



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
Universitatea Națională de Științe și Tehnologie
Politehnica București

TEZĂ DE DOCTORAT

Autor:

Ing. Georgian-Alin TOADER

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Mariana IONIȚĂ

BUCUREȘTI

-2026-



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII

Universitatea Națională de Științe și Tehnologie

Politehnica București

PLATFORMĂ OPTICĂ PE BAZĂ DE GRAFENĂ
PENTRU EXTRAȚIA ȘI DETECȚIA
OLIGONUCLEOTIDELOR

Autor:

Ing. Georgian-Alin TOADER

Conducător științific:

Prof. dr. ing. Mariana IONIȚĂ

BUCUREȘTI

-2026-

Cuprins

<u>Abstract</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>Rezumat</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>Scopul și structura tezei</u>	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 1. Stadiul actual al cercetării și motivația studiului	Error! Bookmark not defined.
1.1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
1.2. Stadiul actual al cercetării	Error! Bookmark not defined.
1.3. Obiectivele generale și specifice ale tezei.	8
Capitolul 2. Fundamente teoretice pentru selecția metodei și a materialelor	Error! Bookmark not defined.
2.1. Fundamentele biosenzorilor	Error! Bookmark not defined.
2.2. Clasificarea mecanismelor de transducție	Error! Bookmark not defined.
2.2.1. Transducție mecanică	Error! Bookmark not defined.
2.2.2. Transducție termică	Error! Bookmark not defined.
2.2.3. Transducție spectrochimică	Error! Bookmark not defined.
2.2.4. Transducție magnetică	Error! Bookmark not defined.
2.2.5. Transducție electrochimică	Error! Bookmark not defined.
2.2.6. Transducție optică	Error! Bookmark not defined.
2.3. Clasificarea fluoroforilor	Error! Bookmark not defined.
2.3.1. Puncte cuantice	Error! Bookmark not defined.
2.3.1.1. Puncte cuantice semiconductoare și pe bază de metale nobile	Error! Bookmark not defined.
2.3.1.2. Puncte cuantice pe bază de nanocristale de perovskit.	Error! Bookmark not defined.
2.3.1.3. Puncte de carbon	Error! Bookmark not defined.

2.3.2. Fluorofori pe bază de lantanide	Error! Bookmark not defined.
2.3.3. Complecși metal-ligand ai metalelor de tranziție.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.4. Fluorofori organici	Error! Bookmark not defined.
2.4. Quencheri în biosenzorii fluorescenți	Error! Bookmark not defined.
2.4.1. Quencheri pe bază de grafenă	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 3. Hibrid necovalent oxid de grafenă/nitroceluloză ca fază solidă pentru extracția oligo-ADN din medii complexe.....	Error! Bookmark not defined.
3.1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
3.2. Rezultate și discuții.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1. Caracterizarea ansamblului de membrane hibride nitroceluloză-oxid de grafenă ..	Error! Bookmark not defined.
3.2.2. Influența condițiilor de analiză asupra fluorescenței FAM-ssDNA: detecția și extracția oligo-ADN utilizând membrane hibride nitroceluloză-oxid de grafenă în medii complexe	Error! Bookmark not defined.
3.3. Materiale și metode.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.1. Reactivi.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.2. Prepararea membranei hibride nitroceluloză-oxid de grafenă	Error! Bookmark not defined.
3.3.3. Procedura de preparare și desorbție a FAM-ssDNA din membrane de nitroceluloză și membrane hibride nitroceluloză-oxid de grafenă.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.4. Analiză spectrofluorimetrică	Error! Bookmark not defined.
3.3.5. Caracterizarea membranei	Error! Bookmark not defined.
3.4. Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 4. Extracția oligo-ADN din medii complexe în fază solidă utilizând o membrană hibridă grafenă aminată/nitroceluloză	Error! Bookmark not defined.
4.1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
4.2. Rezultate și discuții	Error! Bookmark not defined.

4.2.1. Analiza membranei hibride nitroceluloză/oxid de grafenă redus aminat.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2. Adsorbția, detecția și extracția oligo-ADN utilizând membrane hibride nitroceluloză/oxid de grafenă redus aminat în medii complexe.....	Error! Bookmark not defined.
4.3. Materiale și metode.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.1. Reactivi.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2. Prepararea dispersiei de oxid de grafenă redus aminat ..	Error! Bookmark not defined.
4.3.3. Fabricarea membranei hibride nitroceluloză/oxid de grafenă redus aminat	Error! Bookmark not defined.
4.3.4. Adsorbția, extracția și detecția ssDNA marcat cu FAM în soluții ionice utilizând membrana hibridă nitroceluloză/oxid de grafenă redus aminat	Error! Bookmark not defined.
4.3.5. Analiză spectrofluorimetrică	Error! Bookmark not defined.
4.3.6. Caracterizarea membranei	Error! Bookmark not defined.
4.4. Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 5. Extracția eficientă în fază solidă a oligo-ADN din medii complexe utilizând o membrană de nitroceluloză modificată cu nanotuburi de carbon și oxid de grafenă redus aminat	Error! Bookmark not defined.
5.1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
5.2. Materiale și metode.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.1. Materiale.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.2. Prepararea dispersiei de nanotuburi de carbon cu un singur perete/oxid de grafenă redus aminat	Error! Bookmark not defined.
5.2.3. Fabricarea membranei hibride nanotuburi de carbon cu un singur perete/oxid de grafenă redus aminat-nitroceluloză	Error! Bookmark not defined.
5.2.4. Procese de adsorbție, extracție și detecție a ssDNA marcat cu FAM în soluții ionice utilizând membrana hibridă nanotuburi de carbon cu un singur perete/oxid de grafenă redus aminat-nitroceluloză.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.5. Analiză spectrofluorimetrică	Error! Bookmark not defined.

5.2.6. Caracterizarea membranei	Error! Bookmark not defined.
5.3. Rezultate și discuții.....	Error! Bookmark not defined.
5.3.1. Evaluarea membranei hibride nanotuburi de carbon cu un singur perete/oxid de grafenă redus aminat-nitroceluloză	Error! Bookmark not defined.
5.3.2. Adsorbția, detecția și extracția oligonucleotidelor în diferite soluții ionice complexe utilizând membrane de nitroceluloză și membrane hibride nanotuburi de carbon cu un singur perete/oxid de grafenă redus aminat-nitroceluloză	Error! Bookmark not defined.
5.4. Concluzii.....	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 6. Concluzii generale, contribuții originale principale și perspective.....	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
6.1. Concluzii generale	Error! Bookmark not defined.
6.2. Contribuții originale.....	Error! Bookmark not defined.
6.3. Perspective	17
ANEXA I. Lista publicațiilor și participarea la conferințe științifice	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
Bibliografie.....	Error! Bookmark not defined.

Abstract

Prezenta teză de doctorat investighează rolul derivaților grafenici și nanotuburilor de carbon (CNTs) în modificarea membranelor de nitroceluloză (NC), în vederea dezvoltării unei abordări inovatoare pentru extracția și detecția bazată pe fluorescență a oligonucleotidelor de dimensiuni mici din medii ionice complexe. Obiectivul general este proiectarea unei platforme optice nouă, simplă, cu cost redus și fiabilă, capabilă să depășească limitările actuale din domeniul biosenzorilor, asociate cu izolarea și detecția acizilor nucleici în concentrații scăzute, precum și cu stabilitatea platformelor în probe biologice. Pentru atingerea acestui obiectiv, au fost urmărite trei direcții de cercetare, axate pe proiectarea și optimizarea progresivă a membranelor de NC modificate cu derivați de grafenă și CNTs. Într-o primă etapă, direcția principală de cercetare a vizat dezvoltarea unei membrane de NC modificate cu oxid de grafenă (GO), utilizată ca platformă de bază, permițând investigarea proceselor de adsorbție, extracție și a răspunsului fluorescent al oligonucleotidelor în medii biologice simulate. Această etapă a oferit o înțelegere fundamentală a rolului timpului de incubare și al compoziției mediului în determinarea eficienței extracției, a generării semnalului și a stabilității platformei în medii apoase.

Pornind de la aceste rezultate, a doua direcție de cercetare s-a concentrat pe modificarea membranelor de NC cu oxid de grafenă redus, funcționalizat cu amino-polietilenglicol ($\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$), rezultând într-o extracție și detecție fluorescentă a oligonucleotidelor îmbunătățită. O atenție deosebită a fost acordată rolului mediilor ionice complexe, demonstrând că ionii divalenți, în special Mg^{2+} , influențează semnificativ procesele de adsorbție-desorbție și răspunsul fluorescent, conducând la o eficiență crescută a extracției în condiții optimizate.

În etapa finală, designul platformei a fost extins prin utilizarea combinată a $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$ și a nanotuburilor de carbon cu un singur perete (SWCNTs), valorificând proprietățile complementare de adsorbție și de stingere a fluorescenței ale acestor nanomateriale. Rezultatele evidențiază efectul sinergic dintre SWCNTs și $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$, unde suprafața specifică crescută, stabilitatea structurală îmbunătățită și interacțiunile electronice intensificate, împreună cu complexitatea mediului ionic utilizat, conduc la o adsorbție mai eficientă a oligonucleotidelor și la o modulare mai eficientă a semnalului fluorescent.

În ansamblu, această teză contribuie la dezvoltarea biosenzorilor prin înțelegerea modului în care nanomaterialele pe bază de grafenă, nanotuburile de carbon și mediile ionice interacționează la interfața solid-lichid pentru a controla extracția oligonucleotidelor și detecția bazată pe fluorescență. Rezultatele obținute susțin dezvoltarea de platforme optice eficiente, scalabile și orientate spre aplicații, cu potențial de a avansa tehnologiile de detecție optică și de a permite integrarea acestora în aplicații practice pentru diagnosticare și sisteme de tip point-of-care.

Rezumatul tezei de doctorat

Obiective generale

Dezvoltările recente în tehnologia biosenzorilor au evidențiat necesitatea unor platforme analitice care să fie nu doar foarte sensibile și selective, ci și ușor de utilizat, fiabile și adaptabile la condiții biologice complexe. Acești factori sunt deosebit de importanți în medicina regenerativă, mai ales în studiul bolilor osoase, precum osteosarcomul, mielomul multiplu, metastazele osoase și osteoporoza, unde detecția biomoleculelor prezente în concentrații reduse, în special a oligonucleotidelor scurte, este esențială pentru monitorizarea modificărilor moleculare timpurii, a comportamentului celular, a diferențierii osteogenice, a remodelării matricei extracelulare și a răspunsului terapeutic. Totuși, dimensiunea redusă a oligonucleotidelor generează dificultăți analitice, deoarece chiar și tehnicile convenționale întâmpină limitări în extracția și detecția eficientă a acestora, din cauza abundenței scăzute și a susceptibilității crescute la degradare în probe biologice. Pornind de la aceste provocări și de la necesitatea tot mai mare de metode analitice rapide, sensibile și fiabile, această teză abordează o lacună existentă în domeniul biosenzorilor prin investigarea utilizării derivaților grafenici și a nanotuburilor de carbon pentru dezvoltarea unor platforme optice sensibile destinate extracției și detecției oligonucleotidelor scurte.

