izrade.

Najčešća podjela senzora je na kemijske (mjere koncentraciju analita koju pretvaraju u signal za daljnju obradu), biosenzore (kemijski senzori koji koriste biološki element za prepoznavanje) i fizikalne (mjere masu, temperaturu, tlak i ostale fizikalne veličine). Postoje razne podvrste navedenih senzora od kojih su najčešći i najkorišteniji elektrokemijski [1].

Karakteristike senzora na temelju kojih se oni odabiru za uporabu pri različitim procesima su: osjetljivost, točnost, preciznost, granica detekcije, selektivnost, ponovljivost, stabilnost, linearnost, mjerno područje i vrijeme odaziva [7].

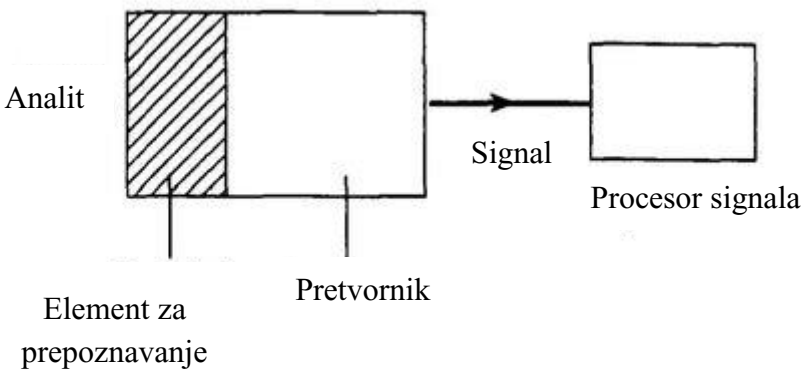
- Osjetljivost je mjera promjene vrijednosti izmjerenog signala senzora po jedinici promjene koncentracije analita.
- Točnost je mjera odstupanja eksperimentalnih rezultata od očekivanih vrijednosti. Izražava se pogreškama. One mogu biti apsolutne i relativne pogreške.
- Preciznost je izraz slaganja između niza ponovljenih mjerenja koja su izvedena iz istog uzorka, u zadanim uvjetima. Iskazuje se kroz obnovljivost, ponovljivost i međupreciznost. Izražava se pomoću varijance, standardne devijacije i relativne standardne devijacije.
- Granica detekcije je najmanja moguća odrediva koncentracija analita.
- Selektivnost je svojstvo koje govori u kojoj mjeri senzor razlikuje analit od drugih supstanci.
- Stabilnost je sposobnost zadržavanja funkcije tijekom vremena.
- Mjerno područje predstavlja interval između najmanje i najveće izmjerene vrijednosti koncentracije analita unutar kojeg bi analit bio određen točno i precizno. To je područje u kojem je odnos promjene signala senzora u ovisnosti o promatranom svojstvu analita linearan. Idealan senzor je onaj čiji je signal u potpunosti linearan, što je u praksi neizvedivo.

- Vrijeme odziva je vremenski period potreban za postizanje 95% vrijednosti izlaznog signala.

Rezolucija i preciznost signala te osjetljivost i linearnost su prednosti korištenja senzora kao metode određivanja tvari kao što su pesticidi. S obzirom na definiciju osjetljivosti, senzor je osjetljiviji ukoliko je promjena mjerenog signala po jedinici koncentracije analita veća.
Primjena senzora je vrlo velika te se moderni analitički sustavi često zasnivaju na njihovoj upotrebi. Tako se oni mogu naći i koristiti u kućanstvu, medicini, graditeljstvu, proizvodnji, elektrotehnici, informatici itd. [2, 7].

3. NAČIN RADA I GRAĐA SENZORA

Prilikom korištenja senzora dolazi do pretvorbe fizikalne veličine u digitalnu ili analognu. Senzori odgovaraju na samu promjenu stanja te se ta reakcija transformira u izlazni signal [2]. Senzori se prema osnovnoj građi sastoje od dva dijela, elementa za prepoznavanje i pretvornika. Shema senzora ilustrirana je na slici 1.



Slika 1. Shema senzora [1].

3.1. ELEMENT ZA PREPOZNAVANJE

Jedna od dvije ključne komponente svakog senzora je element za prepoznavanje. Element za prepoznavanje omogućava senzoru njegovu selektivnost. Jamči selektivnu reakciju na točno određeni analit ili skupinu analita čime se sprečava interferencija drugih tvari. Metode analize specifičnih iona već su dugo dostupne korištenjem ion selektivnih elektroda, koje obično sadrže membranu koja je selektivna za određeni analit. Kod biosenzora je element za prepoznavanje biološki. Najčešće se koristi enzim, a mogu se koristiti i nukleinske kiseline, antitijela i receptori [1].

3.2. PRETVORNICI

Pretvornici su detekcijski uređaji koji informaciju o analitu pretvaraju u koristan signal koji se lagano obrađuje. Prema tipu promjene mogu se podijeliti u četiri glavne vrste: elektrokemijski, optički, piezoelektrični i termički. Prema te četiri vrste pretvornika moguće je podijeliti i senzore [1]. Većina senzora razvijena je oko elektrokemijskih pretvornika prvenstveno zbog njihove jednostavnosti konstrukcije i povoljne cijene.

4. VRSTE SENZORA

Opća podjela senzora je ona na kemijske senzore, biosenzore i fizikalne senzore. Kemijski senzori se koriste pri detekciji i mjerenju specifičnog kemijskog spoja ili skupine spojeva putem kemijskih reakcija. Biosenzori su zapravo podskupina kemijskih senzora. Glavna razlika između te dvije vrste senzora je element za prepoznavanje. Kod biosenzora, element za prepoznavanje je biološke prirode. Fizikalni senzori se koriste prvenstveno pri mjerenju fizikalnih veličina [1].

Senzori se s obzirom na vrstu pretvornika dijele na elektrokemijske, optičke, piezoelektrične i termičke.

- Elektrokemijski senzori su oni koji sadrže elektrokemijske pretvornike. Tu se ubrajaju potenciometrijski, voltametrijski, konduktometrijski i elektrokemijski tranzistori s efektom polja (engl. *field effect transistor,* FET). Razlikuju se po elektrokemijskim svojstvima koja se mjere točno određenim sustavom za detekciju. Potenciometrijski pretvornici uključuju mjerenje potencijala sustava kroz koju ne prolazi električna struja. Elektromagnetna sila proporcionalna je logaritmu koncentracije tvari koja se određuje. Kod voltametrijskih pretvornika u sustav se dovodi rastući ili padajući potencijal sve dok ne dođe do oksidacije ili redukcije analizirane tvari što rezultira naglim rastom ili padom struje koja je linearno ovisna o koncentraciji analita. Kod konduktometrijskih pretvornika uslijed većine reakcija dolazi do promjene sastava otopine što rezultira promjenom električne vodljivosti otopine koju je moguće izmjeriti električnim putem. Vodljivost je proporcionalna koncentraciji iona u otopini. FET senzori sadrže tranzistorsko pojačalo prilagođeno u minijaturni pretvornik za detekciju i mjerenje potenciometrijskog signala. Uglavnom se koriste potenciometrijski pretvornici.
- Optički senzori sadrže optičke pretvornike. Optički pretvornici su temeljeni na spektroskopskim metodama te postaju sve korišteniji daljnjim razvojem optičkih vlakana čime im se omogućuje veća fleksibilnost i minijaturizacija. Bazirani su na reakciji čiji produkti u interakciji sa svjetlošću daju optičku promjenu.
- Piezoelektrični senzori s piezoelektričnim pretvornicima temelje se na promjeni mase anizotropnih kristala, uslijed adsorpcije analita na površinu kristala pri čemu dolazi do promjene rezonantne frekvencije oscilacije kristala.

- Termički senzori s termičkim pretvornicima temelje se na promjeni topline. Svi kemijski i biokemijski procesi uključuju proizvodnju ili apsorpciju topline koja se može mjeriti osjetljivim termistorima te je u ovisnosti s količinom analizirane tvari [1].

5. OPTIČKI SENZORI

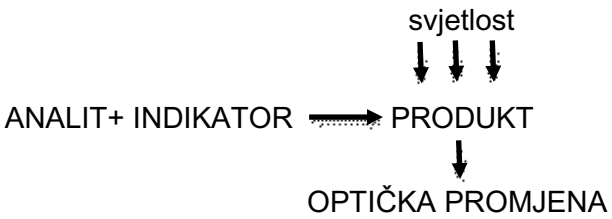
Optički senzori su uređaji zasnovani na promjeni optičkog svojstva nastalog kao rezultat direktne komunikacije receptora i analita. Omogućavaju detekciju vrlo visoke osjetljivosti. Bazirani su na:

- kemiluminiscenciji,
- bioluminiscenciji,
- fluorescenciji,
- UV-Vis apsorpciji,
- Ramanovom raspršenju.

Većina fotometrijskih metoda uključuje usporedbu adsorbirane ili emitirane svjetlosti u prisutnost analita i bez prisutnosti analita. Izuzetak su luminiscencije pri kojima se provode mjerenja uz tamnu pozadinu ili u potpunoj odsutnosti svjetla [1].

Optička vlakna su glavni elementi potrebni za prijelaz iz fotometrijske analize u senzor. Optička vlakna se odnose prema svjetlosti jednako kao i električne žice za struju. Ponašaju se kao voditelji valova svjetla. Prva optička vlakna bila su izgrađena od stakla, a danas se uglavnom koriste polimerni materijali [1].

Pretvornik i element za prepoznavanje pesticida su dva osnovna dijela optičkog senzora za pesticide. Element za prepoznavanje selektivno prepoznaje ciljani pesticid, a pretvornik signalizira njihovo vezanje. Kao element za prepoznavanje koriste se enzimi, molekularno utisnuti polimeri (engl. *molecular imprinted polymers,* MIP), antitijela, aptametri i ostalo [6]. Shema optičkog senzora prikazana je na slici 2. Kod optičkih senzora reagens je potrebno imobilizirati da bi moglo doći do njegove interakcije s analitom. Dolazi do stvaranja kompleksa sa specifičnim optičkim svojstvima koja se mogu detektirati senzorom [1].



