



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“SENSORI ELETTROCHIMICI STAMPATI PER LA
QUANTIFICAZIONE DI IONI NEL SUDORE: PRINCIPIO DI
FUNZIONAMENTO E APPLICAZIONI”**

Relatore: Professoressa Sarah Tonello

Laureanda: Milan Gaia

ANNO ACCADEMICO 2022 –2023

Data di laurea: 19 luglio 2023

SOMMARIO

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1:	7
SENSORI ELETTROCHIMICI PER LA RILEVAZIONE SELETTIVA DI IONI	7
1.1 Sensori elettrochimici potenziometrici	7
1.1.1 Struttura e funzionamento	8
1.2 Sensori elettrochimici impedenziometrici	10
1.2.1 Struttura e funzionamento	11
1.2.2 Spettroscopia di impedenza EIS	12
1.3 Caratteristiche metrologiche principali	14
CAPITOLO 2:	16
APPLICAZIONE PER LA QUANTIFICAZIONE DI IONI NEL SUDORE	16
2.1 Anatomia e fisiologia del sudore umano	16
2.3 Sensori per il sudore	18
2.3.1 Raccolta dei campioni di sudore e materiali utilizzati	19
2.3.2 Elettronica integrata dei sensori	21
CAPITOLO 3:	25
ESPERIENZA IN LABORATORIO DI MISURE	25
3.1 Calibrazione di sensori	25
3.2 Attività di calibrazione in laboratorio	25
3.2.1 Sensore impedenziometrico stampato	27

3.2.2 Sensore potenziometrico stampato.....	30
CAPITOLO 4	34
CONCLUSIONI.....	34
4.1 Opportunità e sfide future.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	36

ABSTRACT

Negli ultimi anni l'interesse verso i sensori elettrochimici ha avuto un grande sviluppo. Infatti, essi hanno rivoluzionato i metodi di analisi, soprattutto nel settore medicale in diagnostica e per il monitoraggio continuo, e di ricerca. Un'importante rivoluzione è stata la stampa, una nuova tecnica di fabbricazione con cui si possono ottenere sensori miniaturizzati su substrati polimerici flessibili e biocompatibili. Grazie a ciò si possono realizzare dispositivi maneggevoli e indossabili, rendendo l'analisi facile e veloce, anche per non esperti. Un'applicazione interessante di essi è l'analisi non invasiva della concentrazione degli ioni nel sudore, che permette di ottenere delle indicazioni utili sullo stato di salute del paziente. In particolare, vengono molto utilizzati in questo ambito i sensori elettrochimici impedenziometrici e potenziometrici stampati. In questo elaborato vengono discusse la loro struttura e le loro caratteristiche metrologiche. Infine, viene riportata un'esperienza di calibrazione di due sensori, uno impedenziometrico e uno potenziometrico, entrambi stampati.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'interesse verso i sensori elettrochimici ha avuto un grande sviluppo. Infatti, essi hanno rivoluzionato i metodi di analisi, soprattutto nel settore medicale e di ricerca, per la fabbricazione di elettrodi e di circuiti di condizionamento. I sensori elettrochimici permettono di migliorare la cura del paziente in modo non invasivo, con un monitoraggio ad hoc e un più accurato rilevamento delle infezioni batteriche durante il ricovero. Inoltre, in diagnostica rendono possibile la rilevazione di anche piccole concentrazioni di biomarcatori correlati a patogeni. Tutto ciò riduce i costi e i tempi impiegati per i trattamenti ospedalieri e ha aperto la strada per la costruzione di dispositivi indossabili, utilizzabili anche da non esperti per promuovere la telemedicina. Infatti, hanno molta rilevanza per la prevenzione e la diagnosi precoce, sempre più fondamentali per la protezione del benessere personale e danno un supporto ai casi di malattie croniche che necessitano di monitoraggio continuo, senza la necessità di rimanere in ospedale o di utilizzare macchinari costosi e ingombranti.

Si sono sviluppate varie metodologie per la realizzazione di tali sensori elettrochimici. Le tecniche tradizionali sono gli elettrodi di massa (bulk electrodes), film sottile (basato sul vuoto, rivestimento per rotazione) (thin film (vacuum-based, spin coating)), litografia (lithography), elettrospray (electrospray) ed elettrofilatura (electrospinning). Recentemente è stata introdotta una nuova tecnica, la stampa. Tale metodo offre la possibilità di una miniaturizzazione elevata, utilizzo di attrezzatura economica, realizzazione di geometrie complesse e possibile combinazione con nano componenti. Oltre a ciò, un aspetto interessante e chiave per l'importanza della stampa è la possibilità di usare substrati di vario tipo e inchiostri innovativi, come i sottili substrati polimerici. Questi materiali sono meno costosi e molto flessibili, dunque più facili da utilizzare per progettare dispositivi indossabili e flessibili. Grazie alle innovazioni sopra citate i componenti elettronici stampati possono essere sfruttati per il monitoraggio in vivo di fluidi biologici con nuove strategie, come l'applicazione di sensori direttamente sulla pelle umana o integrati in oggetti semplici e non invasivi. Nell'ambito della ricerca questi aspetti permettono la fabbricazione di prototipi a costi sostenibili, dunque la possibilità di migliorare le prestazioni dei sensori anche dal punto di vista metrologico. In particolare, sono

importanti la stabilità, la ripetibilità e compatibilità con i materiali. In confronto con le tradizionali tecniche, la stampa richiede meno fasi di lavoro rispetto ai metodi che richiedono una camera bianca, cui caratteristica principale è la presenza di aria molto pura, cioè a bassissimo contenuto di microparticelle di polvere in sospensione.