Obiectivul principal al acestei teze este investigarea modului în care derivații pe bază de grafenă și nanotuburile de carbon pot fi utilizați pentru modificarea membranelor de nitroceluloză (NC), în vederea dezvoltării unei abordări noi pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. În același timp, teza analizează rolul compoziției materialului, al modificării de suprafață și al complexității mediului ionic de adsorbție în modularea performanței analitice a platformei. Prin această abordare, teza oferă o înțelegere mai profundă a modului în care derivații grafenici, nanotuburile de carbon și condițiile ionice influențează extracția oligonucleotidelor scurte și răspunsul fluorescent la interfața membranei de NC, unde adsorbția la distanță mică și transferul interfacial de electroni controlează stingerea semnalului fluorescent, conducând la un contrast analitic îmbunătățit, stabilitate crescută și reducerea degradării membranei în condiții biologice complexe.

Teza este organizată în două părți principale. Prima parte prezintă stadiul actual al cercetării în domeniul biosenzorilor, descrie obiectivele generale ale tezei și oferă o prezentare concentrată asupra metodelor analitice, strategiilor de transducție și materialelor avansate utilizate pentru detecția oligonucleotidelor și pentru aplicații biomedicale asociate. A doua parte prezintă contribuțiile originale ale acestei teze, cu accent pe proiectarea și optimizarea platformelor optice

sensibile, bazate pe derivați grafenici și nanotuburi de carbon, pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte. Toate datele care susțin această teză sunt prezentate în capitolele următoare, descrise pe scurt mai jos.

Capitolul 1 introduce stadiul actual al cercetării în domeniul biosenzorilor și prezintă obiectivele generale care susțin structura acestei teze. Pe baza acestor elemente, **Capitolul 2** stabilește fundamentele teoretice pentru metodele și materialele selectate, în urma analizei literaturii. Acesta concluzionează că abordările optice bazate pe fluorescență, care utilizează fluorofori precum fluoresceina în combinație cu derivați grafenici și nanotuburi de carbon ca quencheri, integrați pe membrane de NC ca suporturi solide, pot depăși eficient provocările analitice din biosenzori asociate cu extracția și detecția oligonucleotidelor scurte în probe biologice.

Pornind de la aceste considerente, **Capitolul 3** prezintă prima parte originală a tezei, concentrată pe dezvoltarea unei platforme optice bazate pe modificarea membranelor de NC cu oxid de grafenă (GO) pentru extracția oligonucleotidelor. Fabricarea cu succes a platformei a fost confirmată prin caracterizare fizico-chimică utilizând spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), microscopie electronică de baleiaj (SEM) și măsurători de umectabilitate. Performanța de adsorbție a platformei dezvoltate a fost evaluată utilizând o secvență de ssDNA marcată fluorescent în medii complexe la pH 7,0, pe bază de apă, Alpha Minimum Essential Medium (α MEM) și α MEM suplimentat cu ser fetal bovin (FBS), pentru diferite perioade de incubare. Acidul dezoxiribonucleic monocatenar marcat fluorescent, ssDNA, a fost apoi detectat prin incubarea membranelor într-o soluție de desorbție la pH 8,0, permițând eliberarea oligonucleotidelor din platforma obținută într-o soluție adecvată pentru analiza fluorescentă. Rezultatele au demonstrat că eficiența extracției și răspunsurile fluorescente sunt puternic influențate atât de modificarea suprafeței membranei de NC cu GO, cât și de condițiile experimentale, în special de timpul de incubare și de compoziția mediului. Aceste rezultate au permis identificarea celor mai adecvate condiții de lucru pentru studiile ulterioare, constituind baza tezei pentru optimizarea platformei în **Capitolul 4**.

Reprezentând a doua parte originală a acestei teze, acest capitol se concentrează pe modificarea membranelor de NC cu oxid de grafenă redus funcționalizat cu amino-polietilenglicol (NH_2 -PEG-rGO), pentru îmbunătățirea extracției oligonucleotidelor și a detecției bazate pe fluorescență. Modificarea suprafeței platformei dezvoltate a fost investigată în detaliu, fiind susținută de caracterizare fizico-chimică prin FTIR, SEM și analiză de umectabilitate, care au evidențiat modificări morfologice și interfaciale semnificative, inclusiv creșterea hidrofobicității membranei modificate. În paralel, o atenție deosebită este acordată rolului mediilor complexe

optimizate identificate în capitolul anterior, demonstrând că atât suplimentarea cu ioni divalenți, cât și tipul acestora, precum Mg^{2+} și Mn^{2+} , influențează puternic imobilizarea oligonucleotidelor și răspunsul fluorescent. Rezultatele au indicat că mediile care conțin $MgCl_2$ oferă cele mai favorabile condiții, îmbunătățind semnificativ eficiența extracției comparativ cu platforma nemodificată, evidențiind astfel rolul critic al compoziției ionice și al modificării de suprafață în modularea performanței platformei la interfața membranei.

Extinzând aceste rezultate, **Capitolul 5**, care reprezintă a treia parte originală a tezei, avansează proiectarea platformei prin utilizarea combinată a NH_2 -PEG-rGO și a nanotuburilor de carbon cu un singur perete (SWCNTs), cu scopul de a îmbunătăți eficiența extracției și modularea semnalului fluorescent prin valorificarea proprietăților complementare de adsorbție și quenching ale acestor nanomateriale pe bază de carbon. Acest capitol susține modificarea platformei prin analize fizico-chimice și structurale complexe, inclusiv FTIR, spectroscopie Raman, spectroscopie de fotoelectroni de raze X (XPS), SEM și măsurători de umectabilitate, care confirmă integrarea cu succes și modificările interfaciale. În acest context, influența condițiilor ionice este clarificată suplimentar, demonstrând că mediile care conțin ioni divalenți, în special $MgCl_2$, favorizează interacțiuni mai puternice între membrana modificată și oligonucleotide, conducând la un răspuns fluorescent îmbunătățit și la randamente mai mari de extracție. Platforma optimizată prezintă o performanță analitică îmbunătățită comparativ cu sistemele dezvoltate anterior, confirmând efectul sinergic al compoziției materialului și al complexității condițiilor ionice.

Rezultatele sunt consolidate în **Capitolul 6**, care prezintă concluziile generale ale tezei și sintetizează principalele contribuții științifice originale obținute pe parcursul programului doctoral, subliniind potențialul platformelor optice fluorescente dezvoltate, bazate pe derivați grafenici și CNTs, pentru extracția și detecția oligonucleotidelor. În plus, acest capitol prezintă perspective pentru optimizarea ulterioară a platformelor optice, integrarea acestora în sisteme avansate de biosenzori și posibile aplicații în medicina personalizată și monitorizarea în timp real.

În ansamblu, această teză contribuie la domeniul biosenzorilor prin demonstrarea modului în care derivații grafenici și nanotuburile de carbon pot îmbunătăți performanța membranelor de NC pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Rezultatele evidențiază importanța modificării de suprafață, a pH-ului, a condițiilor ionice și a complementarității materialelor în îmbunătățirea eficienței extracției, modulării semnalului și fiabilității analitice în medii ionice complexe. Prin clarificarea interacțiunii dintre platforma optică, compoziția mediului ionic complex și mecanismele de fluorescență, această teză oferă o direcție pentru dezvoltarea ulterioară a unor platforme optice simple, cu cost redus și sensibile pentru biosenzori, subliniind

necesitatea continuării cercetărilor pentru depășirea limitărilor actuale privind performanța biosenzorilor.

Motivația cercetării

Ingineria țesutului osos reprezintă un domeniu al medicinei regenerative orientat către repararea sau regenerarea osului afectat, prin combinarea biomaterialelor, celulelor și moleculelor bioactive pentru susținerea osteogenezei, vascularizării și integrării structurale. Totuși, în stadiul actual, complexitatea intrinsecă a vindecării osoase și capacitatea limitată de monitorizare directă, în timp real, a proceselor moleculare și genetice rămân constrângeri majore ale abordărilor existente, subliniind necesitatea unor metode avansate de detecție [1-3]. În acest context, metodele fiabile de detecție a biomoleculelor asociate țesutului osos sunt esențiale pentru monitorizarea activității osteogenice, formării matricei, integrării funcționale a strategiilor regenerative sau chiar a căilor de expresie și supresie genică asociate bolilor osoase. Metodele de detecție reprezintă abordări analitice esențiale în biosenzori, deoarece transduc interacțiunile moleculare în semnale măsurabile pentru identificarea și cuantificarea analiților [4-6]. Piața globală a biosenzorilor prezintă o creștere accentuată, fiind evaluată la aproximativ 34,71 miliarde USD în 2026 și estimată să ajungă la 63,96 miliarde USD până în 2033, ceea ce corespunde unei rate anuale compuse de creștere de aproximativ 9,12%. Această evoluție este susținută de adoptarea accelerată a mecanismelor de biosensing și de integrarea tot mai amplă a inteligenței artificiale în aplicațiile de diagnostic și monitorizare [7]. Până în prezent, mecanismele de biosensing includ o gamă largă de strategii de transducție, precum abordări electrochimice, mecanice, optice, termice, magnetice și spectrochimice, fiecare oferind avantaje analitice distincte în ceea ce privește sensibilitatea, selectivitatea, timpul de răspuns și adecvarea pentru anumite contexte aplicative. Din această perspectivă, platformele electrochimice domină aplicațiile comerciale actuale, în ciuda limitărilor asociate sensibilității, stabilității și interferențelor de matrice [8, 9], în timp ce metodologiile mecanice și termice sunt limitate predominant la mediul de cercetare, din cauza complexității de fabricație și a constrângerilor de scalabilitate [10-13]. În mod similar, abordările magnetice și spectrometrice avansează către comercializare timpurie, respectiv către aplicare analitică extinsă. Totuși, utilizarea lor largă rămâne limitată de instrumentația specializată, tehnicile de marcare și portabilitatea redusă [14-17]. Pe baza acestor aspecte, biosenzorii optici atrag un interes tot mai mare ca platforme complementare, datorită sensibilității intrinseci ridicate, capacității de detecție în timp real și fără marcaj, precum și compatibilității cu sisteme miniaturizate și point-of-care [18, 19].