Slika 2. Shema optičkog senzora [8].

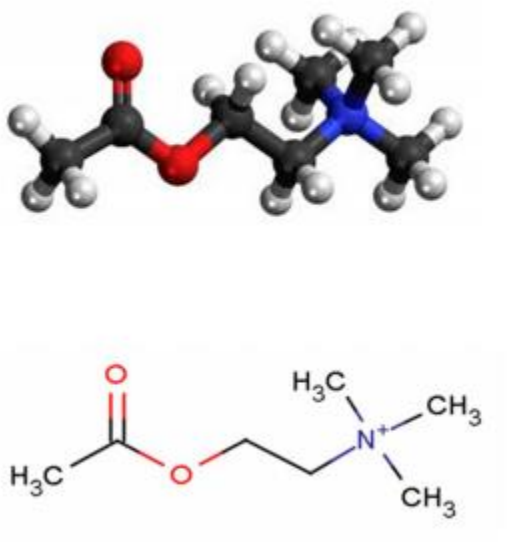
Neke od glavnih mana optičkih senzora su njihova složena izrada, kompliciranа obrada signala te osjetljivost na vibracije mehaničke prirode [2, 9]. Također ih je teško minijaturizirati, a vrijeme odziva može biti sporo.

5.1. FLUORESCENCIJSKI OPTIČKI SENZORI

Jedni od najkorištenijih optičkih senzora su fluorescencijski senzori. Široko se primjenjuju u biomedicinskoj dijagnostici, nadzoru okoliša te kontroli kvalitete i sigurnosti hrane. U izradi fluorescencijskih senzora koriste se razni materijali poput fluorescentnih boja, poluvodičkih nanomaterijala, metalnih nanomaterijala, karbonskih materijala i mnogih drugih. Postoji više vrsta fluorescencijskih optičkih senzora, a najpoznatiji i najkorišteniji su oni posredovani enzimom, bazirani na MIP i oni potpomognuti antitijelom [6].

5.1.1. ENZIMSKI POSREDOVANE METODE

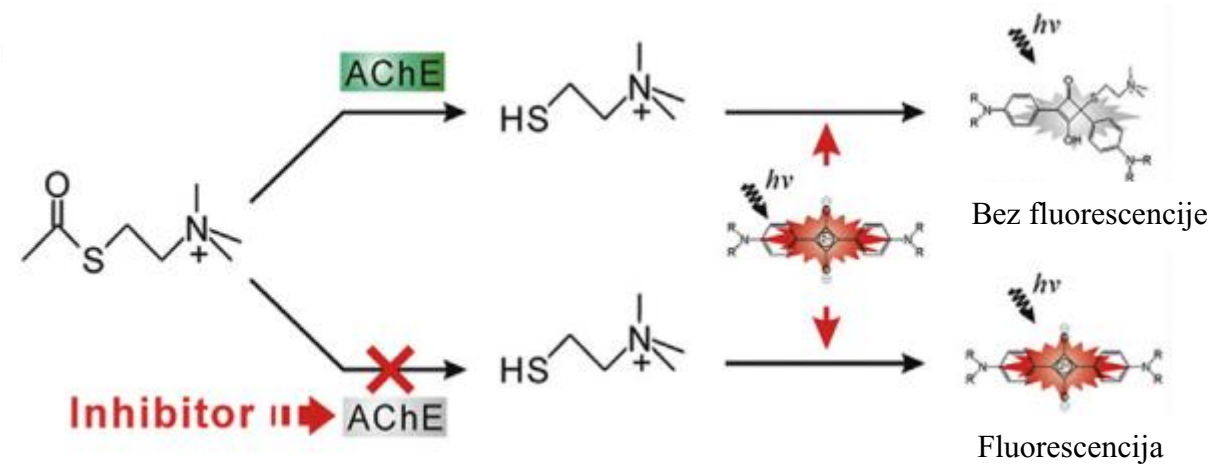
Metode koje su se pokazale selektivnijim i osjetljivijim od ostalih su enzimski posredovane metode analize. Kod enzimski posredovanih senzora pesticid smanjuje enzimsku aktivnost, ponaša se kao inhibitor ili se koristi kao supstrat koji ima važnu ulogu u enzimatskoj reakciji. Posljedica inhibicije enzima je odziv signala. Enzim koji se najčešće koristi kod detekcije pesticida je acetilkolinesteraza (AChE) čija je struktura jasno vidljiva na slici 3. AChE sudjeluje kod prijenosa živčanih impulsa u dijelu koji se nalazi između perifernog i centralnog dijela živčanog sustava (sinapsa) [11, 12].
Hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina je reakcija katalizirana acetilkolinesterazom, a događa se kod već spomenutog prijenosa živčanih impulsa. Enzim se stvara u mišićima, mozgu i koštanoj srži, prisutan je u živčanim i glija stanicama u ljudskom mozgu. Može biti prisutan i u krvi gdje se veže za eritrocite [12, 13].



Slika 3. Struktura acetilkolinesteraze [13].

Tijekom reakcije hidrolize acetilkolina gdje AChE djeluje kao katalizator, kao produkt nastaje tiokolin, spoj koji sadrži kemijski reaktivnu tio skupinu koja reagira s nanomaterijalima, fluoroforima i metalnim kationima. Organofosfati djeluju kao inhibitori AChE čime direktno sprečavaju nastanak tiokolina te je upravo zbog tog načina djelovanja moguće provesti osjetljivu i detaljnu analizu organofosfata. Primjer ovakvog senzorskog sustava je određivanje organofosfata s granicom detekcije 5.0 pg/mL korištenjem fluorescentne boje skvarena. Tiokolin uzrokuje gašenje fluorescencije (eng. *quenching*) skvarena. S obzirom na inhibitorsko djelovanje organofosfata, enzimska aktivnost AChE je blokirana, što rezultira izraženom fluorescencijom uslijed nedostatka tiokolina [14]. Osim skvarena, kod određivanja organofosfata mogu se koristiti i druge fluorescentne boje [6].

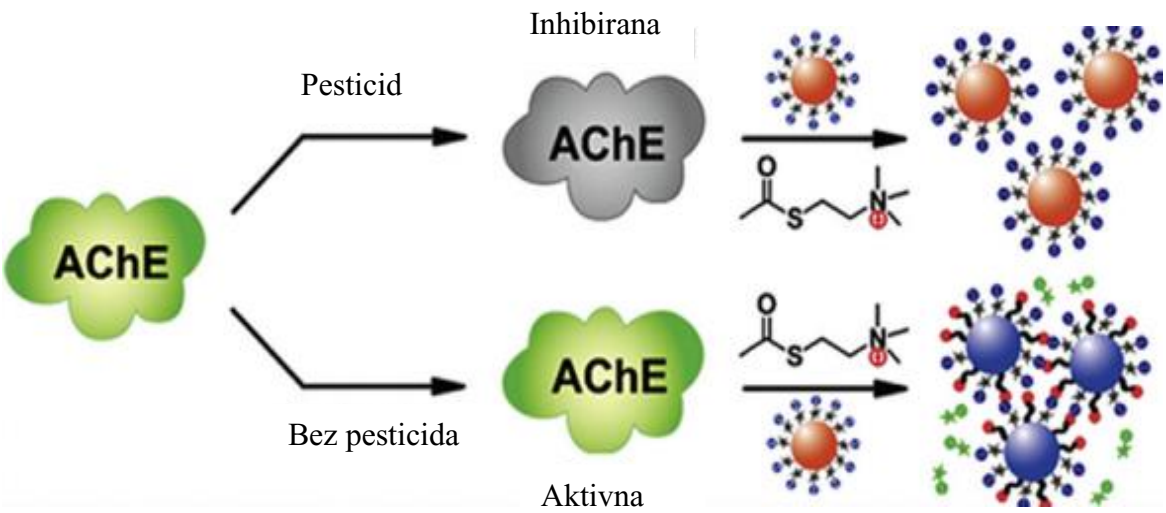
Na slici 4 vizualno je predočen mehanizam inhibicije enzima.



Slika 4. Shema mehanizma za inhibitore AChE [14].

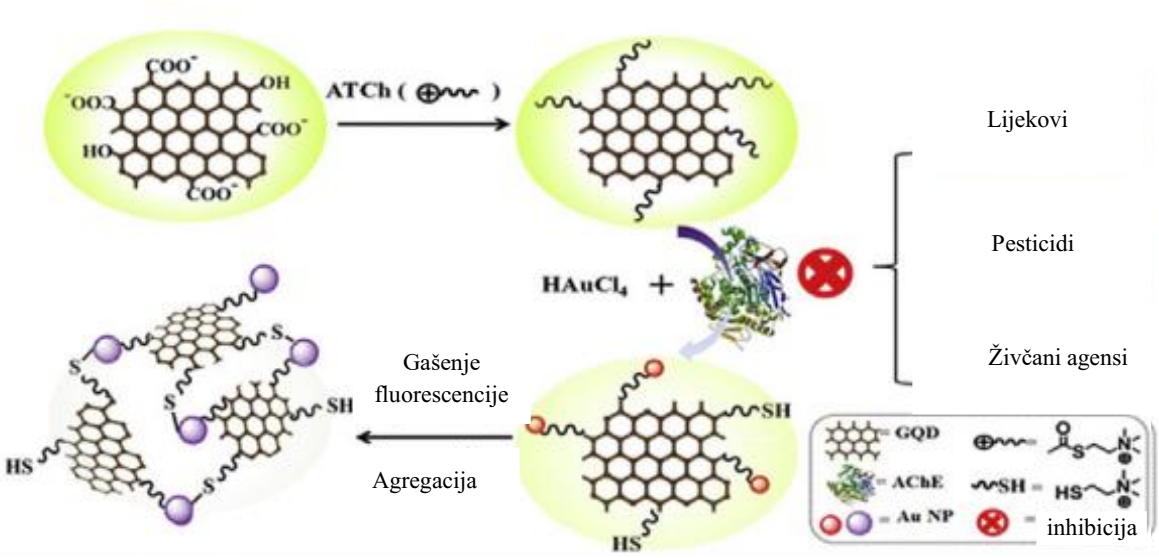
Još jedan od načina određivanja organofosfornih pesticida je kombiniranje fluorofora i nanomaterijala uz korištenje procesa fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). U FRET procesu djeluju dva kromofora, donorska i akceptorska boja. Donorska boja u procesu prebacuje energiju na akceptorsku koja se nalazi u pobuđenom stanju [14]. Primjer toga je FRET proces koji se događa između ugljikovih točaka (eng. *carbon dots*) i nanolistića manganova(IV) oksida. Oporavak fluorescencije ugljikovih točaka u ovom slučaju izaziva razlaganje nanolistića manganova(IV) oksida koje je uzrokovano nastankom tiokolina. Zbog inhibiranja nastanka tiokolina organofosfatima, obustavlja se razgradnja nanolistića manganova(IV) oksida i dolazi do prestanka fluorescencije [15].