Fabrication Techniques	Advantages	Challenges
Bulk Electrodes	higher stability, larger surface	no possibility of miniaturization, large volumes of sample needed, low customization possibility
Printing Technologies	miniaturization, low cost, wide range of inks and substrates available, integrability, complex geometries, possible combination with nanostructures, with bio-receptors	stability, repeatability, compatibility among materials
Thin Film (Vacuum-Based, Spin Coating)	fine control of the thickness, low costs, high repeatability	high temperatures, vacuum needed, non-compatible with low-melting point substrates, no complex geometries
Lithography	high resolution, high accuracy, high repeatability	long process, needed particular materials, mask based, high costs, limited available substrates
Electrospray, Electrospinning	good control of fibers, control of porosity, possibility to combine multiple materials	low lateral resolution, no complex geometries

Figura 1: tabella di comparazione della tecnica di stampa con le tradizionali tecniche di produzione dei sensori elettrochimici. [1]

La tecnica di stampa si divide in varie tipologie: stampa a contatto (incisione, flessografia, stampa offset, erogazione a micro-contatto e serigrafia) (contact printing (gravure, flexographic, offset, micro-contact dispensing and screen printing (SP)) e stampa senza contatto (stampa a getto d'inchiostro, stampa con getto aerosol, laser trasferimento avanti e micro e nano penne) (non-contact printing (inkjet (IP), aerosol jet printing (AJP), laser-induced forward transfer (LIFT), micro and nano-pen printing)). La stampa basata sul contatto prevede che l'inchiostro venga applicato al substrato con un effettivo accostamento fisico dei due. Invece, in quella senza contatto, l'inchiostro viene applicato al substrato attraverso mini-gocce o un getto continuo. Tale metodo spesso viene associato a una digitalizzazione, ovvero all'utilizzo di un software per il controllo in differita della stampa, consentendo una versatilità migliore delle geometrie di realizzazione. [1], [2]

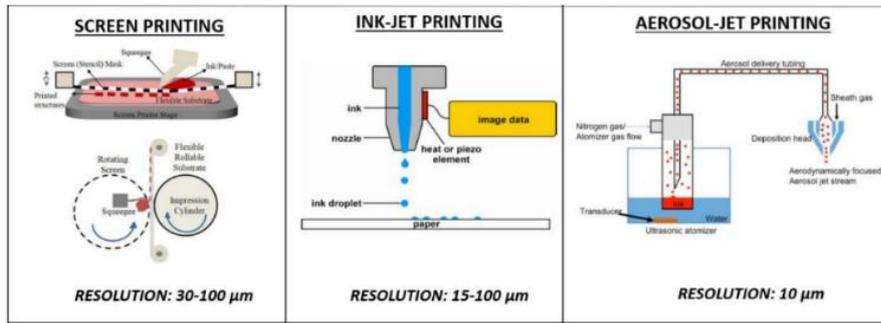


Figura 2: tipologie di tecniche di stampa, con contatto e senza contatto. [1]

In questo elaborato verrà inizialmente descritta la struttura e il funzionamento dei sensori elettrochimici potenziometrici e impedenziometrici, specificandone le principali caratteristiche metrologiche. Successivamente ci si concentrerà su una loro applicazione, ovvero la rilevazione degli ioni all'interno del sudore. Infine, sarà riportata un'esperienza in laboratorio di calibrazione di un sensore per ognuna delle due categorie precedentemente discusse. [3]

CAPITOLO 1:

SENSORI ELETTROCHIMICI PER LA RILEVAZIONE SELETTIVA DI IONI

I sensori elettrochimici misurano concentrazioni o pressioni parziali di sostanze in soluzioni, per esempio concentrazioni di ioni come H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , di O_2 o di CO_2 . Per farlo, possono utilizzare diversi principi di trasduzione, che permettono di trasformare l'informazione chimica in un segnale analitico, come il segnale elettrico. Essi si suddividono in tre principali categorie in base al tipo di trasduttore che presentano: amperometrici, impedenziometrici e potenziometrici. Nello specifico caso di sensori per la rilevazione selettiva di ioni, vengono utilizzati principalmente quelli impedenziometrici e potenziometrici. I primi misurano il valore dell'impedenza legata alla concentrazione di un certo soluto, i secondi valutano la differenza di potenziale tra due elettrodi, detto anche potenziale di membrana. La stampa ha permesso un importante sviluppo di tali sensori, miniaturizzandoli rispetto alle tradizionali celle elettrochimiche macroscopiche, e rendendoli molto sottili e flessibili, in modo da essere utilizzati in dispositivi indossabili e in molte applicazioni innovative. Un esempio può essere la quantizzazione di ioni all'interno del sudore umano. [4]

1.1 Sensori elettrochimici potenziometrici

I sensori elettrochimici potenziometrici misurano la differenza di potenziale tra due elettrodi senza passaggio di corrente. Tale misura viene utilizzata per quantificare la concentrazione di un certo analita all'interno di una soluzione.

1.1.1 Struttura e funzionamento

I sensori potenziometrici sono composti da due elettrodi, uno di riferimento e uno di lavoro. L'elettrodo di riferimento è necessario per stabilire un potenziale su cui basarsi. Invece, l'altro elettrodo ha un potenziale che dipende dalla concentrazione di soluto da analizzare. Su questo elettrodo viene applicata, con varie tecniche, una membrana solitamente polimerica selettiva per lo ione specifico che si vuole quantizzare. Tale membrana è composta da una matrice polimerica contenente delle molecole ione – selettive, dette ionofori. Essi sono molecole organiche che permettono di rendere la membrana permeabile ad un solo ione specifico, in modo da rendere il sensore selettivo. Al fine di ottimizzare il range di concentrazioni a cui la membrana risulta sensibile, è necessario sottoporre la membrana a un pre-condizionamento, ovvero un'incubazione con una soluzione contenente ioni target ad una concentrazione intermedia rispetto al range in cui si vuole ottenere la sensibilità teorica di 59 mV/dec. La concentrazione di pre-condizionamento può infatti influenzare il range di lavoro e modificare la concentrazione minima e massima al di fuori delle quali il sensore subisce saturazione, ovvero una significativa decrescita della sensibilità. Grazie alla presenza della membrana, la differenza di potenziale tra elettrodo di lavoro e un elettrodo di riferimento raggiungerà un potenziale proporzionale alla quantità di ioni target presenti in soluzione. Il potenziale raggiunto verrà mantenuto stabile grazie ai materiali inerti, come Ag/AgCl, che costituiscono il reference electrode e grazie a una membrana protettiva che favorisce lo scambio continuo di ioni e non il loro accumulo. Invece, sull'altro elettrodo, grazie alla presenza della membrana, si accumuleranno molti ioni specifici, che influenzeranno il potenziale, modificandolo rispetto a quello di riferimento. Tale reazione continuerà nel tempo, fino a raggiungere un equilibrio, spinto sia dal gradiente di concentrazione, che vorrebbe vedere tutti gli ioni presenti con la stessa concentrazione in entrambi i lati della membrana, che dalla repulsione elettrica. Infatti, man mano che i vari ioni passano la membrana si formerà un potenziale che si opporrà al gradiente. Quando viene raggiunto un equilibrio termodinamico, il sensore arriverà a regime con una misura precisa della differenza di potenziale tra i due terminali, che è indicativa della concentrazione di ioni presente nel liquido. La relazione tra la concentrazione con gli ioni liberi e il potenziale che si forma è stabilita dall'equazione di Nerst:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(Q)$$

Dove E è il potenziale sulla membrana (V), R è la costante dei gas (8.314 J/K), F è la costante di Faraday (96,500 C/mol), n è il numero di elettroni e Q è il rapporto tra la concentrazione dello ione tra un elettrodo e l'altro, E_0 è il potenziale standard della soluzione.