Biosensingul optic este o tehnică analitică ce valorifică interacțiunea dintre lumină și sisteme biofuncționalizate pentru transducerea evenimentelor de recunoaștere moleculară în semnale optice detectabile. Această abordare utilizează fenomene fundamentale precum absorbția, fluorescența, împrăștierea, efectele plasmonice și cele de rezonanță, permițând detecția cu fidelitate ridicată a analiților biologici [20, 21]. Detecția bazată pe absorbție oferă instrumentație simplă, stabilitate ridicată și un răspuns cantitativ direct. Totuși, aceasta este limitată fundamental de sensibilitatea redusă și selectivitatea slabă față de analit în matrici complexe [22, 23]. Comparativ, procesele de împrăștiere elastică și inelastică oferă informații chimice bogate, fără necesitatea marcării, însă sunt limitate de intensitatea slabă a semnalului, susceptibilitatea la interferențe de fond și dependența de instrumentație avansată, ceea ce restricționează analiza rapidă și detecția la concentrații reduse ale analitului [24, 25]. Procesele bazate pe rezonanță și plasmonică oferă sensibilitate îmbunătățită și detecție fără marcaj prin valorificarea interacțiunilor puternice lumină-materie la scară nanometrică. Cu toate acestea, aceste abordări depind puternic de fluctuațiile indicelui de refracție, geometria nanometrică și alinierea optică precisă, factori care pot compromite stabilitatea și acuratețea cantitativă [26, 27]. Aceste limitări au determinat orientarea către procesele bazate pe fluorescență, care rămân printre cele mai versatile și utilizate scheme de detecție, permițând monitorizarea sensibilă și specifică a interacțiunilor biomoleculare prin emisie spontană de la fluorofori excitați [28, 29]. În plus, datorită sensibilității intrinseci ridicate, specificității moleculare puternice și domeniului dinamic larg, abordările bazate pe fluorescență permit transducția semnalului în timp real utilizând instrumentație relativ simplă și cost-eficientă. Acest lucru facilitează integrarea la scară micro- și nanometrică în sisteme portabile, point-of-care și platforme diagnostice cu randament ridicat [30-33].

În cadrul strategiilor de transducție bazate pe fluorescență, transferul de electroni fotoindus, PET, transferul de energie prin rezonanță Förster, FRET, și transferul intramolecular de sarcină, ICT, se numără printre cele mai utilizate mecanisme. FRET este un proces de transfer neradiativ de energie, în care energia de excitație este transferată de la un fluorofor donor către un acceptor aflat în proximitate, într-un mod puternic dependent de distanța dintre aceștia [31, 34, 35]; PET implică procese de transfer de sarcină care modulează emisia prin stingere sau amplificare [36, 37], în timp ce ICT rezultă din redistribuirea densității electronice în interiorul unui singur fluorofor după excitație [38, 39], determinând deplasări spectrale sensibile la mediul înconjurător. Dintre aceste căi de transducție, FRET rămâne unul dintre cele mai eficiente și larg utilizate mecanisme, în principal deoarece oferă o relație directă, cantitativă și predictibilă între semnalul obținut și separarea nanometrică donor-acceptor. Astfel, FRET permite o detecție foarte sensibilă,

reducerea interferențelor de fond și o reproductibilitate mai bună în medii complexe de biosensing [40, 41]. Prin urmare, sistemele bazate pe FRET au fost implementate pe scară largă în platforme de biosensing pentru detecția microorganismelor patogene, proteinelor, genelor specifice, secvențelor nucleotidice și moleculelor mici [34, 35, 40-42]. În astfel de platforme, selecția fluoroforului este decisivă, deoarece combinațiile de complecși metal-ligand, puncte cuantice și coloranți organici oferă avantaje distincte în ceea ce privește fotostabilitatea, eficiența emisiei și versatilitatea spectrală, rezultate din diferențele dintre căile de relaxare ale stării excitate [43, 44]. Deși fluoroforii metal-ligand și punctele cuantice oferă luminozitate ridicată, posibilitatea de ajustare a emisiei în funcție de compoziție și dimensiune, precum și fotostabilitate îmbunătățită [45-48]; utilizarea lor practică este limitată de rutele complexe de sinteză, toxicitatea potențială asociată componentelor metalice, fenomenul de blinking fluorescent, stingerea dependentă de suprafață și de mediu, precum și dificultățile de obținere a unei bioconjugări reproductibile și a unei stabilități coloidale pe termen lung [45-50]. În mediile biologice, aceste limitări pot afecta fiabilitatea semnalului și pot împiedica interpretarea cantitativă, în ciuda performanței optice avantajoase. Prin urmare, fluoroforii organici sunt printre cele mai utilizate și fiabile sonde, oferind luminescență bine caracterizată, funcționalizare chimică facilă, biocompatibilitate predictibilă și caracteristici uniforme de emisie, care facilitează detecția și imagistica robustă și cantitativă în diverse platforme experimentale [51, 52]. În cadrul acestei clase, fluoresceina are un rol central printre fluoroforii organici utilizați pe scară largă, fiind unul dintre cei mai studiați și mai folosiți coloranți datorită absorptivității molare ridicate, randamentului cuantic mare al fluorescenței în medii apoase și proprietăților fotofizice bine definite [53, 54]. Excitația și emisia sa bine definite, luminozitatea puternică la pH fiziologic și posibilitatea de modificare structurală facilă au permis proiectarea atentă a unei game largi de sonde pentru ioni metalici, precum Mg^{2+} și Mn^{2+} , molecule mici și ținte biologice. În același timp, răspunsul predictibil la mediu, precum sensibilitatea la pH și căile PET sau FRET controlabile, contribuie la asigurarea unei transducții fiabile a semnalului în medii biologice complexe [53-55].

În biosenzorii fluorescenți, atât proprietățile fluoroforului, cât și comportamentul său de stingere sunt importante, deoarece stingerea controlată a fluorescenței este esențială pentru transducția semnalului, suprimarea fondului și îmbunătățirea sensibilității. Stingerea fluorescenței se referă la reducerea intensității emisiei prin procese neradiative de transfer de energie sau de electroni, care apar în urma interacțiunii cu un quencher și modifică astfel căile de dezactivare ale stării excitate [56]. În consecință, o gamă largă de quencheri a fost integrată în aplicații de biosensing fluorescent, inclusiv ioni metalici, oxizi metalici, cadre metal-organice, MOFs, cadre

organice covalente, COFs, și nanomateriale pe bază de carbon, datorită eficienței acestora în reglarea răspunsurilor fluorescente [57-60]. În cadrul acestui grup, nanomaterialele pe bază de carbon, incluzând grafena, derivații grafenici și nanotuburile de carbon, CNTs, s-au impus ca quencheri foarte eficienți datorită absorbției largi, stingerii pronunțate dependente de distanță, suprafeței specifice mari și cuplării electronice puternice cu fluoroforii [60, 61]. Aceste caracteristici facilitează adsorbția eficientă a oligonucleotidelor și a altor sonde, favorizează proximitatea necesară dintre fluorofor și suprafață pentru stingerea fluorescenței și susțin modularea fiabilă a semnalului. Aceste proprietăți au condus la utilizarea extinsă a nanomaterialelor pe bază de grafenă în biosenzorii fluorescenți, în special pentru aplicații de detecție a acidului dezoxiribonucleic, ADN [62].

ADN-ul monocatenar este un oligonucleotid alcătuit dintr-un singur lanț, care permite recunoaștere moleculară foarte selectivă și analiză genetică sensibilă, având un rol central în monitorizarea proceselor biologice și regenerative. Fiabilitatea sa depinde însă de metode de extracție și detecție capabile să păstreze puritatea și integritatea secvenței. Izolarea și detecția eficientă a ssDNA sunt esențiale, deoarece identificarea specifică secvenței, asamblarea determinată de hibridizare și procesele de transducție a semnalului depind fundamental de integritatea acizilor nucleici. Prin urmare, variațiile de randament, puritate, distribuție a lungimii și stare conformațională influențează direct sensibilitatea detecției, fiabilitatea cantitativă și performanța funcțională în sisteme diagnostice, de biosensing și regenerative. În ciuda importanței sale, extracția ssDNA rămâne dificilă, deoarece metodele actuale de extracție, precum coloanele de silice, particulele magnetice sau extracția enzimatică, se bazează adesea pe procese chimice sau fizice în mai multe etape, afectate de recuperare redusă, susceptibilitate la degradare și co-extracția inhibitorilor sau contaminanților. În același timp, compromisurile dependente de metodă între puritate, eficiență, cost și reproductibilitate continuă să limiteze standardizarea între aplicații [63, 64].

Această teză abordează aceste limitări printr-o strategie de transducție optică, identificată prin evaluarea comparativă a abordărilor electrochimice și optice de biosensing ca fiind cadrul cel mai adecvat pentru extracția și detecția oligonucleotidelor din medii complexe. Pe această bază, teza combină detecția bazată pe fluorescență a oligonucleotidelor scurte cu derivați grafenici, CNTs și membrane de nitroceluloză, NC, ca suporturi solide, pentru a permite izolarea eficientă a ssDNA și măsurători optice. Utilizarea acestor materiale în combinație derivă din sinergia dintre membranele de NC și materialele pe bază de carbon, determinată de proprietățile lor fizico-chimice complementare. NC oferă o capacitate ridicată de legare și interacțiuni electrostatice puternice cu

ADN-ul monocatenar, facilitând adsorbția și izolarea eficientă, în timp ce derivații grafenici îmbunătățesc funcționalitatea suprafeței și eficiența captării, acționând simultan ca quencheri fluorescenți eficienți. Acest proces este guvernat de adsorbția la distanță mică pe suprafață și de transferul interfacial de electroni, determinând stingerea eficientă a semnalului și îmbunătățirea contrastului analitic, contribuind totodată la reducerea degradării membranei și la creșterea stabilității în condiții biologice complexe.

Stadiul actual al cercetării

Una dintre principalele contribuții ale acestei teze la stadiul actual al cercetării constă în integrarea derivaților grafenici și a nanotuburilor de carbon, CNTs, cu membrane de nitroceluloză, NC, pentru dezvoltarea unor platforme optice sensibile destinate extracției oligonucleotidelor scurte și detecției bazate pe fluorescență. Deși nanomaterialele pe bază de carbon sunt studiate pe larg în biosenzori, iar membranele de NC sunt utilizate frecvent ca suporturi solide în teste analitice, integrarea acestora într-o singură platformă destinată atât extracției, cât și detecției optice a oligonucleotidelor scurte rămâne limitată. Majoritatea studiilor au abordat fie proprietățile de stingere fluorescentă ale nanomaterialelor pe bază de carbon, fie tehnicile de separare bazate pe membrane de NC, ca strategii independente.