Pri razvoju biosenzora za pesticide se osim nanolistića manganova(IV) oksida mogu koristiti i nanočestice zlata. Primjer ovakvog senzora je sustav u kojem do smanjenja fluorescencije fluorescentne boje rodamina B dolazi zbog njegove adsorpcije na površinu zlatnih nanočestica preko elektrostatskih interakcija. Produkt hidrolize acetilkolina, tiokolin, se preko tiolne skupine jače veže za nanočestice zlata, pri čemu se rodamin B otpušta s nanočestica i opet dolazi do fluorescencije. Karbamati, kao i organofosfati, djeluju kao inhibitori enzima AChE. Prisustvom tih čestica smanjuje se količina nastalog tiokolina što dovodi do smanjena intenziteta fluorescencije. Niska granica detekcije (0.1 mg/L za karbaril i 0.3 mg/L za malation) je pokazatelj velike osjetljivosti ovih biosenzora [16]. Djelovanje ovakvog biosenzora prikazano je na slici 5.



Slika 5. Mehanizam djelovanja biosenzora sa zlatnim nanočesticama [16].

Sljedeći primjer je fluorimetrijski senzor temeljen na principu „pomiješaj i detektiraj“ (eng. *mix-and-detect fluorometric sensor*) gdje se zlatne nanočestice formiraju *in situ*. Ovaj senzor koristi grafenske kvantne točke modificirane acetiltiokolinom jednostavnim elektrostatskim interakcijama. Naknadno dodana AChE hidrolizira acetiltiokolin u tiokolin čije tiolne skupine kataliziraju rast zlatnih nanočestica na grafenskim kvantnim točkama snažnim reduciranjem Au^{3+} iona. Zlatne nanočestice gase fluorescenciju grafenskih kvantnih točaka s obzirom na FRET mehanizam. Kovalentno vezanje Au-S između neizreagiranih tiolnih skupina i formiranih zlatnih nanočestica na susjednim grafenskim kvantnim točkama uzrokuje agregaciju grafenskih kvantnih točaka i vodi ka daljnjem gašenju fluorescencije. Fluorescencija se ponovno pojavljuje u prisustvu organofosfornih pesticida koji inhibiraju aktivnost AChE [17]. Mehanizam djelovanja senzora prikazan je na slici 6.



Slika 6. Mehanizam djelovanja senzora temeljenog na grafenskim kvantnim točkama modificiranim acetiltiokolinom i zlatnim nanočesticama [17].

5.1.2. METODE TEMELJENE NA MOLEKULARNO UTISNUTIM POLIMERIMA

Popularno nazvani plastična antitijela, MIP se lako pripravljaju *in-situ* kopolimerizacijom funkcionalnih momomera oko molekule predloška. To su vrlo stabilni polimeri gotovo savršenih mehaničkih svojstava koji se mogu višekratno koristiti. Imaju značajnu ulogu pri razvoju biosenzora, pogotovo kada odgovarajući biološki elementi za prepoznavanje (enzimi i antitijela) nisu dostupni. Koriste se i u pametnim sustavima za dostavu lijekova te pri uklanjanju onečišćenja iz okoliša [11].

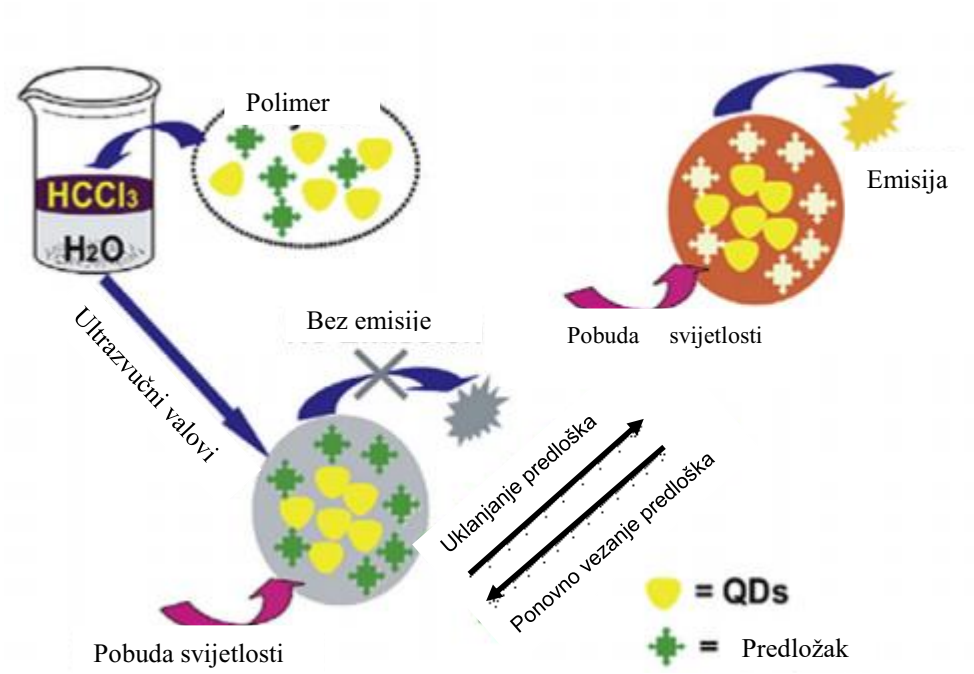
MIP je moguće prirediti i kovalentnim i nekovalentnim interakcijama. Kod postupka molekularnog utiskivanja dolazi do vezanja molekule analita (predložak) s funkcionalnim monomerom nakon čega slijedi dodavanje umrežavala. Analit, koji za sobom ostavlja prostor specifičnih dimenzija koje služe za prepoznavanje srodnih analita, se zatim uklanja iz mreže [10].

Primjer korištenja MIP je razvoj imunoenzimske ELISA metode (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) za detekciju insekticida cipermetrina. Nanočestice MIP korištene su kao jednostavna i stabilna zamjena za antitijela. Na površinu ugljikovih kvantnih točaka dodani su slojevi molekularno utisnutog silicijevog dioksida te je dobiven fluorescentni kompozit s

umjetnim mjestima za prepoznavanje analita. Uslijed izloženosti sustava cipermetrinu dolazi do njegove snažne interakcije s formiranim kompozitom te do selektivnog gašenja fluorescencije koje je u linearnom odnosu s koncentracijom cipermetrina [18].

U sljedećem primjeru razvijen je fluorescentni nanosenzor za određivanje pesticida λ-cihalotrina. Sloj MIP nanesen je na površinu CdSe kvantnih točaka sa slojem nanosfera silicijeva dioksida. Intenzitet fluorescencije razvijenog kompozita linearno se smanjivao s povećanjem koncentracije pesticida. Razvijeni nanosenzor bio je vrlo selektivan i imao je granicu detekcije 3.6 μg/L [19].

Inkapsulacija potpomognuta ultrazvukom je pogodna metoda sinteze fluorescentnih kompozita kvantnih točaka i MIP (slika 7). Metoda je vrlo brza te je potreban manji broj reagensa kako bi se sintetizirao kompozit. U navedenom primjeru fluorescentne nanosfere kompozita formirane su unutar šest minuta. Kao polimer korištena je polistiren-*co*-metakrilna kiselina. Nanosfere su imale veliku sposobnost adsorpcije i desorpcije analita (pesticida diazinona) s mjesta za prepoznavanje. Na temelju prijenosa energije s kvantnih točaka (donor) na diazinon (akceptor), fluorescentni kompozit je uspješno primijenjen za direktno fluorimetrijsko određivanje diazinona s granicom detekcije 38.6 ng/mL [20].



Slika 7. Prikaz priprave nanosfera kvantnih točaka i MIP te gašenja fluorescencije uslijed specifičnog prepoznavanja analita [3].

Osim već spomenutog pesticida, sustav ovakvog tipa pogodan je i za detekcije pesticida cifenotrina, parakvata, λ-cihalotrina i drugih [5].

5.1.3. ANTITIJELOM POSREDOVANE METODE

Antitijela, korištena kao vrlo selektivni i osjetljivi elementi za prepoznavanje, predstavljaju temelj razvoja imunosenzora. Danas se antitijela široko koriste u imunometodama koje su postale alternativa rutinskim analizama pesticida. Razvoj nanomaterijala i nanotehnologija su u konstantnom rastu, čime se omogućuje usavršavanje fluorescencijskih imunosenzora.