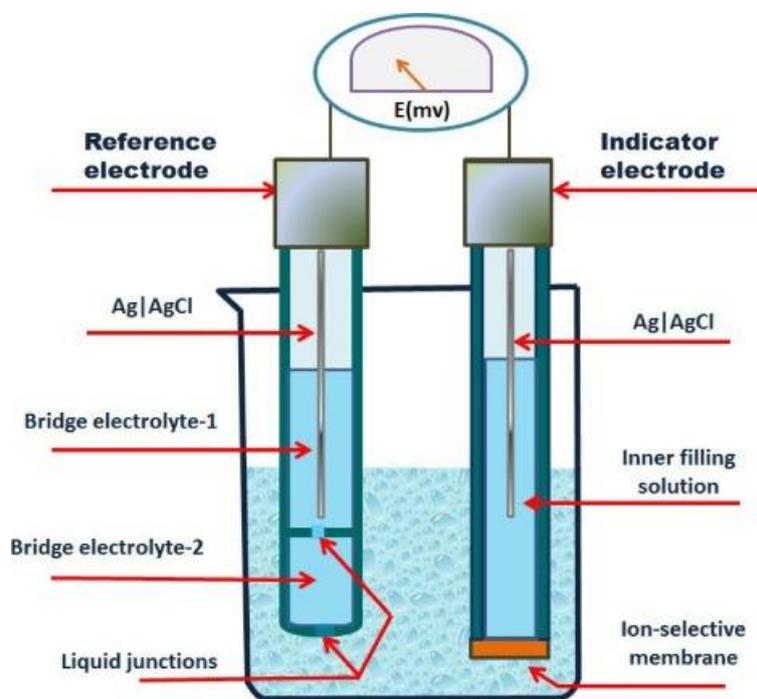


Figura 3: schema di un sensore elettrochimico potenziometrico. [3]

Gli elettrodi solitamente sono metallici, dunque anche sulla loro superficie ci saranno delle interazioni con la soluzione, nello specifico sono reazioni di ossido – riduzione. Tale situazione crea dei potenziali determinabili sempre con l'equazione di Nernst, ma essendo due elettrodi, tale differenza di potenziale praticamente si annulla, quindi non viene considerata. Una tipologia di elettrodo che risponde bene a queste considerazioni nelle interazioni con fluidi fisiologici è il Ag/AgCl. Si tratta di una barretta di argento, ricoperta da uno strato poroso di cloruro di argento. Negli ultimi tempi, grazie alla ricerca, si stanno scoprendo nuovi materiali alternativi per realizzare questi componenti, per renderli più adattabili ai vari ambiti. Un esempio di applicazione è la misura del pH o di alcuni ioni molto presenti nel corpo umano, come il sodio, potassio o calcio. Se consideriamo il singolo elettrodo con membrana si parla di elettrodo selettivo per ione (ISEs). Questo arrangiamento tecnologico è ben affermato per la costruzione di sensori elettrochimici potenziometrici, anche se si stanno sviluppando altre tipologie, come l'elettrodo selettivo per ioni con il transistor (ISFETs). Gli elettrodi

selettivi per ioni (ISEs) mostrano grandi vantaggi come la possibilità di miniaturizzazione, risposte rapide, facilità d'uso e costi bassi. La grande caratteristica di questo metodo è la possibilità di conoscere la concentrazione di un singolo ione libero all'interno di una soluzione, non la concentrazione totale. Infatti, negli ultimi anni, l'analisi clinica della quantizzazione degli ioni rilevanti a livello fisiologico, come Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , è svolta con tale tecnica, soprattutto grazie alle nuove prospettive per i dispositivi indossabili e analisi in diretta. Per la costruzione di sensori elettrochimici potenziometrici, viene dunque usato l'elettrodo selettivo per ione (ISEs) insieme a un elettrodo di riferimento (RE). Questa configurazione si adatta in modo ottimale alle metodologie di stampa, anche su substrati innovativi e flessibili. In particolare, le tecniche di stampa a iniezione e stampa a schermo sono le più promettenti in quanto più semplici, veloci ed economiche. Un'applicazione in grande sviluppo per tali tecnologie è la quantizzazione di ioni all'interno del sudore, approfondita nel seguente capitolo. [5], [4], [6], [7], [8]

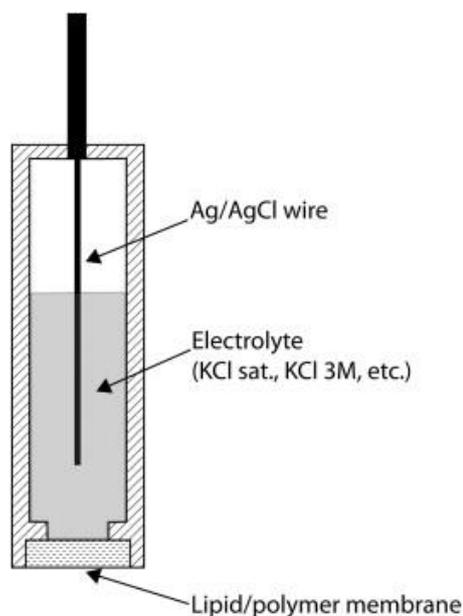


Figura 4: esempio di elettrodo potenziometrico Ag/AgCl (ISEs). [14]

1.2 Sensori elettrochimici impedenziometrici

I sensori elettrochimici impedenziometrici hanno una correlazione diretta tra il cambiamento dell'impedenza e la concentrazione di un analita. Alla base del loro funzionamento c'è la spettroscopia di impedenza (EIS). Tale tecnica risulta vantaggiosa poiché è facile da manipolare, ha una risposta rapida, ha una grande capacità per la miniaturizzazione e un costo non elevato.