Mai mult, deși abordările optice bazate pe fluorescență, care utilizează fluorofori precum fluoresceina în combinație cu derivați grafenici sau CNTs ca quencheri, au fost raportate anterior, integrarea acestora cu membrane de NC, împreună cu influența mediilor ionice complexe și a variației pH-ului asupra eficienței de adsorbție-desorbție a oligonucleotidelor scurte și asupra răspunsului fluorescent, nu a fost investigată în mod cuprinzător. În particular, influența ionilor divalenți, precum Mg^{2+} și Mn^{2+} , asupra interacțiunilor de suprafață ale oligonucleotidelor și asupra modulării semnalului rămâne insuficient studiată în contextul platformelor de extracție și detecție în fază solidă. Din cunoștințele noastre, având în vedere că studiile asociate obiectivului principal al acestei teze acoperă perioada 2023-2025, pe baza anilor de publicare, nu au fost raportate anterior studii în domeniul biosenzorilor care să investigheze această combinație de metode și materiale pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte.

Prezenta teză pornește de la aceste lacune existente în domeniul biosenzorilor pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte și propune dezvoltarea etapizată a unor platforme optice de detecție fluorescentă, pornind de la o platformă bazată pe membrane de NC modificate cu oxid de grafenă, GO, și ajungând la o platformă mai complexă, bazată pe oxid de grafenă redus funcționalizat cu amino-polietilenglicol, NH_2 -PEG-rGO, și nanotuburi de carbon cu un singur perete, SWCNTs. Această abordare permite nu doar evaluarea contribuției individuale a fiecărui

material, ci și investigarea efectelor complementare ale acestora, împreună cu influența componentelor mediului ionic complex, asupra performanței de extracție și detecției fluorescente a oligonucleotidelor scurte.

În acest context, teza oferă o perspectivă integrată asupra modului în care complementaritatea compoziției materialelor, chimia suprafeței, pH-ul și ionii influențează împreună performanța biosenzorului, contribuind la dezvoltarea unor platforme optice simple, cu cost redus și fiabile pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte în sisteme biologice complexe.

Obiectivele generale și specifice ale tezei

Pornind de la considerațiile și lacunele identificate în subcapitolul anterior, obiectivul general al acestei teze constă în investigarea modului în care derivații pe bază de grafenă și nanotuburile de carbon pot fi utilizați pentru modificarea membranelor de nitroceluloză, ca abordare nouă pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte din medii ionice complexe. În același timp, teza urmărește evaluarea rolului compoziției materialului, al modificării de suprafață și al complexității mediului în modularea performanței analitice a platformei.

Pentru atingerea acestui obiectiv, teza a fost structurată în jurul a trei obiective secundare:

Primul obiectiv: Dezvoltarea și evaluarea platformei NC modificate cu GO pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv, a fost fabricată mai întâi o platformă optică de referință prin modificarea membranelor de NC cu GO, urmată de evaluarea performanței de extracție și a răspunsului fluorescent în condiții experimentale relevante, conform activităților prezentate mai jos:

- A1.** Fabricarea platformei NC modificate cu GO.
- A2.** Caracterizarea fizico-chimică a platformei obținute prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, FTIR, microscopie electronică de baleiaj, SEM, și analiză de umectabilitate.
- A3.** Evaluarea performanței de extracție utilizând ssDNA marcat fluorescent, ≤ 50 nt, ca oligonucleotid țintă, în medii apoase și complexe, incluzând Alpha Minimum Essential Medium, α MEM, și α MEM suplimentat cu ser fetal bovin, FBS, la pH fiziologic, $\approx 7,0$, pentru diferite intervale de incubare, 30, 45 și 60 de minute.
- A4.** Investigarea procesului de desorbție în condiții alcaline, utilizând tampon Tris-HCl, pH $\approx 8,0$, pentru eliberarea oligonucleotidelor și detecția bazată pe fluorescență.

A5. Dezvoltarea și validarea unei ecuații pentru conversia intensității fluorescenței, r.f.u., în masă de oligonucleotid, pg, pe baza calibrării cu concentrații cunoscute de ssDNA marcat fluorescent.

A6. Identificarea condițiilor optime de lucru prin analiza influenței timpului de incubare, compoziției mediului și pH-ului asupra eficienței extracției și răspunsului fluorescent.

Al doilea obiectiv: Îmbunătățirea stabilității și eficienței platformei optice pentru extracția și detecția oligonucleotidelor prin modificarea membranelor de NC cu NH₂-PEG-rGO și optimizarea condițiilor mediului ionic.

Pornind de la obiectivul anterior, această etapă s-a concentrat pe creșterea stabilității și eficienței platformei optice prin modificarea membranelor de NC cu NH₂-PEG-rGO și prin optimizarea soluțiilor complexe prin controlul mediului ionic. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv, au fost realizate următoarele activități:

A1. Fabricarea platformei NC modificate cu NH₂-PEG-rGO.

A2. Investigarea influenței NH₂-PEG-rGO asupra modificării membranei de NC prin analize structurale, morfologice și de umectabilitate.

A3. Suplimentarea mediilor complexe optimizate, identificate în primul obiectiv, cu diferiți ioni divalenți, Mg²⁺ și Mn²⁺, urmată de evaluarea performanței de extracție a oligonucleotidelor pe platforma obținută, după 60 de minute de incubare.

A4. Analiza efectului compoziției și tăriei ionice a mediilor complexe asupra răspunsului fluorescent al platformei optice și corelarea acestuia cu performanța de extracție.

Al treilea obiectiv: Integrarea SWCNTs împreună cu NH₂-PEG-rGO pentru modificarea membranelor de NC, în vederea îmbunătățirii stabilității în mediu apos, a performanței de extracție și a răspunsului fluorescent.

În continuarea optimizării obținute în obiectivul anterior, al treilea obiectiv secundar introduce SWCNTs împreună cu NH₂-PEG-rGO ca element suplimentar de modificare a membranelor de NC, cu scopul de a îmbunătăți stabilitatea în mediu apos, performanța de extracție și răspunsul fluorescent prin efecte complementare de adsorbție și quenching. Pentru atingerea acestui obiectiv, au fost realizate următoarele activități:

A1. Fabricarea platformei optice bazate pe membrane de NC modificate cu o combinație de NH₂-PEG-rGO și SWCNTs.

A2. Investigarea structurală și fizico-chimică a platformei optice obținute prin FTIR, spectroscopie Raman, spectroscopie de fotoelectroni de raze X, XPS, SEM și analiză de umectabilitate.

- A3.** Investigarea performanței platformei optice după incubarea în medii ionice complexe, obținute în cadrul celui de-al doilea obiectiv, cu accent pe interacțiunile oligonucleotid-suprafață și eficiența extracției.
- A4.** Evaluarea generării și modulării semnalului fluorescent după incubarea platformei optice obținute în medii ionice complexe, cu accent pe intensitatea semnalului, eficiența quenchingului și corelarea acestora cu performanța de extracție.

Concluzii generale

eniul biosenzorilor, în special în contextul analizei acizilor nucleici, a evoluat semnificativ în ultimii ani. Cu toate acestea, extracția și detecția eficientă a oligonucleotidelor scurte din medii biologice complexe rămân limitate din cauza abundenței reduse și a susceptibilității crescute la degradare în probe biologice. În ciuda acestor limitări, rezultatele obținute în această teză demonstrează că cercetările ulterioare în această direcție sunt justificate, având în vedere potențialul de îmbunătățire a performanței analitice și de dezvoltare a unor platforme de biosensing mai rapide, sensibile și fiabile.

Obiectivul principal al acestei teze a propus o abordare nouă, prin investigarea modului în care derivații pe bază de grafenă și nanotuburile de carbon pot fi utilizați pentru modificarea membranelor de NC, în vederea extracției și detecției fluorescente a oligonucleotidelor scurte din medii ionice complexe. În același timp, a fost analizată influența compoziției materialului, a modificării de suprafață și a complexității condițiilor ionice asupra performanței analitice a platformei. Acest obiectiv a fost structurat în trei obiective secundare, fiecare contribuind la optimizarea progresivă a platformei și la o înțelegere mai profundă a relației dintre proprietățile materialului, interacțiunile interfaciale și performanța analitică.

Primul obiectiv a vizat dezvoltarea unei platforme NC modificate cu GO pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Fabricarea cu succes a membranei NC modificate cu GO a fost confirmată prin analize FTIR, SEM și de umectabilitate, care au evidențiat modificări ale chimiei de suprafață și ale morfologiei. Aceste modificări s-au tradus printr-o stabilitate îmbunătățită și prin interacțiuni mai eficiente între membrană și oligonucleotide, favorizând adsorbția și detecția ulterioară. Performanța de extracție a platformei dezvoltate a fost evaluată utilizând probe de ssDNA marcate fluorescent, incubate în trei soluții complexe la pH 7, pe bază de H₂O, α MEM și α MEM suplimentat cu FBS, pentru diferite perioade de incubare, 30, 45 și 60 de minute. ssDNA marcat fluorescent a fost apoi detectat prin incubarea membranelor într-o

soluție de desorbție la pH 8,0, permițând eliberarea oligonucleotidelor din platforma obținută într-o soluție adecvată pentru analiza fluorescentă.

După conversia rezultatelor de fluorescență în unități cantitative, datele au arătat că, dintre mediile testate, mediul care conține α MEM a oferit cele mai favorabile condiții, evidențiind importanța compoziției mediului în modularea interacțiunilor dintre acizii nucleici și suprafață. În plus, influența timpului de incubare a fost clar demonstrată, performanța optimă fiind obținută după 60 de minute, ceea ce indică rolul esențial al cineticii de adsorbție în determinarea eficienței extracției. Comparativ cu membrana de nitroceluloză nemodificată, care a prezentat o capacitate limitată de imobilizare, reflectată prin semnale fluorescente reduse, 106,5 r.f.u., corespunzătoare unei mase de 124,3 pg după 30 de minute în α MEM + FBS, membrana NC modificată cu GO a arătat o îmbunătățire substanțială, atingând un semnal fluorescent maxim de 294,4 r.f.u. după 60 de minute de adsorbție a FAM-ssDNA în α MEM, corespunzător unei mase de 343,6 pg de oligonucleotid recuperat. Rezultatele au demonstrat că eficiența extracției și răspunsurile fluorescente sunt puternic influențate atât de modificarea suprafeței membranei de NC cu GO, cât și de condițiile experimentale, în special timpul de incubare și compoziția mediului.