Primjer korištenja antitijela je kompetitivni fluoroimunoesej (eng. *competitive fluoroimmunoassay*) za detekciju herbicida 2,4-diklorofenoksioctene kiseline. Kompetitivne metode se baziraju na korištenju jednog antitijela uz višak antigena (ispitivana tvar) pri čemu se obilježeni antigen i antigen iz uzorka natječu za vezna mjesta na poznatoj količini antitijela. U ovom primjeru CdTe kvantne točke sa slojem merkaptopropionske kiseline i 2,4-diklorofenoksioctena kiselina konjugirani su alkalnom fosfatazom te je formiran kompozit kao konkurencija analitu. Analiza 2,4-diklorofenoksioctene kiseline provedena je na temelju kompetitivnog vezanja kompozita i slobodne 2,4-diklorofenoksioctene kiseline na antitijela imobilizirana u imunoreaktorskoj koloni. Količina nevezanog kompozita, a time i intenzitet fluorescencije proporcionalni su koncentraciji 2,4-diklorofenoksioctene kiseline [21].

Kombiniranjem antitijela i nanomaterijala kao fluorescencijske oznake omogućena je kvantitativna analiza i drugih pesticida kao što su klorpirifos, paration i glifosat [6].

Trend pri razvoju svih analitičkih metoda, pa tako i imunosenzora, je minijaturizacija koja omogućuje manju potrošnju reagensa i kraće vrijeme analize. Primjer imunosenzora koji slijedi ovaj princip je prijenosna kompetitivna imunokromatografska test traka za brzo određivanje organofosfata, točnije 3,5,6-trikloropiridinola koji im je zajednički metabolit. Temelji se na kompeticiji između analita i analoga konjugiranih kvantnim točkama za imunoreakciju s antitijelima. Povećanjem koncentracije analita u uzorku, manje se analoga veže za antitijela u testnoj zoni trake, što uzrokuje smanjenje intenziteta fluorescencije. Test karakteriziraju relativno niska granica detekcije (1.0 ng/mL), dobra osjetljivost i točnost analize u trajanju od petnaest minuta [21].

Skupina znanstvenika sintetizirala je fluorescentni imunoesej kojim je omogućena vizualna i semikvantitativna *in situ* analiza pesticida fosmeta na polidimetilsiloksanu korištenjem polimernih točaka povezanih s antitijelima za fosmet. Porastom koncentracije fosmeta pojačava se fluorescentni signal. Imunoesej je uspješno primijenjen za detekciju tog pesticida na površini jabuke [23].

5.1.4. SENZORI TEMELJENI NA DOMAĆIN-GOST INTERAKCIJI

Interakcija domaćin-gost, kao dio supramolekulske kemije, odnosi se na formiranje inkluzijskih kompleksa između makrocikličnog domaćina i odgovarajućeg gosta. U šupljinu makrociklične molekule domaćina (npr. ciklodekstrin, kaliksaren) inkludiran je gost zahvaljujući svojem obliku komplementarnom šupljini domaćina. Domaćin i gost se selektivno povezuju različitim nekovalentim interakcijama pri čemu u kombinaciji sa fluorescentnim označavanjem čine element za prepoznavanje koji može biti pogodan pri razvoju senzora za detekciju pesticida. U jednom od istraživanja [24], korištena je sol-gel tehnika da bi se sintetizirale specifične nanočestice. Te nanočestice dobivene su iz CdTe kvantnih točaka, sa slojem nanosfera silicijeva dioksida, prevučenih kaliksarenom. Odlikuju se visokom stabilnošću i fluorescencijom te su pogodne za vrlo osjetljivu detekciju pesticida metomila. Interkalacija pesticida potiskuje deformaciju šupljine kaliksarena. Promjenom strukture dolazi do jačanja fluorescencije. Granica detekcije metomila pri izvođenju ovog postupka je 0.08 μmol/L, što potvrđuje njegovu osjetljivost. Moguće su razne izmjene postupka da bi se omogućila detekcija što većeg broja pesticida. Ako se spomenuti postupak modificira na način da se koriste kvantne točke dopirane *p*-sulfonatokaliksarenom, moguće je detektirati acetamiprid [25]. Jednom od najnovijih modifikacija postupka moguće je detektirati metolkarb dodavanjem naftola na kaliksaren [26].

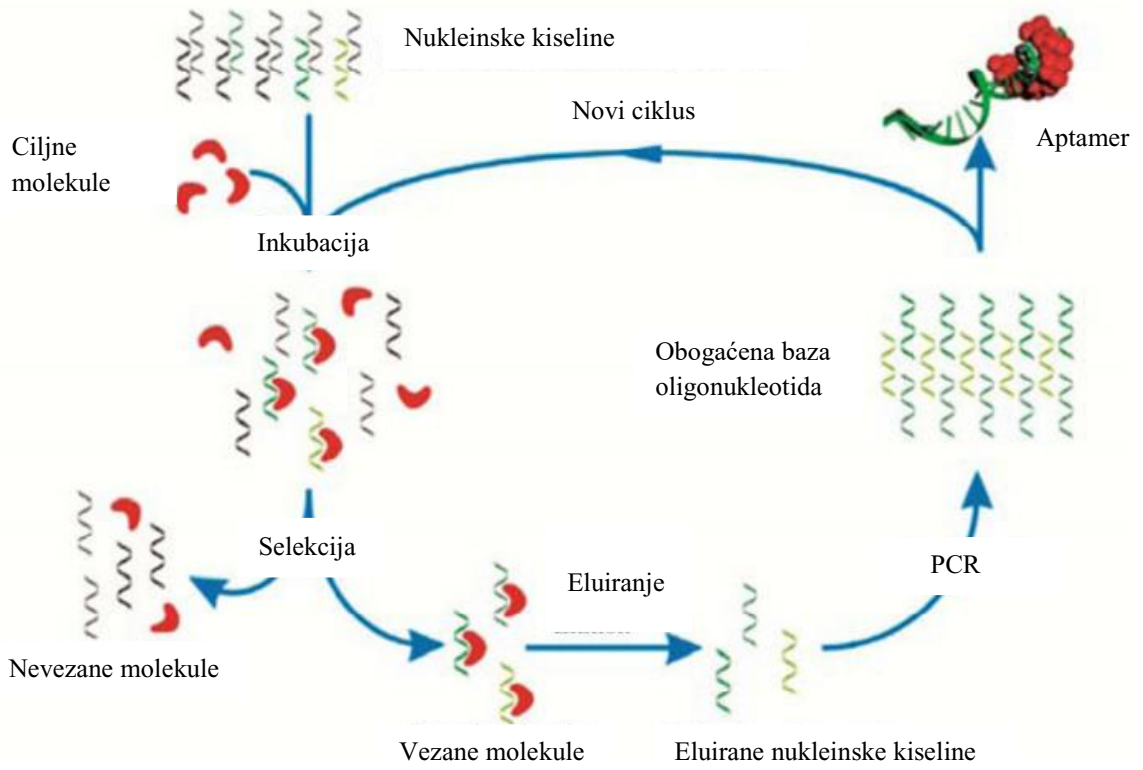
Kombinacijom metilenskog modrila i kukurbiturila, kao domaćina i gosta, razvijen je senzor za određivanje parakvata. Nakon ulaska metilenskog modrila unutar šupljine kukurbiturila, dolazi do gašenja njegove fluorescencije. U prisutnosti pesticida parakvata, metilensko modrilo se zamjenjuje s pesticidom i dolazi do fluorescencije [27].

5.1.5. SENZORI TEMELJENI NA APTAMERU

Jednostruki DNA ili RNA oligonukleotidi koji vezanjem s malim molekulama, virusima i proteinima tvore tercijarnu strukturu nazivaju se aptamerima. Aptameri se odlikuju brojnim svojstvima od kojih su najznačajnija osjetljivost, stabilnost i visoka selektivnost. Često se koriste kao alternativa za antitijela zbog njihove jednostavnije i jeftinije proizvodnje [12]. Veća stabilnost, mogućnost regeneracije i općenito viši afinitet u usporedbi sa antitijelima dodatne su prednosti njihova korištenja. Također, mogu se vezati s različitim fluoroforima, što ne smanjuje njihov afinitet. Aptameri vežu ciljane molekule prema komplementarnosti, odnosno

prema principu ključ-brava [6]. S obzirom na navedena svojstva, aptameri se mogu koristiti kao elementi za prepoznavanje pri razvoju senzora primjenjivih u biomedicini, praćenju stanja okoliša itd.