1.2.1 Struttura e funzionamento

I sensori impedenziometrici sono caratterizzati da due elettrodi. Il primo è l'elettrodo di lavoro, che fornisce una superficie dove possono avvenire le reazioni di ossido – riduzione; il secondo è l'elettrodo di controllo (counter electrode), grazie al quale avviene la misura. Viene applicato un voltaggio alternato agli elettrodi con un'ampiezza costante, solitamente tra i 5 e 10 mV, e con un definito range di frequenze. La corrente alternata in uscita viene misurata e viene poi calcolata l'impedenza (Z) corrispondente alla specifica concentrazione di analita. Questo metodo restituisce direttamente il risultato, senza richiedere elettro attività dello ione interessato. Di grande importanza è il fatto che non è necessario un grande voltaggio; dunque, non c'è il rischio di danneggiare il dispositivo. Di seguito viene analizzata in dettaglio la tecnica della spettroscopia di impedenza, che sta alla base del funzionamento di tali sensori elettrochimici. [1]

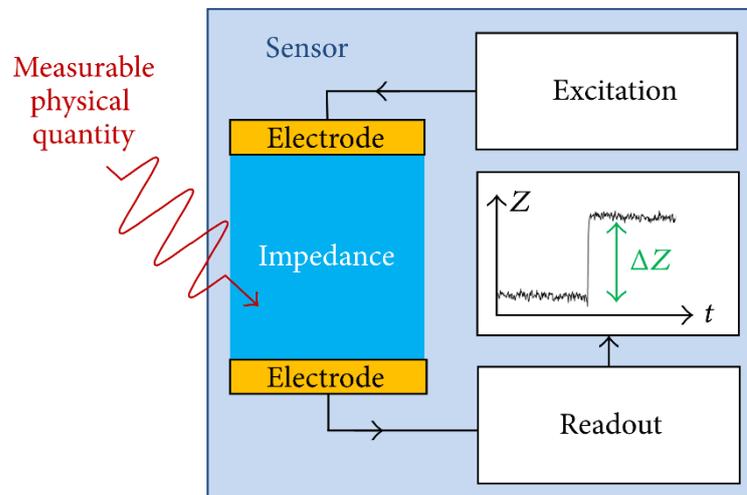


Figura 5: architettura di un sensore elettrochimico impedenziometrico, composto da un circuito di stimolazione e uno di lettura dei risultati. Si nota la minima variazione di impedenza che può essere rilevata. [15]

1.2.2 Spettroscopia di impedenza EIS

L'impedenza (Z) misurata con la tecnica della spettroscopia di impedenza può essere suddivisa in due contributi: una prima parte, detta reale o resistiva (Z') e una seconda immaginaria o capacitiva ($-Z''$). Quella resistiva rappresenta l'opposizione alla corrente della superficie degli elettrodi, mentre quella capacitiva misura quanta carica viene accumulata nel sistema quando viene applicato un potenziale. La base di questa tecnica consiste nell'applicare una tensione alternata con piccola ampiezza (di solito 5 – 10 mV), in un range specifico di frequenze. Il risultato che si ottiene è una corrente alternata ma con un certo angolo di fase rispetto alla tensione. L'impedenza si calcola con la legge di Ohm, sarà dunque il rapporto tra il voltaggio e la corrente misurato in Ohm. Tale grandezza rappresenta l'opposizione di un circuito elettrico al passaggio di una corrente alternata. La formula è la seguente:

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)}$$

Dove Z è l'impedenza, V la tensione, I la corrente, j la parte immaginarie e ω la frequenza. Quando la fase tra la tensione e la corrente risulta nulla, allora l'impedenza coincide con la resistenza. Nella realtà ciò non succede a causa di vari disturbi.

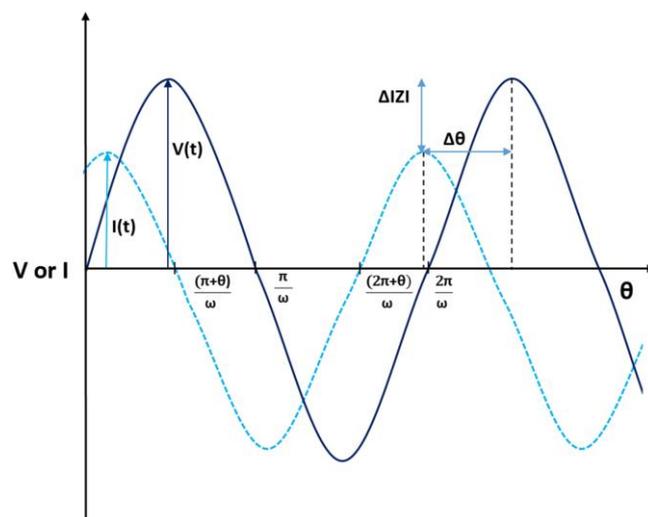


Figura 6: diagramma di fase che mostra il cambiamento dell'angolo di fase e il modulo dell'impedenza. [16]

Per rappresentare le informazioni sull'impedenza si utilizzano i diagrammi di Nyquist, dove la componente immaginaria ($-Z''$) è rappresentata rispetto alla componente reale (Z'), per ogni frequenza.