Al doilea obiectiv a urmărit investigarea influenței chimiei de suprafață asupra extracției și detecției oligonucleotidelor prin modificarea membranelor de NC cu NH_2 -PEG-rGO. Fabricarea cu succes a membranei NC modificate cu NH_2 -PEG-rGO a fost confirmată prin caracterizare fizico-chimică complexă, incluzând FTIR, SEM și analiză de umectabilitate, care au evidențiat formarea unui strat uniform și tranziția către un comportament de suprafață mai hidrofob. Platforma dezvoltată a fost evaluată în condițiile optimizate stabilite în obiectivul anterior, cu accent pe rolul condițiilor ionice din mediile complexe. Rezultatele au demonstrat că atât compoziția mediului, cât și natura ionilor divalenți influențează semnificativ imobilizarea oligonucleotidelor și răspunsul fluorescent. Dintre condițiile testate, mediile care conțin MgCl_2 au oferit cel mai favorabil mediu, determinând o creștere substanțială a eficienței extracției comparativ cu membrana NC nemodificată.

Cantitativ, în timp ce membrana NC nemodificată a prezentat o capacitate limitată de adsorbție, cu valori ale fluorescenței de aproximativ 250 r.f.u., corespunzătoare unei mase de aproximativ 286 pg ssDNA, membrana NC modificată cu NH_2 -PEG-rGO a prezentat o performanță net îmbunătățită, atingând intensități fluorescente de peste 520 r.f.u., corespunzătoare unei mase de aproximativ 611 pg de ssDNA extras în aceleași condiții. Această îmbunătățire a evidențiat efectul sinergic al funcționalizării suprafeței și al mediului ionic în promovarea unor interacțiuni mai puternice între ssDNA și suprafață. În ansamblu, acest obiectiv a demonstrat că

funcționalizarea membranei de NC cu NH₂-PEG-rGO, împreună cu modularea compoziției ionice, oferă o abordare eficientă pentru îmbunătățirea extracției oligonucleotidelor scurte și a răspunsului fluorescent, permițând dezvoltarea unei platforme optice îmbunătățite.

Al treilea obiectiv a urmărit îmbunătățirea suplimentară a performanței analitice a platformei dezvoltate prin modificarea membranelor de NC cu SWCNTs și NH₂-PEG-rGO, cu scopul de a investiga proprietățile complementare de adsorbție și de quenching fluorescent ale acestor nanomateriale pe bază de carbon. Fabricarea cu succes a membranei NC modificate cu SWCNTs/NH₂-PEG-rGO a fost confirmată prin caracterizare fizico-chimică și structurală complexă, incluzând FTIR, spectroscopie Raman, XPS, SEM și analiză de umectabilitate, care au evidențiat formarea unei suprafețe mai uniforme, creșterea hidrofobicității și modificări interfaciale semnificative. Platforma dezvoltată a fost evaluată în aceleași condiții optimizate de adsorbție și desorbție stabilite în obiectivele anterioare, cu accent pe efectul mediilor ionice complexe.

Rezultatele au demonstrat că ionii divalenți au un rol critic în modularea interacțiunilor de suprafață ale ssDNA, mediul care conține MgCl₂ oferind cele mai favorabile condiții pentru imobilizarea oligonucleotidelor și răspunsul fluorescent. Comparativ cu membrana NC nemodificată, care a prezentat valori ale fluorescenței în intervalul 245-265 r.f.u., corespunzătoare unei mase de 290-320 pg, membrana NC modificată cu SWCNTs/NH₂-PEG-rGO a arătat o performanță substanțial îmbunătățită, atingând 420 r.f.u., 490 pg, în MnCl₂, 510 r.f.u., 590 pg, în MnCl₂/MgCl₂, și până la 670 r.f.u., 780 pg, în mediul care conține MgCl₂. Aceste rezultate au evidențiat efectul sinergic dintre SWCNTs și NH₂-PEG-rGO, în care suprafața specifică crescută, stabilitatea structurală îmbunătățită și interacțiunile electronice intensificate contribuie la o adsorbție mai puternică a ssDNA și la o modulare mai eficientă a semnalului fluorescent. Astfel, acest obiectiv a demonstrat că complementaritatea dintre SWCNTs și NH₂-PEG-rGO în modificarea membranelor de NC, împreună cu complexitatea mediului ionic, reprezintă o strategie eficientă pentru îmbunătățirea extracției și detecției oligonucleotidelor scurte, permițând dezvoltarea unor platforme avansate de biosensing optic cu performanță analitică superioară.

În ansamblu, această teză demonstrează impactul semnificativ al nanomaterialelor pe bază de grafenă și al CNTs asupra dezvoltării unor platforme optice avansate pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Prin proiectarea sistematică a platformelor optice bazate pe GO, NH₂-PEG-rGO și SWCNTs, această teză contribuie la domeniul biosenzorilor prin furnizarea unor dovezi experimentale coerente care arată că modificarea suprafeței membranei de NC, în corelație directă cu complementaritatea materialelor și complexitatea mediului ionic,

controlează stabilitatea platformei, eficiența imobilizării acizilor nucleici scurți și modularea semnalului fluorescent.

Mai mult, rezultatele obținute pe parcursul acestei teze susțin dezvoltarea unor platforme de biosensing simple, cu cost redus și scalabile, cu performanță analitică îmbunătățită, oferind o alternativă viabilă la metodele actuale de extracție a acizilor nucleici. Aceste metode sunt adesea limitate de proceduri în mai multe etape, necesitatea echipamentelor specializate, costurile operaționale mai ridicate și riscul de pierdere sau contaminare a probei, în special în cazul manipulării oligonucleotidelor scurte. În același timp, teza propune o abordare nouă, care depășește stadiul actual al cercetării prin integrarea derivaților grafenici și a CNTs cu membrane de NC într-o singură platformă capabilă atât de extracția, cât și de detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Aceasta examinează sistematic modul în care chimia suprafeței și complexitatea mediului ionic, în special ionii divalenți precum Mg^{2+} și Mn^{2+} , influențează procesele de adsorbție-desorbție și răspunsul fluorescent. Rezultatele favorabile obținute în cadrul tuturor obiectivelor acestei teze subliniază relevanța continuării cercetărilor în această direcție, cu potențial clar de avansare a tehnologiilor de biosensing optic și de facilitare a integrării acestora în aplicații practice de diagnostic și point-of-care.

Contribuții originale

Acest capitol sintetizează principalele contribuții originale rezultate din cercetarea realizată în cadrul acestei teze de doctorat, corelate cu fiecare lucrare științifică, reflectând totodată activitatea generală de cercetare desfășurată de doctorand pe parcursul programului doctoral.

Pentru început, prima lucrare, abordată în Capitolul 3,

1. *“Hibrid necovalent oxid de grafenă/nitroceluloză ca fază solidă pentru extracția oligo-ADN din medii complexe”*,

corespunzătoare primului obiectiv de cercetare al acestei teze, prima lucrare se concentrează pe dezvoltarea și investigarea unei membrane de NC modificate cu GO, utilizată pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Teza introduce o abordare nouă, diferită de strategiile convenționale, prin integrarea modificării suprafeței membranei de NC cu proprietățile intrinseci de adsorbție și de quenching fluorescent ale derivaților grafenici. Din cunoștințele noastre, această abordare nu a fost explorată anterior în domeniul biosenzorilor pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte.

O primă contribuție importantă a acestui studiu constă în caracterizarea fizico-chimică detaliată a membranei de NC modificate cu GO, prin care autorii oferă o înțelegere mai profundă a modificărilor structurale, morfologice și interfaciale, precum și a modului în care derivații grafenici influențează stabilitatea și performanța platformei. O a doua contribuție constă în dezvoltarea unui protocol experimental pentru adsorbția, extracția și detecția oligonucleotidelor scurte din soluții complexe. Aceste soluții au fost preparate utilizând trei medii de legare, pe bază de H₂O, α MEM și α MEM suplimentat cu FBS. Fiecare mediu a fost preparat în condiții controlate și a conținut FAM-ssDNA ca oligonucleotid țintă, SDS, BSA, NaCl și Tris-HCl la pH 7,0, asigurând un mediu ionic și molecular relevant biologic pentru adsorbția oligonucleotidelor.

După desorbția membranei de NC modificate cu GO în Tris-HCl, pH 8,0, și analiza fluorescentă ulterioară a soluției, studiul a stabilit că o perioadă de incubare de 60 de minute în mediul complex care conține α MEM este optimă pentru obținerea unei extracții eficiente și a unei detecții sensibile. O altă contribuție importantă constă în dezvoltarea unei metode de conversie a intensității fluorescenței, exprimată în r.f.u., în masă de oligonucleotid, exprimată în pg, pe baza calibrării cu concentrații cunoscute de ssDNA marcat fluorescent.

În ansamblu, acest studiu contribuie la domeniul biosenzorilor prin introducerea unei noi abordări bazate pe o platformă de NC modificată cu GO pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. În același timp, studiul propune un protocol experimental pentru adsorbție, desorbție și detecție, precum și o metodă de conversie a intensității fluorescenței în masă de oligonucleotid. Această contribuție este importantă deoarece permite identificarea parametrilor optimi de lucru și stabilește o bază solidă pentru dezvoltarea și optimizarea ulterioară a unor platforme optice avansate în biosenzori pentru extracția și detecția oligonucleotidelor scurte.

Pornind de la aceste rezultate, al doilea studiu, prezentat în Capitolul 4 și publicat ca:

2. *“Extracția oligo-ADN din medii complexe în fază solidă utilizând o membrană hibridă grafenă aminată/nitroceluloză”*

avansează proiectarea platformei prin modificarea membranelor de NC cu NH₂-PEG-rGO, introducând o chimie de suprafață mai bine controlată, care permite interacțiuni îmbunătățite cu oligonucleotidele scurte în condiții ionice complexe. Contribuția acestui studiu constă în demonstrarea faptului că performanța platformei pentru extracția oligonucleotidelor și detecția fluorescentă depinde atât de modificarea membranei de NC, cât și de compoziția ionică a mediului de legare.

Rezultatele acestui studiu au arătat că modificarea cu $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$ a produs schimbări morfologice și interfaciale clare, confirmate prin FTIR, SEM și analiză de umectabilitate, incluzând îmbunătățirea stabilității membranei și creșterea semnificativă a hidrofobicității suprafeței, factori care pot influența interacțiunile dintre oligonucleotide și membrană. Utilizând condițiile optimizate în studiul anterior, membranele modificate au fost evaluate ulterior în medii suplimentate cu ioni Mg^{2+} și Mn^{2+} . Rezultatele au arătat că ionii divalenți au un rol important în imobilizarea oligonucleotidelor și în răspunsul fluorescent, mediile care conțin Mg^{2+} oferind cele mai favorabile condiții pentru îmbunătățirea extracției și detecției fluorescente a oligonucleotidelor scurte.