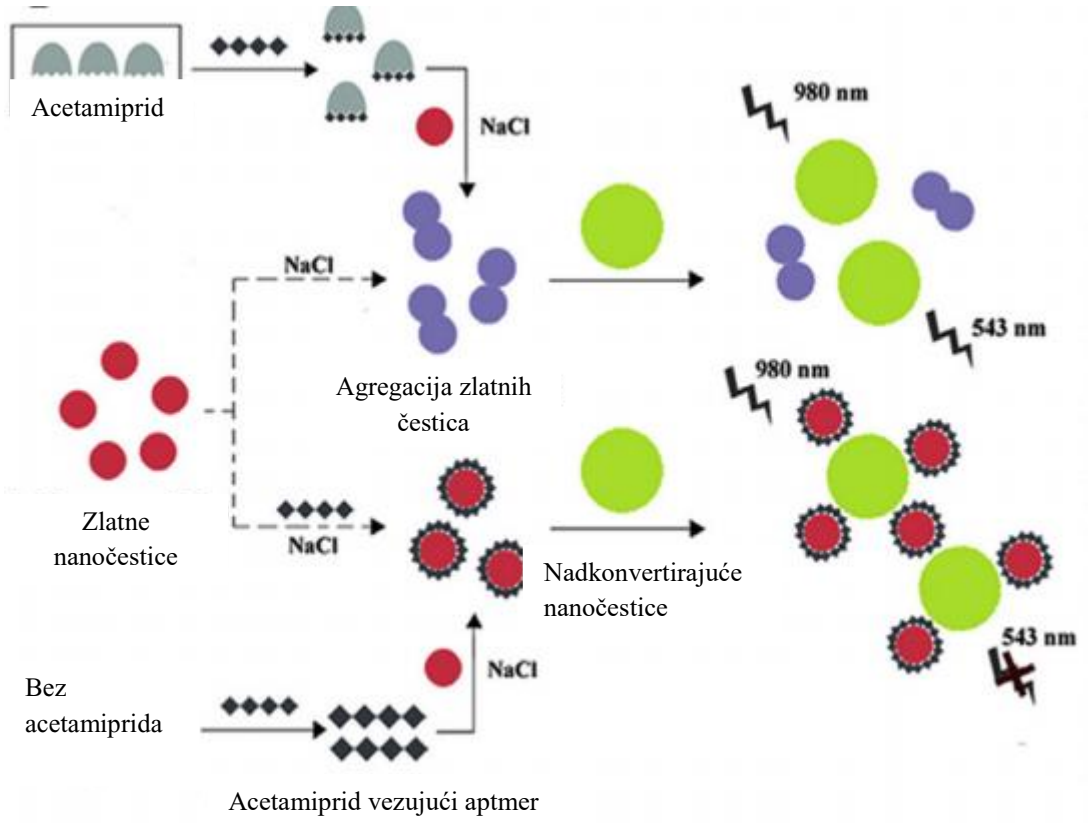
Sustavna evolucija liganda eksponencijalnim obogaćivanjem (eng. *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX) je metoda koja služi za odabir aptamera željenih svojstava. Prije samog početka odabira, na svaku sekvencu nukleotida dodaje se početnica za reakciju lanca polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR). Proces započinje dodatkom ciljnih molekula skupini oligonukleotida nakon čega slijedi inkubacija u veznom puferu. Nakon potpunog vezanja s ciljnim molekulama, nevezani oligonukleotidi se eluiraju kako bi se dobili kompleksi ciljne molekule i oligonukleotida. Oni se tada izoliraju, eluiraju i prikupljaju. Zatim se provodi PCR koristeći eluirane oligonukleotidne sekvence kao predloške kako bi nastala obogaćena baza za sljedeći ciklus. Visokospecifični i visokoafinitetni oligonukleotidi se obično dobiju nakon 6-20 ciklusa. Dobivenu obogaćenu bazu oligonukleotida treba klonirati i sekvencionirati kako bi se dobili aptameri koji specifično prepoznaju ciljnu molekulu [28]. Shematski prikaz SELEX procesa prikazan je na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz SELEX procesa [5].

Upravo koristeći se SELEX procesom, 2011. su odabrani aptameri pogodni za detekciju organofosfata acetamiprida [29]. Nakon toga je uporaba aptamera pri razvoju senzora za određivanje pesticida sve više privlačila pozornost znanstvenika. Mehanizam takvih senzora uglavnom se temeljio na adsorpciji aptamera na nanomaterijalima i učinkovitosti nanomaterijala pri gašenju fluorescencije.

Skupina znanstvenika je razvila nanosenzor koji koristi aptamere kao element za prepoznavanje, za određivanje acetamiprida. Senzor se temelji na FRET procesu između NH_2-$NaYF_4$:Yb, Ho@SiO_2 nadkonvertirajućih nanočestica (eng. *upconversion nanoparticles*) i zlatnih nanočestica. Zlatne nanočestice kao akceptori učinkovito gase fluorescenciju NH_2-$NaYF_4$:Yb, Ho@SiO_2 čestica. Aptamer se adsorbira na zlatnim nanočesticama i sprječava njihovu agregaciju posredstvom soli, pojačavajući učinkoviti FRET proces. Aptamer ima jak afinitet za vezanje acetamiprida, pri čemu nastaju konformacijske promjene aptamera. Nakon toga aptamer više ne može stabilizirati zlatne nanočestice u slanoj otopini, što uzrokuje njihovu agregaciju, a time i oporavak fluorescencije [30]. Shematski prikaz procesa predočen je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz rada senzora na bazi aptamera [30].

Umjesto korištenja zlatnih nanočestica, kao akceptor za FRET proces mogu se upotrijebiti i ugljikove nanocjevčice. Primjer toga je senzor za određivanje acetamiprida na bazi kvantnih točaka modificiranih aptamerom u kombinaciji s višestjenčanim ugljikovim nanocjevčicama (eng. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT). MWCNT i modificirane kvantne točke nalaze se vrlo blizu zbog jakih interakcija te dolazi do FRET procesa i smanjenja fluorescencije. Kada se međusobno udalje uslijed vezanja aptamera i acetamiprida, nakon što je pesticid uveden u sustav, dolazi do blokiranja FRET fenomena i pojačavanja fluorescencije. Granica detekcije acetamiprida postignuta ovom metodom je niska, iznosi 0.7 nmol/L.

U svim navedenim istraživanjima aptamer određuje selektivnost i osjetljivost senzora. Međutim, upotreba senzora ovog tipa je ograničena primarno zbog toga što mogu prepoznati samo nekoliko vrsta pesticida te zbog obaveznog dodatnog SELEX procesa [6].

6. SENZORI TEMELJENI NA KOLORIMETRIJI

Kolorimetrijski senzori su jedni od najjednostavnijih i upravo zbog toga i najkorištenijih senzora. Zlatne nanočestice, korištene kao izvrsni pretvornici signala, široko se koriste pri razvoju kolorimetrijskih senzora za detekciju pesticida. Kolorimetrijski senzori se, s obzirom na element za prepoznavanje, mogu podijeliti na enzimske, bazirane na aptameru i bazirane na antitijelu. Jedan od primjera ovakvih senzorskih sustava je direktno praćenje acetamiprida temeljeno na jakom afinitetu između cijano grupe acetamiprida i zlata. Vezanjem acetamiprida i zlata dolazi do promjene boje iz crvene u plavu, uslijed promjene stanja nanočestica zlata iz disperzije u agregaciju [31].

U sljedećem primjeru razvijen je kolorimetrijski senzor za detekciju pet različitih organofosfata. Senzor se također temeljio na agregaciji i disperziji zlatnih nanočestica.

Da bi se poboljšala selektivnost kolorimetrijskih senzora za određivanje pesticida, korištene su i funkcionalizirane nanočestice zlata. Primjer ovakvog senzora je senzor za određivanje pesticida diazinona gdje je nanočesticama zlata dodan imidazol da bi se povećala osjetljivost i skratilo vrijeme detekcije diazinona [32].

Unatoč mnogim prednostima ovakvih senzora kao što su jednostavnost i niska cijena, u narednim godinama očekuje se dodatno poboljšanje selektivnosti i osjetljivosti ove metode [6].

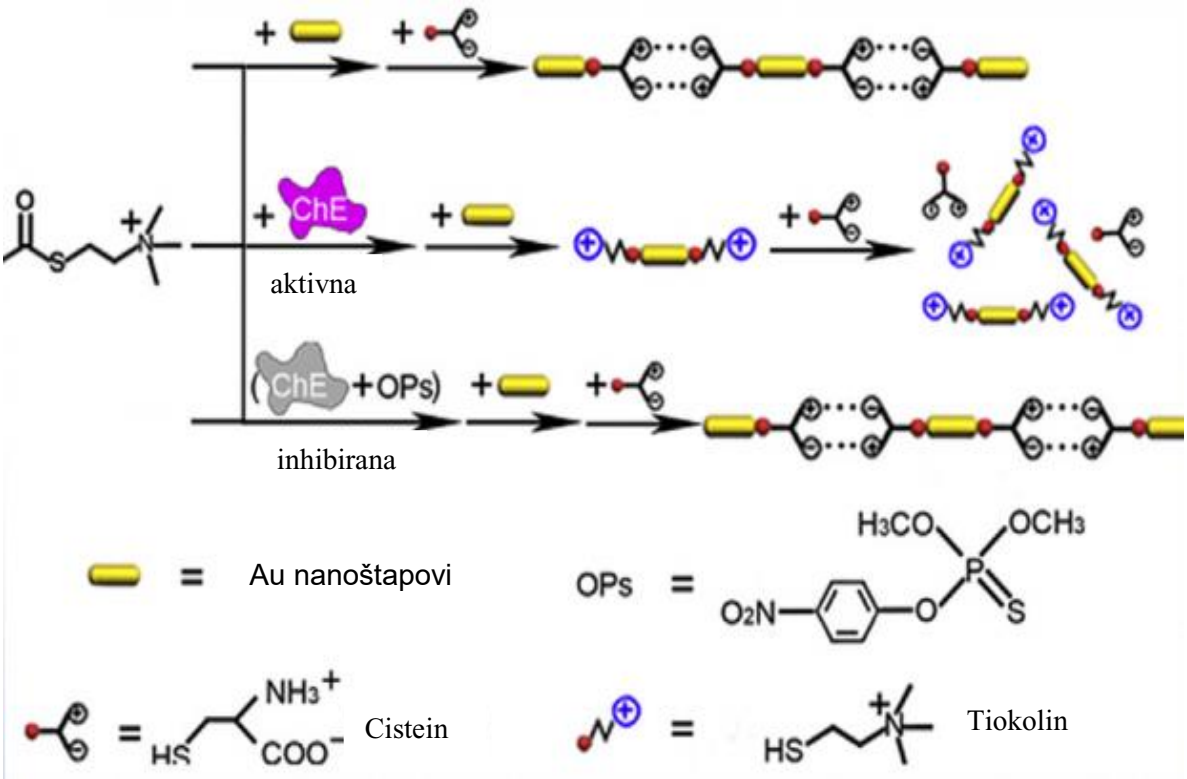
6.1. ENZIMSKI KOLORIMETRIJSKI SENZORI

Enzimski kolorimetrijski senzori imaju prednosti selektivnog katalitičkog djelovanja enzima i izvanrednih optičkih svojstava nanomaterijala. Enzimski hidrolizat koristi se kao inicijator za pokretanje agregacije ili samoudruživanja (eng. *self-assembly*) metalnih nanočestica koje se mogu koristiti za promjenu ili pojačavanje signala. Najčešći enzim za kolorimetrijsko detektiranje pesticida je AChE, zbog toga što se vrlo lako veže na pesticide.