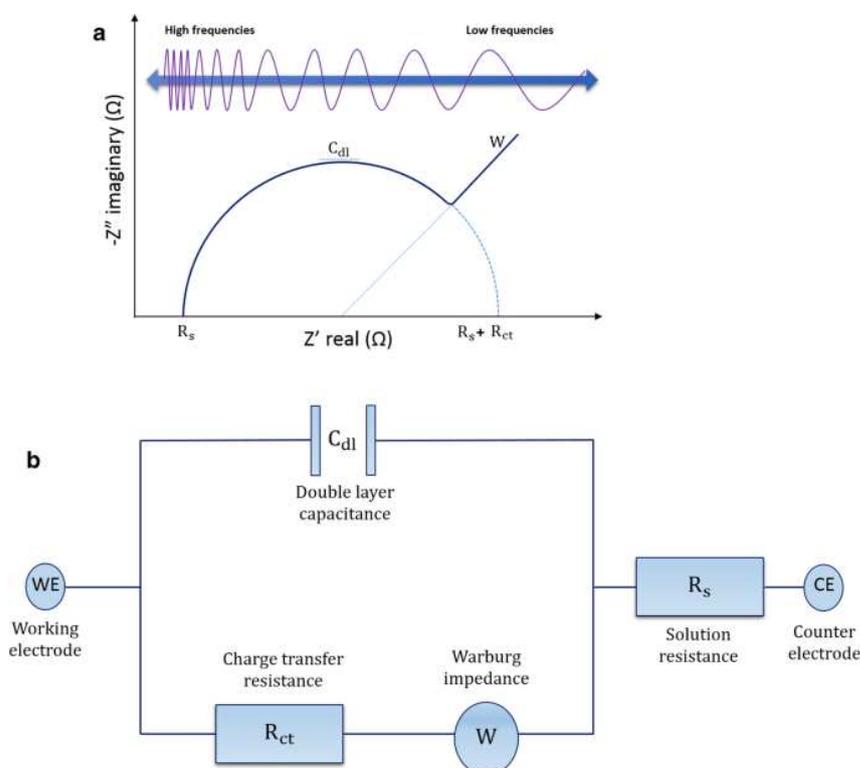


Figura 7: schema generale del diagramma di Nyquist e il suo schema equivalente di Radlens: a. Il diagramma di Nyquist rappresenta la parte capacitiva dell'impedenza rispetto alla parte reale; b. Circuito equivalente di Randles che fornisce di un modello elettrico di un sensore di Faraday. [16]

Il comportamento del sistema è diverso alle alte frequenze rispetto alle basse. Alle alte frequenze il segnale è controllato da processi cinetici: gli elettrodi delle molecole mediatrici cambiano la direzione della loro carica prima che le reazioni redox sulla superficie dell'elettrodo possano avvenire. Tale fatto è una limitazione conosciuta come resistenza (R_s). A medie frequenze esiste una resistenza molto lieve, perciò i cambiamenti del sistema sono dovuti alla capacità (C_{dl}) sulla superficie dell'elettrodo. Infine, a basse frequenze, il trasferimento di carica è prodotto solamente dalla resistenza del sensore (R_{ct}), in qualche occasione si osserva anche l'impedenza di Warburg, un segmento lineare alla fine dell'arco di Nyquist. Con tutti questi componenti si costruisce un modello equivalente al sistema, chiamato

circuito equivalente di Randles. Tale modello rappresenta bene i cosiddetti biosensori di Faraday, cioè in cui avviene un trasferimento di carica grazie alle reazioni di ossido – riduzione; invece, se la corrente può fluire nel sistema come in un condensatore, vengono detti biosensori non di Faraday. Il diagramma di Nyquist è tipicamente usato per i sistemi di resistenze, dove si potrebbe anche usare il diagramma di Bode con la capacità. Grazie alla spettroscopia di impedenza si riesce a monitorare un cambiamento nell'impedenza della cella elettrochimica, generata dalle reazioni di ossido riduzione sulla superficie dell'elettrodo. È un ottimo metodo per analizzare la cinetica degli elettrodi e anche le caratteristiche del legame degli analiti con l'elettrodo stesso. Inoltre, oltre alla misura con gli ioni, si può utilizzare per varie tipologie di molecole, come enzimi, immunoglobuline, proteine e molti altri. Proprio per tali motivi viene utilizzata molto questa metodologia per la costruzione di sensori elettrochimici impedenziometrici. [5], [9]

1.3 Caratteristiche metrologiche principali

I sensori elettrochimici possono essere analizzati dal punto di vista metrologico attraverso varie caratteristiche descritte di seguito. La sensibilità, ovvero la pendenza della curva di calibrazione ottenuta dalla risposta del sensore a varie concentrazioni dell'analita da osservare. Solitamente viene espressa come il rapporto tra un parametro elettrico e la concentrazione dell'analita stesso ed è uno degli indici più importanti per osservare la performance del biosensore. Più è elevata la sensibilità, più è alta la capacità di distinguere varie concentrazioni. In particolare, per i sensori potenziometrici la sensibilità viene espressa come l'inclinazione della retta che si ottiene graficando il potenziale rispetto al logaritmo della concentrazione. Invece, nel caso dei sensori impedenziometrici si osserva la pendenza della curva del modulo o della fase rispetto alla concentrazione. Il limite di detection (LOD), che rappresenta la quantità più bassa di analita che si riesce a rilevare rispetto a una soluzione a concentrazione nulla. Questo parametro viene ricavato dalla deviazione standard (SD) della concentrazione nulla, la media della concentrazione nulla e la pendenza della curva di calibrazione e altri fattori specifici. Inoltre, si può definire anche il limite superiore di detection (ULOD), la massima concentrazione che si riesce a rilevare, parametro molto utile nel caso di sensori con una membrana selettiva che potrebbe raggiungere un valore di saturazione. Un'altra caratteristica importante è l'accuratezza. Essa calcola il grado di concordanza tra un valore misurato e il valore vero del misurando. Viene espressa come la percentuale di errore del risultato rispetto al valore alla misura svolta con l'attrezzatura di laboratorio. La selettività che rappresenta la variazione della risposta con una