Din cunoștințele autorilor, modificarea membranelor de NC cu $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$, împreună cu implementarea unor condiții ionice de legare adaptate pentru modularea mecanismelor de adsorbție-desorbție a oligonucleotidelor și a răspunsului fluorescent, nu a fost explorată anterior în cadrul unei singure platforme de extracție în fază solidă. Astfel, analiza combinată a modificării de suprafață și a efectelor ionice oferă o perspectivă mecanistică mai clară asupra interacțiunilor interfaciale, reprezentând un pas important către optimizarea rațională a platformelor optice de biosensing.

Extinzând aceste rezultate, al treilea studiu, prezentat în Capitolul 5 și publicat ca:

3. *“Extracția eficientă în fază solidă a oligo-ADN din medii complexe utilizând o membrană de nitroceluloză modificată cu nanotuburi de carbon și oxid de grafenă redus aminat”*

avansează suplimentar proiectarea platformei prin utilizarea combinată a $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$ și SWCNTs, demonstrând că proprietățile complementare de adsorbție și de quenching fluorescent ale acestor nanomateriale pe bază de carbon îmbunătățesc atât eficiența extracției, cât și detecția bazată pe fluorescență.

Rezultatele acestui studiu au arătat că platforma obținută a prezentat o stabilitate îmbunătățită în medii complexe, împreună cu o suprafață uniformă, hidrofobicitate crescută și modificări interfaciale semnificative. Aceste caracteristici au fost corelate cu un comportament funcțional îmbunătățit al platformei comparativ cu sistemele dezvoltate anterior, susținând o capacitate mai mare de extracție și un răspuns fluorescent mai intens. În același timp, mediile care conțin Mg^{2+} au oferit cel mai favorabil mediu ionic pentru promovarea interacțiunilor dintre oligonucleotide și suprafață și pentru îmbunătățirea eficienței analitice generale.

Din cunoștințele autorilor, utilizarea combinată a SWCNTs și $\text{NH}_2\text{-PEG-rGO}$ pentru modificarea membranelor de NC, împreună cu incubarea controlată în medii ionice complexe, nu

a fost investigată anterior în domeniul biosenzorilor pentru extracția oligonucleotidelor scurte. Această abordare nouă oferă o perspectivă mai clară asupra modului în care complementaritatea dintre compoziția materialului, structura interfacială și complexitatea mediului ionic controlează performanța platformei și stabilește o bază solidă pentru optimizarea ulterioară a unor platforme optice de detecție cu performanță ridicată.

Perspective

Rezultatele obținute în această teză demonstrează că platformele optice sensibile bazate pe derivați grafenici și CNTs, dezvoltate prin modificarea suprafeței membranelor de NC și prin ajustarea atentă a mediului ionic complex, reprezintă o abordare viabilă pentru extracția și detecția fluorescentă a oligonucleotidelor scurte. Cu toate acestea, mai multe direcții rămân deschise pentru investigații și optimizări ulterioare, în special în ceea ce privește îmbunătățirea robusteții analitice, selectivității și aplicabilității practice.

O primă perspectivă importantă vizează rafinarea designului interfacial la scară nanometrică, cu accent pe obținerea unei chimii de suprafață mai controlate și mai reproductibile. Deși prezenta lucrare evidențiază rolul derivaților grafenici și al CNTs în îmbunătățirea adsorbției și modulării fluorescenței, sunt necesare studii suplimentare pentru un control mai bun al heterogenității suprafeței și al distribuției situsurilor de legare. Acest aspect este esențial pentru îmbunătățirea reproductibilității și reducerea variabilității în medii biologice complexe, unde interacțiunile nespecifice și efectele de matrice rămân limitări importante.

O altă direcție relevantă implică integrarea mai profundă a mecanismelor fotofizice în proiectarea platformei. Rezultatele acestei teze, împreună cu progresele recente din domeniul biosenzorilor fluorescenți, indică faptul că performanța analitică este guvernată de acțiunea combinată a mai multor procese, incluzând FRET, PET și interacțiuni de transfer de sarcină. Studiile viitoare ar trebui să urmărească proiectarea unor platforme în care aceste mecanisme să nu fie doar exploatate, ci controlate deliberat, pentru obținerea unor răspunsuri de semnal mai predictibile și ajustabile. O astfel de abordare ar permite trecerea de la optimizarea empirică la strategii de proiectare ghidate mecanistic.

Optimizarea mediilor ionice și a condițiilor de legare reprezintă, de asemenea, o direcție critică pentru cercetările viitoare. Rezultatele prezentate în această teză demonstrează clar influența ionilor divalenți, în special Mg^{2+} , asupra adsorbției oligonucleotidelor și asupra răspunsului fluorescent. Extinderea acestei investigații către sisteme mai complexe și mai relevante fiziologic, precum fluidele biologice, ar permite o evaluare mai realistă a performanței

platformei. În acest context, utilizarea mediilor biologice simulate ar trebui completată prin validare în probe clinice.

Din perspectivă tehnologică, o direcție importantă este integrarea platformelor dezvoltate în sisteme miniaturizate și portabile. Așa cum este evidențiat de progresele recente în biosensingul optic, există un interes tot mai mare pentru dispozitive point-of-care, arhitecturi microfluidice și sisteme de detecție bazate pe smartphone. Eficiența în imobilizarea biomoleculelor, împreună cu simplitatea și costul redus al platformelor pe bază de NC dezvoltate în această teză, le recomandă ca posibili candidați pentru astfel de integrări. Cercetările viitoare se pot concentra pe cuplarea acestor materiale cu canale microfluidice, module de citire optică sau sisteme de imagistică digitală, permițând analiza în timp real și la locul de interes.

În paralel, incorporarea abordărilor bazate pe date și a inteligenței artificiale, AI, reprezintă o direcție promițătoare pentru îmbunătățirea performanței analitice. Algoritmii de învățare automată pot fi utilizați pentru procesarea semnalului, deconvoluția spectrală și recunoașterea tiparelor, în special în seturi complexe de date afectate de zgomot, fluorescență de fond sau semnale suprapuse. Mai mult, strategiile de proiectare asistate de AI ar putea accelera selecția combinațiilor optime de materiale și a condițiilor de lucru, reducând numărul experimentelor bazate pe încercare și eroare.

O altă perspectivă importantă se referă la îmbunătățirea stabilității pe termen lung și a robusteții platformelor de detecție. Probleme precum fotodegradarea fluoroforilor, deriva semnalului și degradarea materialului rămân relevante, mai ales pentru măsurători repetate sau utilizare prelungită. Prin urmare, cercetările viitoare ar trebui să vizeze stabilizarea semnalelor fluorescente și dezvoltarea unor modificări de suprafață mai durabile, posibil prin strategii de funcționalizare covalentă sau prin utilizarea unor acoperiri protectoare.

În final, o direcție importantă pentru cercetările viitoare este extinderea platformei către aplicații analitice mai largi. Deși această teză se concentrează pe extracția și detecția oligonucleotidelor scurte, principiile care stau la baza platformei pot fi adaptate pentru detecția altor biomolecule, incluzând microARN, proteine sau metaboliți mici. Această versatilitate deschide posibilitatea dezvoltării unor platforme de detecție multiplexată, capabile să răspundă unor nevoi diagnostice complexe în contexte biomedicale și de mediu.

Lista publicațiilor și participarea la conferințe științifice

Această teză de doctorat se bazează pe următoarele articole științifice publicate pe parcursul programului doctoral, cu un factor de impact cumulat de 13,2.

Lista publicațiilor incluse în teză.

1. **Toader G.A.**, Nitu F.R., Ionita M., *Graphene Oxide/Nitrocellulose Non-Covalent Hybrid as Solid Phase for Oligo-DNA Extraction from Complex Medium*; *Molecules*, Volum 28; Pages 4599-4612; [10.3390/molecules28124599](https://doi.org/10.3390/molecules28124599); 2023; Impact factor 4.2.

2. Chiticaru E.A., **Toader G.A.**, Ionita M., *Towards Point-Of-Care Medical Applications Using Electrochemical Biosensor*; University Politehnica of Bucharest, Scientific Bulletin, Series B-Chemistry and Materials Science; Volum 86; Pages 59-70; 2024; Impact factor 0.3.

3. **Toader G.A.**, Titus G.V., Ionita M., *Solid Phase Oligo-DNA Extraction from Complex Medium Using an Aminated Graphene/Nitrocellulose Membrane Hybrid*, *Biomolecules* (14), no. 3: 366, <https://doi.org/10.3390/biom14030366>; 2024; Impact factor 4.8.

4. **Toader, G.A.**, Mihalache, D.I., Grigorean, V.T., Chiticaru E.A., Pandele M.A., M. Ionita., *Efficient Solid-Phase Extraction of Oligo-DNA from Complex Media Using a Nitrocellulose Membrane Modified with Carbon Nanotubes and Aminated reduced Graphene Oxide*; *Scientific reports* 15, 5325, <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89705-7>; 2025; Impact factor 3.9.

Alte publicații care nu sunt incluse în teză:

1. **Toader G.A.**, Vlasceanu G.M., Serafim A., Banciu A., Ionita M.; *Double-Reinforced Fish Gelatin Composite Scaffolds for Osteochondral Substitutes*; *Materials*; Volum 16; Pagini 1815-1833; <https://doi.org/10.3390/ma16051815>; 2023; Impact factor 3.1.

2. Ionita M., Vlăsceanu G.M., **Toader G.A.**, Manole M., *Advances in Therapeutic Contact Lenses for the Management of Different Ocular Conditions*, *Journal of Personalized Medicine* (13), no. 11: 1571. <https://doi.org/10.3390/jpm13111571>, 2023, Impact factor 3.

3. Cojocaru E., Oprea M., Vlasceanu G.M., Nicolae M.C., Popescu R.C., Mereuta P.E., **Toader G.A.**, Ioniță M., *Dual Nanofiber and Graphene Reinforcement of 3D Printed Biomimetic*

Supports for Bone Tissue Repair, RSC advances, 14(44), 32517-32532., DOI: <https://doi.org/10.1039/D4RA06167E>; 2024, Impact factor 3.9.