Primjer enzimskog kolorimetrijskog senzora je kombinacija nanočestica zlata i lipoične kiseline za određivanje organofosfata. Senzorski sustav potpomognut je katalitičkom reakcijom AChE. Produkt reakcije AChE, tiokolin, potiče agregaciju zlatnih nanočestica funkcionaliziranih lipoičnom kiselinom, što je moguće vidjeti kroz promjenu boje sustava iz crvene u čelično plavu. Već prije je navedeno da su pesticidi inhibitori AChE te stoga u

prisustvu organofosfata ne nastaje tiokolin, a promjena boje postupno se smanjuje sukladno koncentraciji organofosfata [33].

Da bi poboljšali svojstva senzora, skupina znanstvenika razvila je kolorimetrijski senzor za određivanje organofosfata na principu modulacije sastavljanja nanoštapova, na način da se kraj jednog poveže s krajem drugog (eng. *end-to-end assemmbly, EE*), enzimskom reakcijom. Aminokiselina cistein sudjeluje u EE udruživanju nanoštapova zlata pri čemu nastaje jednodimenzionalna suprastruktura. Tiokolin zauzima vezna mjesta na nanoštapovima zlata čime se sprječava EE samoudruživanje nanoštapova. U prisutnosti organofosfata, enzimska reakcija AChE je inhibirana što za posljedicu ima ponovno samoudruživanje nanoštapova zlata inducirano cisteinom. Shema rada senzora vidljiva je na slici 10 [34].



Slika 10. Shema kolorimetrijskog senzora za određivanje organofosfata, temeljenog na modulaciji EE samoudruživanja nanoštapova zlata [6].

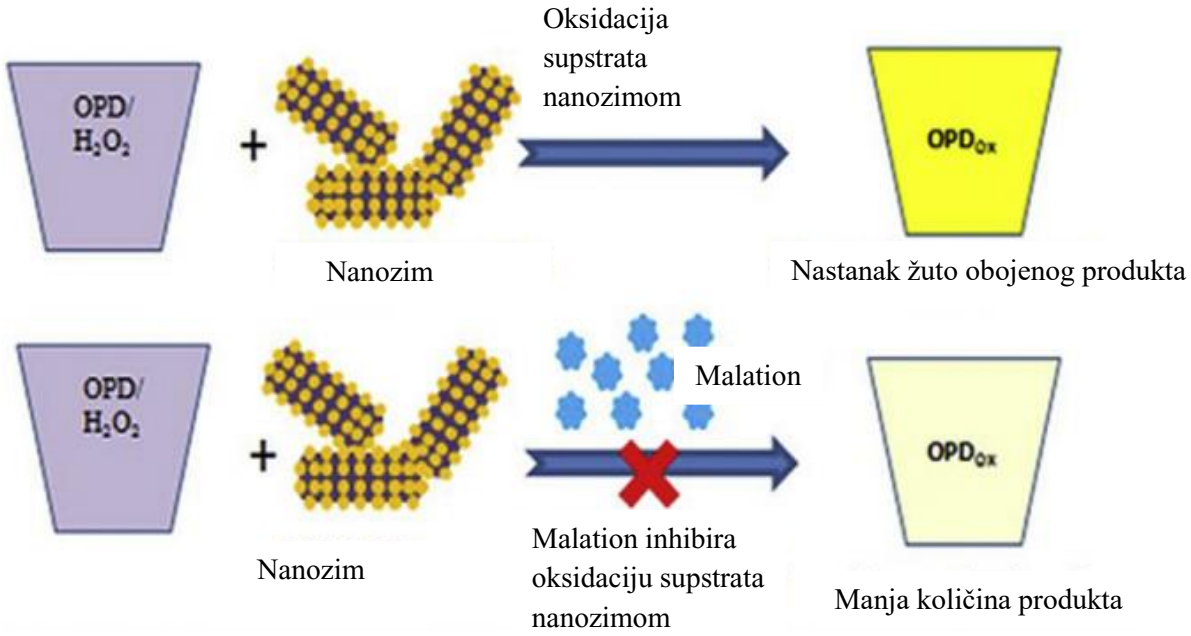
U novije vrijeme razvijanjem sintetičkih enzima, drugog imena nanozimi, moguće je zamijeniti prirodne.

Skupina znanstvenika otkrila je 2007. da magnetske nanočestice željezova oksida, Fe_3O_4, imaju svojstva slična onima peroksidaze hrena (eng. *horseradish peroxydase,* HRP), tj. da mogu

katalizirati različite enzimske supstrate [35]. Nakon ovog pionirskog otkrića, otkriveno je da postoji još spojeva koji pokazuju svojstva enzima, kao što su:

- zlatni nanoklasteri,
- zlatne nanočestice,
- nanočestice cerijeva oksida,
- nanočestice grafenova oksida.

Primjer uporabe nanozima je senzor za detekciju malationa, temeljen na bimetalnom nanozimu zlata i paladija, koji pokazuje svojstva peroksidaze. Uvjet za reakciju je prisutnost *o*-fenilendiamina i vodikova peroksida. Čestice nanozima katalitički reagiraju s *o*-fenilendiaminom čime stvaraju oksidacijski produkt žute boje, u prisutnosti vodikova peroksida. Dodatkom malationa dolazi do selektivne inhibicije enzimske reakcije nanozima te ne nastaje obojeni oksidacijski produkt. Shema reakcije senzora s nanozimom vidljiva je na slici 11. Osim navedenog nanozima zlata i paladija, za detekciju malationa mogu se koristiti i zlatni nanoštapovi [36].



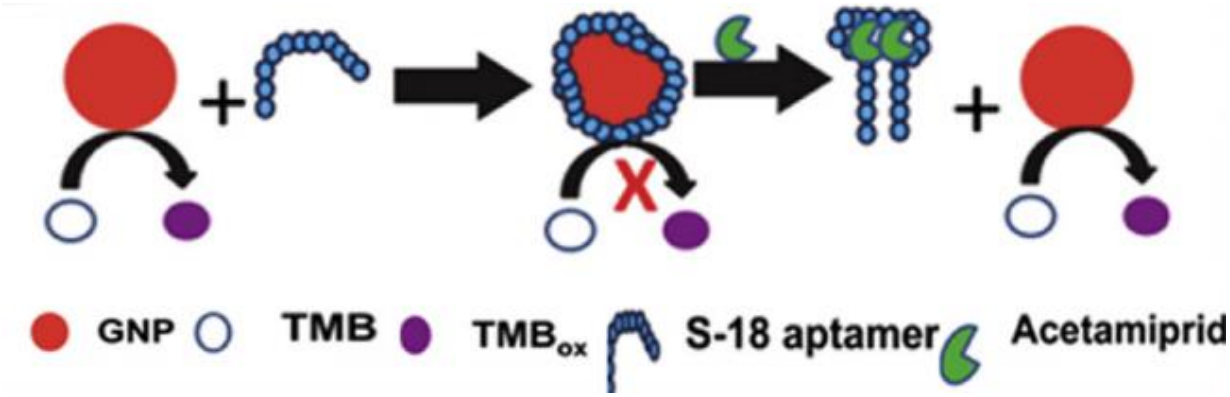
Slika 11. Shema reakcije senzora za određivanje malationa s nanozimom [37].

6.2. KOLORIMETRIJSKI SENZORI TEMELJENI NA APTAMERU

Aptameri nukleinskih kiselina imaju široku primjenu u bioanalici i općenito biomedicini s obzirom na fleksibilnost pri dizajnu, manju cijenu i bolju stabilnost. Pri analizi pesticida koriste se aptameri kombinirani s nanočesticama u svrhu dobivanja signala i selektivnog prepoznavanja analita.

Skupina znanstvenika razvila je senzor temeljen na aptameru i agregaciji zlatnih nanočestica za detekciju acetamiprida. Aptamer se apsorbira na površinu zlatnih nanočestica koordinacijskim vezama čineći ih stabilnijima u slanom mediju. Specifičnim vezanjem aptamera za acetamiprid nastaje kompleks što uzrokuje konformacijske promjene aptamera, nakon čega se slobodne zlatne nanočestice u slanom mediju agregiraju. Agregaciju zlatnih nanočestica moguće je vizualno pratiti na temelju promjene boje u ljubičasto-plavu iz crvene. Ovaj senzor korišten je za praćenje prirodnog procesa razgradnje acetamiprida u tlu [38].

Kako bi se senzor temeljen na aptameru dodatno unaprijedio, modificiran je nanozimima. Korištene su zlatne nanočestice kao katalizatori koji oponašaju peroksidazu. Nanozimska aktivnost zlatnih nanočestica smanjuje se uslijed djelovanja aptamera na njihovu površinu. U prisutnosti ciljanog pesticida dolazi do strukturnih promjena aptamera i njegove desorpcije s površine nanočestica pri čemu se aptamer veže s ciljnom molekulom. Pri tome se nanozimska aktivnost zlatnih naočestica ponovno uspostavlja što je temelj specifične i osjetljive detekcije acetamiprida ovim kolorimetrijskim senzorom. Acetamiprid se, koristeći ovaj princip, može izravno vizualizirati na temelju promjene boje ili kvantificirati koristeći UV-Vis spektroskopiju. Princip djelovanja ovog senzora prikazan je na slici 12 [39].



Slika 12. Shema djelovanja senzora za određivanje acetamiprida na bazi aptamera i nanozima (GNP = zlatne nanočestice; TMB = tetrametilbenzidin) [28].

Acetamiprid se može detektirati i aptasenzorima s kompozitima od reduciranog grafenovog oksida funkcionaliziranog heminom. Takvi kompoziti imaju i katalitičku aktivnost sličnu peroksidazi i svojstvo adsorpcije za „hvatanje“ aptamera. Specifičnim vezanjem aptamera s acetamipridom dolazi do konformacijske promjene aptamera i njegove desorpcije s površine grafenovog oksida reduciranog heminom. Uslijed toga dolazi do izloženosti kompozita slanom mediju i blokiranja njegove nanozimske aktivnosti te nastanka slabe apsorbancije u prisutnosti tetrametilbenzidina i vodikovog peroksida [40].