variazione della concentrazione in ingresso. La riproducibilità è l'abilità del sensore di rispondere a uno stesso stimolo sotto condizioni di lavoro differenti, come operatori diversi, strumentazione diversa. La ripetibilità è la capacità di rifare la stessa misura sotto le stesse condizioni. La stabilità, che indica il grado di suscettibilità a disturbi esterni o altri fattori. La linearità, ovvero il range di lavoro dove la curva di calibrazione è lineare. Infine, il tempo di risposta, cioè un indicatore quantitativo di quanto tempo impiega il sensore a ottenere la risposta attesa. In particolare, per i sensori elettrochimici le sfide attuali si concentrano sul miglioramento della selettività, ripetibilità e la stabilità. Nello specifico, l'aspetto più impegnativo dei sensori elettrochimici impedenziometrici è la forte influenza sulla misura dell'accuratezza e della ripetibilità del pH e la temperatura. Inoltre, presentano un peggiore limite di detection rispetto agli altri tipi di trasduzione. Grazie alle nuove tecnologie di stampa, si ha la possibilità di esplorare nuove nanostrutture per migliorare il rapporto segnale rumore e con l'utilizzo di inchiostri organici biocompatibili ha ottimizzato l'integrazione degli elementi sensibili e l'ambiente biologico. Invece, grazie ai progressi nei materiali usati e le tecniche di stampa per i sensori elettrochimici potenziometrici si osserva un miglioramento del limite di detection e la selettività. L'opportunità di costruire gli elettrodi con inchiostri adattati allo specifico contesto potrebbe rendere più stabile l'elettrodo di riferimento. Un altro progresso si riscontra nella possibilità di realizzare sensori innovativi su substrati degradabili o biologici grazie al principio di trasduzione utilizzato, basato sull'assenza di passaggio di corrente; infatti, questa caratteristica limita possibili perturbazioni dell'area sensibile. Negli ultimi tempi, ottimizzare le caratteristiche metrologiche dei sensori elettrochimici stampati è di grande interesse. I requisiti fondamentali ricercati nei dispositivi biomedici sono una alta sensibilità, alta ripetibilità, bassa cross – sensibilità dell'ambiente esterno e una stabilità duratura nel tempo. Oltre a ciò, si sta cercando di mantenere delle buone prestazioni anche in condizioni non ottimali, come di grande umidità o ambienti biologicamente degradabili. [1], [10]

CAPITOLO 2:

APPLICAZIONE PER LA QUANTIFICAZIONE DI IONI NEL SUDORE

Il sudore è un fluido biologico ottimale per la ricerca di biomarcatori con un approccio non invasivo a differenza del sangue, le lacrime e la saliva. Inoltre, i sensori utilizzati per tale scopo possono essere portatili e indossabili, una caratteristica fondamentale per la crescita della telemedicina e l'automonitoraggio dello stato di salute. Esso rappresenta una variante meno dolorosa con la possibilità di analisi in tempo reale e continue della situazione fisiologica del paziente in caso di malattie croniche, ma anche in campo sportivo o diagnostico. I sensori elettrochimici sono molto utilizzati in questo ambito, grazie alle loro buone prestazioni, semplicità operativa e costi non elevati. Il recente sviluppo di materiali innovativi per la loro produzione sta dando la possibilità di raggiungere soluzioni tecnologiche sempre più acute e personalizzate per ogni situazione e paziente.

2.1 Anatomia e fisiologia del sudore umano

Il sudore è un fluido biologico secreto dalle ghiandole sudoripare e trasportato sulla superficie dell'epidermide attraverso i condotti di sudorazione. Tali ghiandole sono distribuite in tutto il derma sulla superficie totale del corpo e possono essere suddivise in ghiandole sudoripare grandi, presenti principalmente sotto le ascelle, e ghiandole eccrine, localizzate su tutta l'epidermide. Il sudore ha la funzione di termoregolazione, ovvero il corpo aumenta la dissipazione di calore con l'evaporazione del sudore dalla superficie della pelle. Inoltre, la sua produzione è caratteristica in situazioni di stress o agitazione. La stimolazione della produzione del sudore si può dividere in attiva e passiva. La prima si riferisce a momenti di grande sforzo fisico atto a mantenere la temperatura corporea costante, ma trasporta anche parte dei prodotti di scarto delle cellule generata durante l'esercizio. La seconda si presenta in caso di calore o umidità alta. Nel caso di necessità di analisi del sudore, il paziente dovrebbe svolgere molta

attività o essere in una condizione di estremo caldo, in modo da sudare nella maggioranza della superficie corporea. Tutto ciò sarebbe uno spreco di energia e tempo, dunque si utilizzano dei metodi di stimolazione esterna. Tale metodologia include la iontoforesi, un modo non invasivo, dove una piccola corrente trasporta un farmaco che stimola la secrezione di sudore; la iontoforesi inversa, che utilizza l'elettroosmosi per movimentare i fluidi dall'epidermide alla superficie della pelle e, infine, con l'utilizzo di farmaci. Il sudore contiene al suo interno molti componenti chimici che forniscono molte informazioni sull'attività fisiologica. Esso è composto al 99% da acqua, che funge da solvente, e il restante 1% circa di soluto, che si può classificare in tre categorie: elettroliti, metaboliti ed elementi chimici esterni. Per i metaboliti si sta cercando una correlazione delle quantità contenute nel sudore e quelle del sangue, in modo da poter sfruttare un'analisi non invasiva, un esempio sono il glucosio, gli ormoni o immunoglobuline. Per quanto riguarda gli elementi chimici esterni, essi dipendono dall'alimentazione e dai farmaci assunti, per esempio si può misurare la concentrazione di alcool, vitamine, caffeina, antibiotici, metalli pesanti e narcotici. Infine, gli elettroliti base nel sudore sono il potassio (K^+), il sodio (Na^+) e il cloro (Cl^-) che costituiscono la maggioranza degli ioni presenti. Inoltre, ci possono essere anche altri cationi, come il calcio, il magnesio, manganese, ferro, rame o anioni, come iodio, fluoro, bromuro, ma tutte in concentrazioni minori. Normalmente il sudore è leggermente acido, con un pH di circa 4.0 – 7, che riflette la dinamica di cambiamento della composizione di esso. Oltre a ciò, le concentrazioni dei vari ioni possono essere correlate a molte malattie, motivo per cui l'analisi non invasiva del sudore ha un enorme potenziale in diagnostica e nel monitoraggio in tempo reale. Per esempio, la concentrazione dello ione cloruro (Cl^-) in condizioni fisiologiche normali è circa 10 – 100mM. Se la misura è al di fuori di tale range potrebbe essere indice di disidratazione o di malattie più gravi come la fibrosi cistica. Un altro esempio è la concentrazione dello ione sodio, Na^+ , che in condizioni fisiologiche normali è circa di 10 - 100mM. Se i valori non fossero all'interno di tali limiti potrebbe indicare disidratazione, iponatremia o uno sbilanciamento elettrolitico. Un altro caso lo riscontriamo per il potassio, K^+ , la cui concentrazione è normalmente tra 1 e 18.5mM. Un suo squilibrio può essere sintomo di ipocalcemia o crampi muscolari. Un altro importante ione è il calcio, Ca^{2+} , che presenta valori tra 0.41 e 12.4 mM. Valori diversi da questi potrebbero indicare presenza di mielomi, cirrosi, insufficienza renale o disturbo dell'equilibrio acido – base. Un'altra misurazione fondamentale che si può svolgere sul sudore è quella del pH, dunque si osserva lo ione idrogeno, H^+ . In generale il sudore può essere acido con valori tra 4 – 7, un cambiamento di questi valori potrebbe essere indice di patologie della pelle o della presenza di ferite in guarigione. [11], [12]