4. Dobrisan M.R., **Toader G.A.**, Chiticaru A.E, Vlasceanu G.M., Popescu R.C., Nicoara A.I., Podaru A.I., Toader G., Rotariu T., Ionita M., *Nanostructured Gelatin-Gellan Inks Double Reinforced with Cellulose Nanofibrils and Graphene Derivatives for 3D Printing in Bone Regeneration Applications*; Materials Today Advances; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2025.1006211>, 2025, Impact factor 8.0.

5. Cojocaru E., Chiticaru E.A., Vlasceanu G.M., Nicolae M.C., Popescu R.C., Dobrisan M.R., **Toader G.A.**, Ionita M., *3D Printing of Multicomponent Polymeric Inks Enables Hierarchical Hybrid Architectures for Bone Tissue Regeneration*; Materials Today Advances. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2025.100683>, 2025, Impact factor 8.0.

Rezultatele obținute pe parcursul acestui program au fost diseminate în cadrul următoarelor conferințe naționale și internaționale:

- 13th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition (APMAS 2022); Fethiye–Muğla, Turkey; 13-19 October 2022; poster presentation: “Graphene oxide/Nitrocellulose non-covalent hybrid as solid phase for oligoDNA extraction from complex media”, authors: **Toader G.A.**, Nitu F.R., Ionita M.
- 3rd International Conference on Bioengineering and Polymer Science; Bucharest, Romania; 7-10 June 2023; poster presentation: “Graphene oxide/Nitrocellulose non-covalent hybrid as solid phase for oligoDNA extraction from complex medium”, authors: **Toader G.A.**, Nitu F.R., Ionita M.
- 13th World Biomaterials Congress (WBC 2024); Daegu, South Korea; 26-31 May 2024; poster presentation: “Process for Fabricating 3D Printed Scaffolds Based on Sodium Alginate and Graphene Oxide for Personalized Tissue Engineering”, authors: **Toader G.A.**, Cojocaru E., Ionita M.
- 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 2024); Constanța, Romania; 4-7 September 2024; oral presentation: “Oligo-DNA Extraction from Complex Media Using Nitrocellulose Membranes Modified with Carbon Nanotubes and PEG-Aminated Graphene”, authors: **Toader G.A.**, Ionita M.

- Napoca Biodent; Cluj-Napoca, Romania; 27-28 September 2024; oral presentation: “Graphene-Based Materials for Bone Tissue Engineering: Advancements in Bioinspired 3D Printable Scaffold Design and Nucleic Acid Extraction Techniques”, authors: **Toader G.A.**, Ionita M.
- 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science (BPC 4); Braşov, Romania; 2-5 June 2025; oral presentation: “Efficient antisense oligonucleotide (ASO) extraction using graphene-based platforms for designing bioinspired 3D printable scaffolds employed in bone tissue engineering”, authors: **Toader G.A.**, Dobrişan M.R., Chiticaru E.A., Cojocaru E., Ionita M.

Finanţare:

1. Această teză a fost realizată cu sprijin financiar din partea instrumentului NextGenerationEU al Uniunii Europene, prin Planul Naţional de Redresare şi Rezilienţă al României, Pilonul III-C9-I8, gestionat de Ministerul Cercetării, Inovării şi Digitalizării, în cadrul proiectului intitulat „Soluţii avansate şi personalizate pentru regenerarea osoasă şi complicaţiile asociate mielomului multiplu”, contract nr. 760093/23.05.2023, cod CF 213/29.11.2022.
2. O parte dintre studii au fost susţinute printr-un grant al Autorităţii Naţionale pentru Cercetare Ştiinţifică şi Inovare, Programul Operaţional Competitivitate, Axa 1, Secţiunea E, program cofinanţat din Fondul European de Dezvoltare Regională, „Investiţii pentru viitorul dumneavoastră”, în cadrul proiectului nr. 154/25.11.2016, P_37_221/2015, cod SMIS 108117, „A novel graphene biosensor testing osteogenic potency; capturing best stem cell performance for regenerative medicine” (GRABTOP).
3. De asemenea, se aduc mulţumiri pentru sprijinul financiar oferit printr-un grant al Ministerului Educaţiei Naţionale, Unitatea Executivă pentru Finanţarea Învăţământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării şi Inovării, UEFISCDI, proiect nr. PCE 103/2022.

Mulţumiri: Utilizarea inteligenţei artificiale generative şi a instrumentelor asistate de AI.

Autorul acestei teze a utilizat ChatGPT, dezvoltat de OpenAI, pentru îmbunătăţirea clarităţii şi calităţii lingvistice a manuscrisului. Autorul a revizuit şi editat textul generat şi îşi asumă întreaga responsabilitate pentru conţinutul tezei.

Bibliografie selectivă:

- [1] Z. Rezaei, N. Wang, A. D. J. A. Rodriguez, S. Higashi, and S. R. Shin, "Biosensors in biomedical research: Bridging cell and tissue engineering and real-time monitoring," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 34, 2025, doi: 10.1016/j.cobme.2025.100582.

- [2] A. H. Hoveidaei *et al.*, "Clinical challenges in bone tissue engineering - A narrative review," *Bone*, vol. 192, p. 117363, Mar 2025, doi: 10.1016/j.bone.2024.117363.
- [3] L. V. Bauso, V. La Fauci, C. Longo, and G. Calabrese, "Bone Tissue Engineering and Nanotechnology: A Promising Combination for Bone Regeneration," *Biology (Basel)*, vol. 13, no. 4, Apr 2 2024, doi: 10.3390/biology13040237.
- [4] Y. Sun, Z. Sun, and W. Chen, "The evolution of object detection methods," *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, vol. 133, 2024, doi: 10.1016/j.engappai.2024.108458.
- [5] Y. Luo *et al.*, "Detection methods for antibiotics in wastewater: a review," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 47, no. 9, pp. 1433-1451, Sep 2024, doi: 10.1007/s00449-024-03033-0.
- [6] S. Cheng, B. Huang, K. Lu, J. Li, H. Wen, and J. Zhang, "Recent advances in upconversion nanoparticles for biomolecule detection: a review," *Anal Methods*, vol. 17, no. 27, pp. 5563-5578, Jul 10 2025, doi: 10.1039/d5ay00631g.
- [7] G. V. Research. "'Biosensors Market Size, Share & Trends Report'." (accessed 29.12.2025).
- [8] S. Ben-Aissa, S. Tripathy, and A. E. G. Cass, "Implantable electrochemical biosensors: Challenges, strategies, and applications," *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 54, 2025, doi: 10.1016/j.coelec.2025.101745.
- [9] E. A. Chiticaru, L. Pilan, and M. Ionita, "Electrochemical Detection Platform Based on RGO Functionalized with Diazonium Salt for DNA Hybridization," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 1, Jan 13 2022, doi: 10.3390/bios12010039.
- [10] B. McCann, B. Tipper, S. Shahbeigi, M. Soleimani, M. Jabbari, and M. Nasr Esfahani, "A Review on Perception of Binding Kinetics in Affinity Biosensors: Challenges and Opportunities," *ACS Omega*, vol. 10, no. 5, pp. 4197-4216, Feb 11 2025, doi: 10.1021/acsomega.4c10040.
- [11] A. Gautam, "Towards Modern-Age Advanced Sensors for the Management of Neurodegenerative Disorders: Current Status, Challenges and Prospects," *ECS Sensors Plus*, vol. 1, no. 4, 2022, doi: 10.1149/2754-2726/ac973e.
- [12] T. Chalklen, Q. Jing, and S. Kar-Narayan, "Biosensors Based on Mechanical and Electrical Detection Techniques," *Sensors (Basel)*, vol. 20, no. 19, Sep 30 2020, doi: 10.3390/s20195605.
- [13] N. Alanazi, M. Almutairi, and A. N. Alodhayb, "A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications," *Sens Imaging*, vol. 24, no. 1, p. 10, 2023, doi: 10.1007/s11220-023-00413-w.
- [14] K. Wu, D. Tonini, S. Liang, R. Saha, V. K. Chugh, and J. P. Wang, "Giant Magnetoresistance Biosensors in Biomedical Applications," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 14, no. 8, pp. 9945-9969, Mar 2 2022, doi: 10.1021/acsaami.1c20141.
- [15] V. O. Jimenez *et al.*, "Magnetoimpedance Biosensors and Real-Time Healthcare Monitors: Progress, Opportunities, and Challenges," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 7, Jul 12 2022, doi: 10.3390/bios12070517.
- [16] J. Hu, F. Liu, Y. Chen, G. Shangguan, and H. Ju, "Mass Spectrometric Biosensing: A Powerful Approach for Multiplexed Analysis of Clinical Biomolecules," *ACS Sens*, vol. 6, no. 10, pp. 3517-3535, Oct 22 2021, doi: 10.1021/acssensors.1c01394.
- [17] F. Chu, W. Wei, N. S. Shuaibu, H. Feng, X. Wang, and Y. Pan, "Mass Spectrometry-Based Biosensing and Biopsy Technology," *Chemosensors*, vol. 11, no. 8, 2023, doi: 10.3390/chemosensors11080419.