6.3. KOLORIMETRIJSKI SENZORI TEMELJENI NA ANTITIJELU

Za rutinsko određivanje pesticida djelotvornom metodom se pokazao enzimski imunoesej (eng. *enzyme-linked immunoassay*, EIA) koji kombinira korištenje antitijela i kolorimetriju. Skupina znanstvenika je razvila dvoenzimski EIA uz korištenje antitijela za detekciju imidaklotiza i tiakloprida [41].

U svrhu poboljšanja ovakvih senzora, u njihov sustav moguće je uvesti nanočestice. Vođena tom idejom, skupina znanstvenika razvila je imunoesej s lateralnim protokom (eng. *lateral flow immunoassay*, LFI) za određivanje tri vrste pesticida koristeći monoklonska antitijela označena zlatnim nanočesticama. Određivanje pesticida je provedeno u uzorcima tla i kupusa unutar sedam minuta [42].

Nadalje, razvijen je imunokromatografski test s lateralnim protokom (eng. *lateral flow immunochromatographic assay*, LFIA) s nanočesticama Fe_3O_4 korištenim kao kolorimetrijski reagens. Nanočestice obložene polietilenglikolom prvo su modificirane s poli-L-lizinom a zatim združene s odgovarajućim poliklonalnim antitijelima. Strategija pojačanja signala omogućenog kontroliranom agregacijom nanočestica Fe_3O_4 prati se analizom intenzitata apsorpcije [43].

Nanomaterijali se mogu koristiti i kao nanonosači za enzime i antitijela. Skupina znanstvenika razvila je kompetitivni kolorimetrijski imunoesej za određivanje triazofosa koristeći nanočestice Fe_3O_4 i višestruko označene zlatne nanočestice. Zlatne nanočestice su korištene za konjugiranje anti-triazofos antitijela i enzima, za pojačavanje signala kada je došlo do imunološke reakcije. Nanočestice Fe_3O_4 modificirane su s ovalbumin-hapten kompleksom za kompetitivno vezanje antitijela na površini zlatnih nanočestica. Kvantifikacija pesticida ovisila je o enzimski kataliziranoj reakciji u kojoj je dolazilo do promjene boje [44].

7. SENZORI TEMELJENI NA RAMANOVU RASPRŠENJU

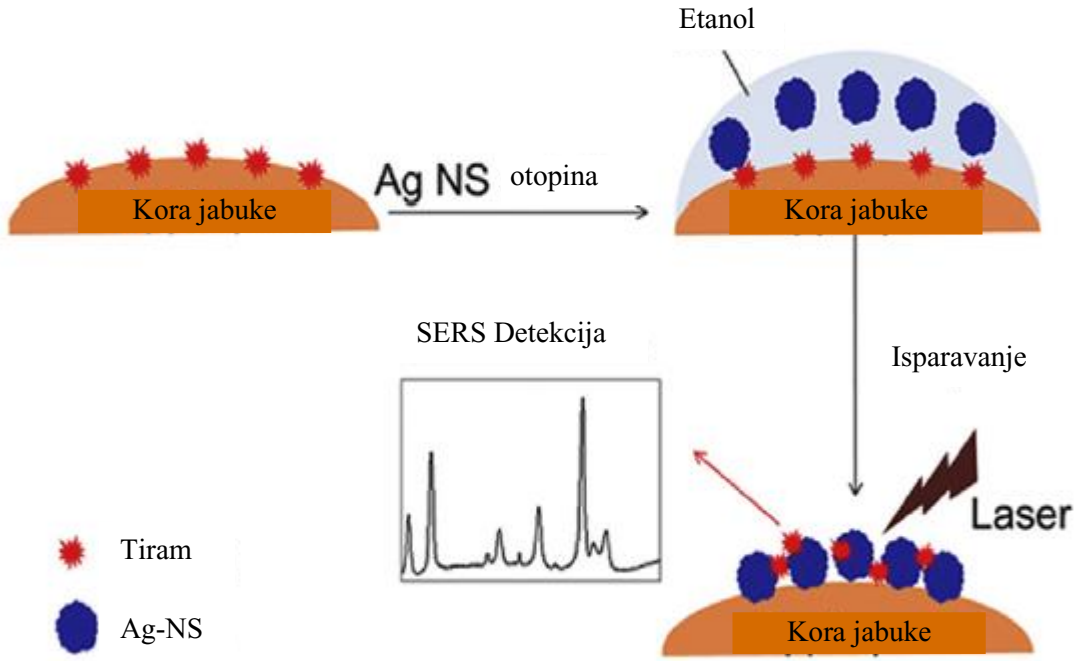
Ramanovo raspršenje je pojava neelastičnog, necjelovitog raspršenja svijetlosti na materijalu. Ramanova spektroskopija koristi se molekulskim vibracijama za njihovu identifikaciju. Rezultat spektroskopije je graf koji je specifično vezan za svaku molekulu ili element kao otisak prsta. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *Surface enhanced Raman scattering*, SERS) je metoda kod koje dolazi do povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama adsorbiranim na ili u neposrednoj blizini metalnih nanostruktura. Metoda integrira molekularnu specifičnost Ramanove spektroskopije i optička svojstva nanostruktura. Najčešće se koriste srebrne i zlatne nanočestice ili bimetalne nanočestice zlata i srebra. S obzirom na vrlo brzu analizu, stabilnost i nedestruktivnu karakterizaciju, SERS se koristi od područja biomedicinske analize, pa sve do praćenja stanja okoliša. Korištenjem ove metode moguće je postići ultra-osjetljivost sve do razine prepoznavanja jedne molekule. Metoda je uz to ponovljiva i prenosiva.

Jačina Ramanovog raspršenja ovisi o orijentaciji, obliku, veličini i agregaciji nanočestica.

Skupina znanstvenika razvila je senzorski sustav temeljen na SERS strategiji za direktnu ekstrakciju i brzo određivanje ciljanih pesticida koristeći zlatne nanočestice i ljepljivu traku koja je vršila funkciju nanonosača. Zahvaljujući interakciji između zlatnih nanočestica i pesticida, ovaj senzorski sustav bio je pogodan za kvalitativno određivanje metil parationa, klorpirifosa i tirama u različitim uzorcima [45].

U usporedbi s korištenjem krutog zlata, srebro zahtjeva jednostavnije postupke pripreme te pokazuje jaču plazmonsku rezonanciju što rezultira jačim Ramanovim pojačanjem. Vođena tim idejama, skupina znanstvenika razvila je sustav temeljen na SERS za osjetljivo praćenje ostataka pesticida u kori voća. Površinski su raspršili srebrne nanočestice kako bi prekrili koru kruške ili jabuke. Nakon njihove interakcije s molekulama parakvata, slijedila je njegova detekcija. Postignuta je visoka osjetljivost za parakvat, do reda veličine 10^{-9} mol/L [46].

Senzor za kvantitativno određivanje tirama razvijen je koristeći SERS aktivne nanostrukture, koje se sastoje od dielektričnih nanočestica silicijeva dioksida prevučenih srebrnim nanoljuskama. Uslijed redukcije oktilamina pri sobnoj temperaturi, ujednačeni sloj srebrnih nanoljusaka direktno raste na površini nanočestica silicijeva dioksida. Zahvaljujući jako pojačanim Ramanovim signalima, na ovaj način je moguće brzo i osjetljivo određivanje tirama do granice od 38 ng/cm^2 kore jabuke. Shema procesa prikazana je na slici 13 [47].



Slika 13. Djelovanje senzora na bazi srebrnih nanoljusaka [6].

8. ZAKLJUČAK

Jedan od najvećih okolišnih problema predstavljaju ostaci pesticida. Inovaciju pri njihovoj detekciji predstavljaju senzori koji, ovisno o vrsti, često pokazuju izuzetne karakteristike, a osobito osjetljivost i selektivnost. Korištenjem elemenata za prepoznavanje s visokim afinitetom za analit, kao i novih pristupa prevođenja i prijenosa signala te uvođenjem nanomaterijala, omogućeno je određivanje pesticida uz postizanje izvrsnih analitičkih parametara. Najveća mana pri uporabi senzora, a pogotovo biosenzora, je njihova cijena koja je često vrlo visoka zbog složenosti njihove proizvodnje. Osim skupoće, nedostatak je i često kompliciranа priprema koju je potrebno izvršiti prije samog početka analize. Takve pripreme, na primjer SELEX, često znaju trajati i duže od same detekcije. S obzirom da su senzori relativno nov i moderan način detekcije pesticida, potrebno ih je dodatno razvijati i usavršavati, kako bi postali dostupniji i time proširili svoju primjenu.

9. LITERATURA

[1] B. R. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley and Sons, Chichester, Engleska, 2004.

[2] D. Kovačić, *Senzori i njihova primjena u preciznoj poljoprivredi*, diplomski rad, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2019.

[3] http://www.bioteka.hr/modules/lexikon/entry.php?entryID=115 (8.8.2021.)

[4] G. Gajski, M. Gerić, S. Ravlić, Ž. Capuder, V. Garaj-Vrhovac, *Presence of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Croatia and Evaluation of Its Genotoxicity*, *Insecitides-Pest Engineering*, InTechOpen, London, Engleska, 2021.

[5] W. Wang, X. Wang, N. Cheng, Y. Luo, Y. Lin, W. Xu, D. Du, *Recent advances in nanomaterials-based electrochemical (bio)sensors for pesticides detection*, Trends in Analytical Chemistry 132 (2020), 116041.

[6] X. Yan, H. Li, X. Su, *Review of optical sensors for pesticides*, Trends in Analytical Chemistry 103 (2018), 1-20.

[7] L. Zovko, *Optički biokemijski senzori na tekstilu i papiru*, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017.

[8] M. Zubak, *Nosivi bežični optički kemijski senzori*, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2015.