Target Analyte		Concentration in Sweat	Disease Correlation	Sensing Modality
Ions	Na ⁺	10–100 mM	Dehydration, hyponatremia, electrolyte imbalances	Ion-selective potentiometry
	Cl ⁻	10–100 mM	Dehydration, cystic fibrosis	
	K ⁺	1–18.5 mM	Hypokalaemia, muscle cramps	
	Ca ²⁺	0.41–12.4 mM	Myeloma, cirrhosis, renal failure, acid–base balance disorder	
	pH	3–8	Pathogenesis of skin diseases, wound healing	
	NH ₄ ⁺	0.1–1 mM	Shift from aerobic to anaerobic metabolic conditions	
Metabolites	Glucose	10–200 μM	Diabetes	Amperometric enzymatic biosensor
	Lactate	5–20 mM	Cystic fibrosis, stress ischaemia, lactic acidosis	
	Ethanol	2–30 mM	Alcoholism, hepatitis B, diabetes, drunk driving	
	Uric acid	2–10 mM	Hyperuricemia, gout, kidney disease	
	Ascorbic acid	10–50 μM	Tumours, cancer, kidney disease, thrombosis, stones	
Hormones	Cortisol	22–390 nM	Stress	Voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy
Macromolecules	Peptides Proteins (antibodies, antigens, enzymes)	-		Square wave voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy

Figura 8: tabella dei principali analiti presenti nel sudore con i relativi metodi di trasduzione e patologie associate. [8]

2.3 Sensori per il sudore

La tradizionale analisi in laboratorio del sudore consiste nella raccolta di campioni dalla pelle del paziente e una successiva indagine tramite sensori. Tale tecnica richiede operatori specializzati e una particolare attenzione alla sicurezza biologica per evitare incidenti che potrebbero contaminare i campioni. Con l'avvento dei sensori elettrochimici stampati e indossabili si è passati a un metodo di analisi meno invasivo e più semplice, realizzata direttamente a contatto con la pelle del paziente. Inoltre, questi dispositivi hanno la capacità di rendere più comprensibile la correlazione tra i valori dei vari elettroliti nel sangue e nel sudore, di fondamentale rilevanza per la tempestività della diagnosi e dei controlli. Un altro importante aspetto è l'elaborazione dei dati rilevati di sensori. Infatti, grazie all'utilizzo dell'intelligenza artificiale e innovative tecniche di processione dei dati, si potranno ottenere informazioni notevoli per guidare le decisioni cliniche. In ogni caso i dispositivi indossabili presentano

ancora molte sfide, come la loro dipendenza della stabilità dai materiali con cui sono realizzati, l'effetto del cambiamento del pH del sudore e la fluttuazione del segnale dovuta dalla curvatura del sensore stesso. Un aspetto interessante dei sensori in questione è la trasmissione delle informazioni raccolte, che vengono immediatamente convertiti in segnali elettrici o ottici e mandati all'utilizzatore o al tecnico via wireless. Di seguito vengono specializzate per i dispositivi stampati e indossabili le strategie per un'efficace raccolta dei campioni e l'elettronica integrata necessaria.

2.3.1 Raccolta dei campioni di sudore e materiali utilizzati

Per analizzare le concentrazioni di elettroliti presenti nel sudore bisogna garantire un'efficiente raccolta dei campioni e trasporto di essi in corrispondenza dell'elettrodo sensibile. Nel tempo sono stati implementati vari approcci come materiali funzionalmente assorbenti, superfici super idrofobe / super idrofile, guide per il sudore e sistemi microfluidici epidermici. I primi, materiali assorbenti, come il tessuto non tessuto, la carta e l'idrogel, accumulano il sudore all'interno ai pori presenti nel materiale e lo guidano efficacemente verso la superficie del sensore. Inoltre, tali materiali possono essere funzionalizzati con componenti selettivi per uno specifico analita. I secondi hanno la capacità di modificare la bagnabilità della superficie, in modo da poter raccogliere, accumulare e trasportare in modo preciso e guidato il sudore dalla zona idrofoba a quella idrofila. Il terzo metodo è stato sviluppato da ricercatori che hanno realizzato metodi sempre più innovativi e sofisticati per guidare il sudore al sensore attraverso microcanali composti da un substrato polimerico. Il fluido biologico fluisce attraverso tali canali grazie alla capillarità e alla pressione creata dall'azione di pompaggio idraulico delle ghiandole. Tali sistemi sono in maggiore tendenza per i dispositivi indossabili, poiché rendono più efficace la raccolta di campioni. Per diminuire il tempo di raccolta dei campioni e renderlo più efficace si può aggiungere uno strato di idrogel all'interno del dispositivo. Infatti, tra l'idrogel e il sudore c'è una differenza di pressione osmotica, che funge da ulteriore forza motrice per spingere il fluido all'interno dei micro-canali. Come si evince dalle tecnologie implementate per questi sensori, è cruciale che il campione di sudore raggiunga la parte sensibile del dispositivo. Tale sensore può essere di vario genere, in base al metodo di trasduzione che presenta. Principalmente si utilizzano sensori elettrochimici potenziometrici e impedenziometrici, descritti in dettaglio nel capitolo precedente. Per quanto riguarda i materiali utilizzati per la costruzione dei sensori indossabili, è necessario che abbiano proprietà che li rendono flessibili.