- [18] M. Xu *et al.*, "Recent advances in nanomaterial-based optical biosensors and their biomedical and biopharmaceutical applications," *J Pharm Anal*, vol. 16, no. 1, p. 101349, Jan 2026, doi: 10.1016/j.jpha.2025.101349.
- [19] S. Oliveira *et al.*, "Advances in optical devices for the detection of contaminants in food and water," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 184, 2025, doi: 10.1016/j.trac.2025.118139.
- [20] B. A. Taha *et al.*, "Unlocking new frontiers in healthcare: The impact of nano-optical biosensors on personalized medical diagnostics," *J Biotechnol*, vol. 400, pp. 29-47, Apr 2025, doi: 10.1016/j.jbiotec.2025.02.005.
- [21] N. Sagar Shrikrishna, R. Sharma, J. Sahoo, A. Kaushik, and S. Gandhi, "Navigating the landscape of optical biosensors," *Chemical Engineering Journal*, vol. 490, 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.151661.
- [22] T. P. Patil, A. K. Parthasarathy, D. Malavekar, J. Kim, and A. P. Tiwari, "Optical Biosensing of SARS-CoV-2 RNA Based on Positively Charged Poly-l-Lysine Functionalized Gold Nanoparticles," *Journal of Cluster Science*, vol. 35, no. 7, pp. 2525-2538, 2024, doi: 10.1007/s10876-024-02678-x.
- [23] S. Mohamed *et al.*, "UV-VIs Spectrophotometry Study of Escherichia Coli Bacteria and Microfluidic Channel Chip Fabrication For Optical Biosensing Application," presented at the 2024 41st National Radio Science Conference (NRSC), 2024.
- [24] Y. S. Tekin, S. M. Kul, O. Sagdic, N. Rodthongkum, B. Geiss, and T. Ozer, "Optical biosensors for diagnosis of COVID-19: nanomaterial-enabled particle strategies for post pandemic era," *Mikrochim Acta*, vol. 191, no. 6, p. 320, May 10 2024, doi: 10.1007/s00604-024-06373-6.
- [25] K. Brzozowski *et al.*, "Tandem Raman microscopy: integration of spontaneous and coherent Raman scattering offering data fusion analysis to improve optical biosensing," *Optica*, vol. 12, no. 1, 2025, doi: 10.1364/optica.537479.
- [26] P. I. Diriwari, "Resonance Energy Transfer within and to optical Nanoparticles for Bioimaging and Biosensing Applications," Doctoral, CHIMIE, l'Université de Rouen Normandie, HAL open science, 2024.
- [27] S. Dasgupta and K. Ray, "Plasmon-enhanced fluorescence for biophotonics and bio-analytical applications," *Front Chem*, vol. 12, p. 1407561, 2024, doi: 10.3389/fchem.2024.1407561.
- [28] Y. Wang, K. Jia, and J. Lin, "Optical biosensors for the detection of foodborne pathogens: recent development and future prospects," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 177, 2024, doi: 10.1016/j.trac.2024.117785.
- [29] S. Kumar, A. Iadicicco, S. Kim, D. Tosi, and C. Marques, "Introduction to the feature issue: Advances in Optical Biosensors for Biomedical Applications," *Biomed Opt Express*, vol. 15, no. 5, pp. 3183-3190, May 1 2024, doi: 10.1364/BOE.527613.
- [30] M. Wang, Y. Da, and Y. Tian, "Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors," *Chem Soc Rev*, vol. 52, no. 4, pp. 1189-1214, Feb 20 2023, doi: 10.1039/d2cs00419d.
- [31] A. K. Verma, A. Noumani, A. K. Yadav, and P. R. Solanki, "FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges," *Diagnostics (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr 8 2023, doi: 10.3390/diagnostics13081375.
- [32] F. Tian, G. Xu, S. Zhou, S. Chen, and D. He, "Principles and applications of green fluorescent protein-based biosensors: a mini-review," *Analyst*, vol. 148, no. 13, pp. 2882-2891, Jun 26 2023, doi: 10.1039/d3an00320e.
- [33] D. Semeniak, D. F. Cruz, A. Chilkoti, and M. H. Mikkelsen, "Plasmonic Fluorescence Enhancement in Diagnostics for Clinical Tests at Point-of-Care: A Review of Recent

- Technologies," *Adv Mater*, vol. 35, no. 34, p. e2107986, Aug 2023, doi: 10.1002/adma.202107986.
- [34] S. Valdez, M. Robertson, and Z. Qiang, "Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements in Polymer Science: A Review," *Macromol Rapid Commun*, vol. 43, no. 24, p. e2200421, Dec 2022, doi: 10.1002/marc.202200421.
- [35] A. S. Sharma and N. Y. Lee, "Nanosurface Energy Transfer: Principles, Biosensing Applications, and Future Prospects," *Chemosensors*, vol. 14, no. 1, 2026, doi: 10.3390/chemosensors14010011.
- [36] D. Udhayakumari, D. Duraisamy, and A. Nanthakumar, "PET Coordination Mechanism for the Detecting of Environmental Toxic Analytes: Current Approaches and Future Directions," *J Fluoresc*, vol. 35, no. 10, pp. 9299-9315, Oct 2025, doi: 10.1007/s10895-025-04237-7.
- [37] R. Pramanik, "Nanomaterial-enhanced fluorescence sensors for dopamine neurotransmitters: a photophysical perspective," *Anal Methods*, vol. 17, no. 21, pp. 4251-4292, May 29 2025, doi: 10.1039/d5ay00300h.
- [38] M. Essid and E. U. Mughal, "Push-pull heterocycles and beyond: recent developments in absorption, emission, and ICT properties," *RSC Adv*, vol. 15, no. 45, pp. 37609-37644, Oct 8 2025, doi: 10.1039/d5ra06623a.
- [39] C. Chen and C. Fang, "Fluorescence Modulation by Amines: Mechanistic Insights into Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) and Beyond," *Chemosensors*, vol. 11, no. 2, 2023, doi: 10.3390/chemosensors11020087.
- [40] W. C. Yang, S. Y. Li, S. Ni, and G. Liu, "Advances in FRET-based biosensors from donor-acceptor design to applications," *Aggregate*, vol. 5, no. 2, 2023, doi: 10.1002/agt2.460.
- [41] A. Kaur and S. Dhakal, "Recent applications of FRET-based multiplexed techniques," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 123, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2019.115777.
- [42] R. Govindaraju and J. Kim, "MXene-based fluorescent aptasensors: advances and prospects in diagnostics and environmental monitoring," *Analyst*, Jan 28 2026, doi: 10.1039/d5an00945f.
- [43] R. Huang *et al.*, "Molecular design and architectonics towards film-based fluorescent sensing," *Chem Soc Rev*, vol. 53, no. 13, pp. 6960-6991, Jul 1 2024, doi: 10.1039/d4cs00347k.
- [44] C. Schirripa Spagnolo and S. Luin, "Choosing the Probe for Single-Molecule Fluorescence Microscopy," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 23, Nov 29 2022, doi: 10.3390/ijms232314949.
- [45] L. Riccardi, V. Genna, and M. De Vivo, "Metal–ligand interactions in drug design," *Nature Reviews Chemistry*, vol. 2, no. 7, pp. 100-112, 2018, doi: 10.1038/s41570-018-0018-6.
- [46] X. Li, Z. Cai, L. P. Jiang, Z. He, and J. J. Zhu, "Metal-Ligand Coordination Nanomaterials for Biomedical Imaging," *Bioconjug Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 332-339, Feb 19 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00642.
- [47] D. Quesada-Gonzalez and A. Merkoci, "Quantum dots for biosensing: Classification and applications," *Biosens Bioelectron*, vol. 273, p. 117180, Apr 1 2025, doi: 10.1016/j.bios.2025.117180.
- [48] N. Le, M. Zhang, and K. Kim, "Quantum Dots and Their Interaction with Biological Systems," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 18, Sep 15 2022, doi: 10.3390/ijms231810763.

- [49] I. Sarkar and A. K. Mishra, "Fluorophore tagged bio-molecules and their applications: A brief review," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 53, no. 7, pp. 552-601, 2017, doi: 10.1080/05704928.2017.1376680.
- [50] A. Acharya *et al.*, "Photoinduced Chemistry in Fluorescent Proteins: Curse or Blessing?," *Chem Rev*, vol. 117, no. 2, pp. 758-795, Jan 25 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00238.
- [51] Z. Jia, A. Kai, and M. Liu, "Fluorescent organic cages and their applications," *Chemical Synthesis*, vol. 6, no. 1, 2026, doi: 10.20517/cs.2024.147.
- [52] L. Zhang, D. Shen, and J. Yang, "Advancing Single-Molecule Biophysics: Next-Generation Organic Fluorophores with Tailored Labeling Strategies," *Chem Biomed Imaging*, vol. 3, no. 9, pp. 572-598, Sep 22 2025, doi: 10.1021/cbmi.5c00007.
- [53] F. Yan *et al.*, "Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 97, pp. 15-35, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.08.013.
- [54] K. S. B. Sam, L. George, S. Y. N., and A. Varghese, "Fluorescein Based Fluorescence Sensors for the Selective Sensing of Various Analytes," *J Fluoresc*, vol. 31, no. 5, pp. 1251-1276, Sep 2021, doi: 10.1007/s10895-021-02770-9.
- [55] D. P. Surzhikova, L. A. Sukovaty, E. V. Nemtseva, E. N. Esimbekova, and E. A. Slyusareva, "Functioning of a Fluorescein pH-Probe in Aqueous Media: Impact of Temperature and Viscosity," *Micromachines (Basel)*, vol. 14, no. 7, Jul 18 2023, doi: 10.3390/mi14071442.
- [56] P. R. Callis, "Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1077, pp. 14-21, 2014, doi: 10.1016/j.molstruc.2014.04.050.
- [57] R. A. Salinas Dominguez, J. Aguila Rosas, S. E. Martinez Tolibia, E. Lima, and A. Dutt, "Opportunities in functionalized metal-organic frameworks (MOFs) with open metal sites for optical biosensor application," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 344, p. 103598, Oct 2025, doi: 10.1016/j.cis.2025.103598.
- [58] Y. Ren *et al.*, "Fluorescence Visualization of Strain by Tetraphenylethylene/Ruthenium Complex Three-Dimensional Covalent Organic Framework Assemblies," *J Am Chem Soc*, vol. 147, no. 23, pp. 20033-20044, Jun 11 2025, doi: 10.1021/jacs.5c05354.
- [59] G. Petresky, M. Faran, V. Wulf, and G. Bisker, "Metal-Ion Optical Fingerprinting Sensor Selection via an Analyte Classification and Feature Selection Algorithm," *Anal Chem*, vol. 97, no. 16, pp. 8821-8832, Apr 29 2025, doi: 10.1021/acs.analchem.4c06762.
- [60] F. R. Nitu, J. S. Burns, and M. Ionitã, "Oligonucleotide Detection and Optical Measurement with Graphene Oxide in the Presence of Bovine Serum Albumin Enabled by Use of Surfactants and Salts," *Coatings*, vol. 10, no. 4, 2020, doi: 10.3390/coatings10040420.
- [61] F. R. Nitu, L. Savu, S. Muraru, I. Stoian, and M. Ionita, "Label-Free Homogeneous microRNA Detection in Cell Culture Medium Based on Graphene Oxide and Specific Fluorescence Quenching," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 11, no. 2, Feb 2 2021, doi: 10.3390/nano11020368.
- [62] S. Muraru, S. Muraru, F. R. Nitu, and M. Ionita, "Recent Efforts and Milestones for Simulating Nucleic Acid FRET Experiments through Computational Methods," *J Chem Inf Model*, vol. 62, no. 2, pp. 232-239, Jan 24 2022, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00957.

- [63] P. Zoruk, M. Morozov, V. Veselovsky, A. Strokach, V. Babenko, and K. Klimina, "Impact of DNA extraction techniques and sequencing approaches on microbial community profiling accuracy," *Frontiers in Microbiomes*, vol. 4, 2025, doi: 10.3389/frmbi.2025.1688681.
- [64] M. S. Adamowicz, D. M. Stasulli, E. M. Sobestanovich, and T. W. Bille, "Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e116351, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0116351.