[9] A. Khosravipour, A. K. Skidmore, T. Wang, M. Isenburg, K. Khoshelham, *Effect of slope on treetop detection using a LiDAR Canopy Height Model*, ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing 104 (2015), 44–52.

[10] A. Erceg Kuzmić, *Sinteza i primjena molekulski tiskanih polimera*, Polimeri 25 (2004), 122-131.

[11] J. Dilla, D. J. Pleshingerb, S. C. Johnson, S. J. Leavesley, T. C. Richa, *Cellular Signalling: Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals*: *A biological perspective of the history of FRET*, Cellular signalling 75 (2020), 109769.

[12] A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze*, diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Split, 2014.

[13] I. Božić, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza nehlapljivih izolata korijena gaveza*, diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.

[14] S. Z. Liao, W. T. Han, H. Z. Ding, D. X. Xie, H. Tan, S. Y. Yang, Z. Y. Wu, G. L. Shen, R. Q. Yu, *Modulated dye retention for the signal-on fluorometric determination of acetylcholinesterase inhibitor*, Analytical Chemistry 85 (2013), 4968-4973.

[15] X. Yan, Y. Song, C. Z. Zhu, H. X. Li, D. Du, X. G. Su, Y. H. Lin*, MnO_2 nanosheet-carbon dots sensing platform for sensitive detection of organophosphorus pesticides*, Analytical Chemisty 90 (2018), 2618-2624.

[16] D. B. Liu, W. W. Chen, J. H. Wei, X. B. Li, Z. Wang, X. Y. Jiang, *A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides,* Analytical Chemistry 84 (2012), 4185-4191.

[17] N. Li, X. W. Wang, J. Chen, L. Sun, P. Chen, *Graphene quantum dots for ultrasensitive detection of acetylcholinesterase and its inhibitors*, 2D Materials 2 (2015), 034018.

[18] T. T. Xiao, X. Z. Shi, H. F. Jiao, A. L. Sun, H. Ding, R. R. Zhang, D. D. Pan, D. X. Li, J. Chen, *Selective and sensitive determination of cypermethrin in fish via enzyme-linked immunosorbent assay-like method based on molecularly imprinted artificial antibody-quantum dot optosensing materials*, Biosensors and Bioelectronics 75 (2016), 34-40.

[19] H. B. Li, Y. L. Li, J. Cheng, *Molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdSe quantum dots for highly selective and sensitive optosensing of pyrethroids,* Chemistry of Materials 22 (2010), 2451-2457.

[20] Y. Zhao, Y. Ma, H. Li, L. Wang, *Composite QDs@MIP nanospheres for specific recognition and direct fluorescent quantification of pesticides in aqueous media*, Analytical Chemistry 84 (2012), 386-395.

[21] A. C. Vinayaka, S. Basheer, M. S. Thakur, *Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay-based biosensor*, Biosensors and Bioelectronics 24 (2009), 1615-1620.

[22] Z. X. Zou, D. Du, J. Wang, J. N. Smith, C. Timchalk, Y. Q. Li, Y. H. Lin, *Quantum dot-based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos,* Analytical Chemistry 82 (2010), 5125-5133.

[23] L. N. Zhou, Y. J. Cao, B. X. Lin, S. H. Song, Y. Yu, L. L. Shui, *In-situ visual and ul-trasensitive detection of phosmet using a fluorescent immunoassay probe,* Sensors and Actuators B Chemical 241 (2017), 915-922.

[24] H. B. Li, F. G. Qu, *Synthesis of CdTe quantum dots in sol-gel-derived composite silica spheres coated with calix arene as luminescent probes for pesticides,* Chemistry of Materials 19 (2007), 4148-4154.

[25] F. G. Qu, X. F. Zhou, J. Xu, H. B. Li, G. Y. Xie, *Luminescence switching of CdTe quantum dots in presence of p-sulfonatocalix [4] arene to detect pesticides in aqueous solution,* Talanta 78 (2009), 1359-1363.

[26] X. Zeng, J. Ma, L. Luo, L. Yang, X. Cao, D. Tian, H. Li, *Pesticide macroscopic recognition by a naphthol-appended calix [4] arene*, Organic Letters 17 (2015), 2976-2979.

[27] S. G. Sun, F. S. Li, F. Y. Liu, J. T. Wang, X. J. Peng, *Fluorescence detecting of paraquat using host-guest chemistry with cucurbit [8] uril*, Scientific Reports 4 (2014), 3570-3571.

[28] Z. Xue-Mei, Z. Jia-Wei, S. Shang-Hong, C. Guan-Hua, J. Chinese, *Screening of Oligonucleotide Aptamers and Application in detection of Pesticide and Veterinary Drug Residues*, Analytical Chemistry (2019), 488-499.

[29] J. A. He, Y. A. Liu, M. T. Fan, X. J. Liu, *Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid,* Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (2011), 1582-1586.

[30] W. W. Hu, Q. S. Chen, H. H. Li, Q. Ouyang, J. W. Zhao, *Fabricating a novel label-free aptasensor for acetamiprid by fluorescence resonance energy transfer between NH2-NaYF4: Yb, Ho@SiO2 and Au nanoparticles*, Biosensors and Bioelectronics 80 (2016), 398-404.

[31] Q. Xu, S. Du, G. D. Jin, H. B. Li, X. Y. Hu, *Determination of acetamipirid by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles*, Microchimica Acta 173 (2011), 323-329.

[32] M. S. Kim, G. W. Kim, T. J. Park, *A facile and sensitive detecton of organophosphorus chemicals by rapid aggregation of gold nanoparticles using organic compounds,* Biosensors and Bioelectronics 67 (2015), 408-412.

[33] J. Sun, L. Guo, Y. Bao, J. Xie, *A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide,* Biosensors and Bioelectronics 28 (2011), 152-157.

[34] L. L. Lu, Y. S. Xia, *enzymatic reaction modulated gold nanorod end-to-end self-assembly for ultrahigh sensitively colorimetric sensing of cholinesterase and organophosphate pesticides in human blood,* Analytical Chemistry 87 (2015), 8584-8591.

[35] L. Z. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. B. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. H. Wang, J. Feng, D. L. Yang, S. Perret, X. Yan, *Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles,* Nature Nanotechnology 2 (2007), 577-583.

[36] S. Biswas, P. Tripathi, N. Kumar, S. Nara, *Gold nanorods as peroxidase mimetics and its application for colorimetric biosensing of malathion,* Sensors and Actuators B Chemical 231 (2016), 584-592.

[37] S. Singh, P. Tripathi, N. Kumar, S. Nara, *Colorimetric sensing of malathion using palladium-gold bimetallic nanozyme,* Biosensors and Bioelectronics 92 (2017), 280-286.

[38] B. X. Lin, Y. Yu, R. Y. Li, Y. J. Cao, M. L. Guo, *Turn-on sensor for quantification and imaging of acetamipirid residues based on quantum dots functionalized with aptamer,* Sensors and Actuators B Chemical 229 (2016), 100-109.

[39] P. Weerathunge, R. Ramanathan, R. Shukla, T. K. Sharma, V. Bansal, *Aptamer controlled reversible inhibition of gold nanozyme activity for pesticide sensing,* Analytical Chemistry 86 (2014), 11937-11941.

[40] Z. T. Yang, J. Qian, X. W. Yang, D. Jiang, X. J. Du, K. Wang, H. P. Mao, K. Wang, *A facile label-free colorimetric aptasensor for acetamipirid based on the peroxidase-like activity od hemin-functionalized reduced graphene oxide,* Biosensors and Bioelectronics 65 (2015), 39-46.

[41] H. X. Li, X. Yan, H. Y. Shi, X. H. Yang, *Development of a bi-enzyme tracer competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of thiacloprid and imidaclothiz in agricultural samples,* Food Chemistry 164 (2014), 166-172.

[42] L. M. Wang, J. Cai, Y. L. Wang, Q. K. Fang, S. Y. Wang, Q. Cheng, D. Du, Y. H. Lin, F. Q. Liu, *A bare-eye-based lateral flow immunoassay based on the use of gold nanoparticles for simultaneous detection of three pesticides,* Microchimica Acta 181 (2014), 1565-2572.

[43] C. Y. Liu, Q. J. Jia, C. H. Yang, R. R. Qiao, L. H. Jing, L. B. Wang, C. L. Xu, M. Y. Gao, *Lateral flow immunochromatographic assay or sensitive pesticide detection by using Fe_3O_4 nanoparticleaggregates as color reagents,* Analytical Chemistry 83 (2011), 6778-6784.

[44] P. F. Du, M. J. Jin, G. Chen, C. Zhang, X. Y. Cui, Y. D. Zhang, Y. X. Zhang, P. Zou, Z. J. Jiang, X. L. Cao, Y. X. She, F. Jin, J. Wang, *Competitive colorimetric triazophos immunoassay employing magnetic microspheres and milti-labeled gold nanoparticles along with enzymatic signal enhancement,* Microchimica Acta 184 (2017), 3705-3721.

[45] J. M. Chen, Y. J. Huang, P. Kannan, L. Zhang, Z. Y. Lin, J. W. Zhang, T. Chen, L. H. Guo, *Flexibile and adhesive surface enhance Raman scattering active tape for rapid detection of pesticide residues in fruits and vegetables,* Analytical Chemistry 88 (2016), 2149-2155.

[46] H. Fang, X. Zhang, S. J. Zhang, L. Liu, Y. M. Zhao, H. I. Xu, *Ultrasensitive and quantitative detection of paraquat on fruits skins via surface-enhanced Raman spectroscopy,* Sensors and Actuators B Chemical 213 (2015), 452-456.

[47] J. K. Yang, H. Kang, H. Lee, A. Jo, S. Jeong, S. J. Jeon, H. I. Kim, H. Y. Lee, D. H. Jeong, J. H. Kim, Y. S. Lee, *Single-step and rapid growth of silver nanoshells as SERS-active nanostructures for label-free detection of pesticides,* ACS Applied Materials & Interfaces 6

(2014), 12541-12549.