Principalmente sono polimeri come il polietilene tereftalato (PET), poliimmide (PI), polimetilmetacrilato (PMMA), poliuretano (PU) e polidimetilsilossano (PDMS). Questi fogli polimerici hanno eccellenti proprietà adatte a sensori indossabili come il basso costo, una buona biocompatibilità, ottime proprietà meccaniche e fisiche e caratteristiche di isolanti elettrici. Inoltre, anche la microstruttura del dispositivo è significativa per migliorare la sensibilità e la velocità di risposta. I grandi svantaggi dei polimeri sono la poca estensibilità e traspirabilità, che li rendono applicabili alla pelle solo per periodi corti. Per oltrepassare questo limite si sono sviluppate delle piattaforme a base tessile che hanno una intrinseca traspirabilità per la pelle sottostante, permettendo una sudorazione ed evaporazione naturale del fluido. Oltre a ciò, presentano molta flessibilità, comodità e morbidezza. Un aspetto interessante è la possibilità di integrare tali sensori a base tessile con vari indumenti come calzini o magliette, rendendo l'analisi continua del sudore molto versatile, quasi impercettibile, essenziale in ambito pediatrico. Un altro materiale molto utilizzato è la carta, che presenta eccellenti proprietà, come costi bassi, preparazione facile, buona biocompatibilità e intrinseca capacità idrofila. L'auto-assorbimento del sudore attraverso i canali microfluidici può essere facilmente generato nei dispositivi basati sulla carta attraverso la modifica di materiali idrofobi e idrofili, la tintura della cera, la stampa a getto e la fotolitografia. Inoltre, la morbidezza e la pieghevolezza di tale materiale rendono possibile la riduzione delle dimensioni del dispositivo e la realizzazione di device con molte funzioni. Un esempio è il dispositivo integrato elettrochimico tridimensionale basato sulla carta e sistemi microfluidici per il monitoraggio in diretta dei metaboliti ed elettroliti del sudore (3D - PMED). Il collettore è formato da cinque strati: un collettore di sudore, un canale verticale, un canale trasversale, uno strato di elettrodi e la superficie di evaporazione del sudore. Inoltre, l'effetto capillare della carta aiuta il flusso del sudore all'interno del dispositivo, favorendo la raccolta precisa del campione. Il fluire del sudore tra la pelle e il dispositivo è fondamentale per un'analisi continua e in diretta. Inoltre, questo aspetto è significativo perché bisogna garantire la comodità del contatto del dispositivo con la pelle anche a lungo termine; infatti, se il fluido si accumulasse sotto il sensore ci sarebbe una situazione di malessere con l'epidermide, ci sarebbe il rischio di irritazioni. [8], [12]

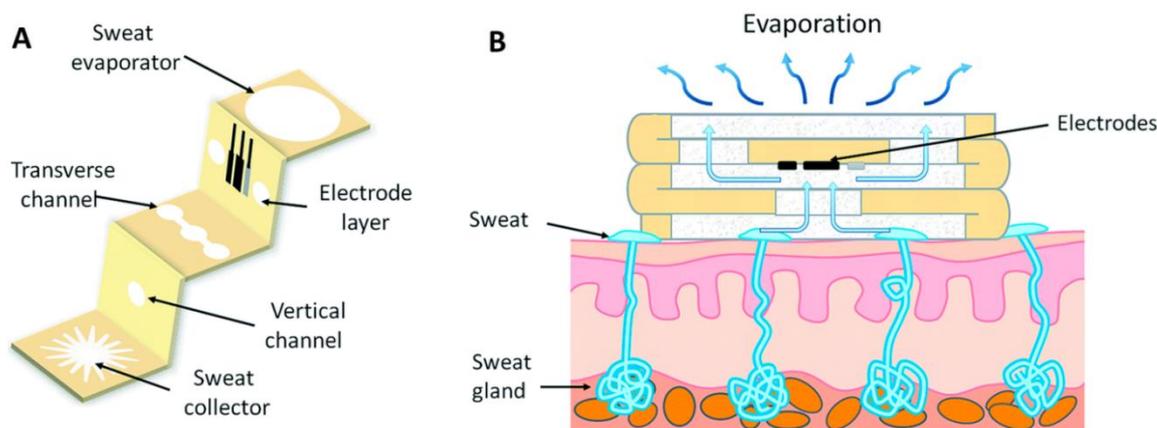


Figura 9: diagramma schematico del dispositivo elettrochimico integrato tridimensionale basato sulla carta e un sistema microfluidico (3D – PMED). (A) Struttura a strati aperta del sensore, inclusi il collettore di sudore, il canale verticale, il canale trasversale, lo strato con gli elettrodi e la superficie di evaporazione del sudore. L’area gialla è formata da materiale idrofobo, costruito con cera stampata con la tecnica di screen – printing. L’area bianca è formata da materiale idrofilo realizzata da carta da filtro. (B) diagramma schematico del 3D – PMED applicato alla pelle umana. Piegando il dispositivo si creano dei canali 3D, per favorire il flusso del sudore dalla superficie dell’epidermide alla zona sensibile. Questo fluire favorisce anche il continuo rinnovamento del fluido biologico da analizzare. [8]

2.3.2 Elettronica integrata dei sensori

Una volta che la raccolta, il trasporto e la rilevazione del campione di sudore è completata, è necessario processare il segnale e trasmetterlo. Con l’utilizzo di dispositivi portatili per l’analisi continua e rapida, non si può usare una strumentazione da laboratorio per l’elaborazione. Infatti, sarebbe molto pesante e ingombrante, dunque è in grande sviluppo la ricerca per implementare dispositivi che abbiano integrata anche l’elettronica necessaria per svolgere tale processo. Per adempiere a questo scopo si sviluppano circuiti miniaturizzati, sistemi di trasmissione wireless e moduli di alimentazione sempre più efficienti, miniaturizzati e flessibili. La strumentazione elettronica processa i segnali elettrici prodotti dal sensore, questi segnali elettrici vengono condizionati attraverso amplificatori e filtri che riducono il rumore e segnali di disturbo, per esempio la frequenza di rete. In particolare, i componenti per svolgere tali operazioni sono i microprocessori, sistemi di memoria, convertitori analogici – digitali e digitali – analogici

(ADC/DAC). Essi lavorano tutti insieme per adattare e controllare il flusso del segnale. Inoltre, essi sono in grado di comunicare con altri dispositivi grazie alla trasmissione dei dati, per rendere possibile la loro visualizzazione e una successiva elaborazione su computer o cellulari.

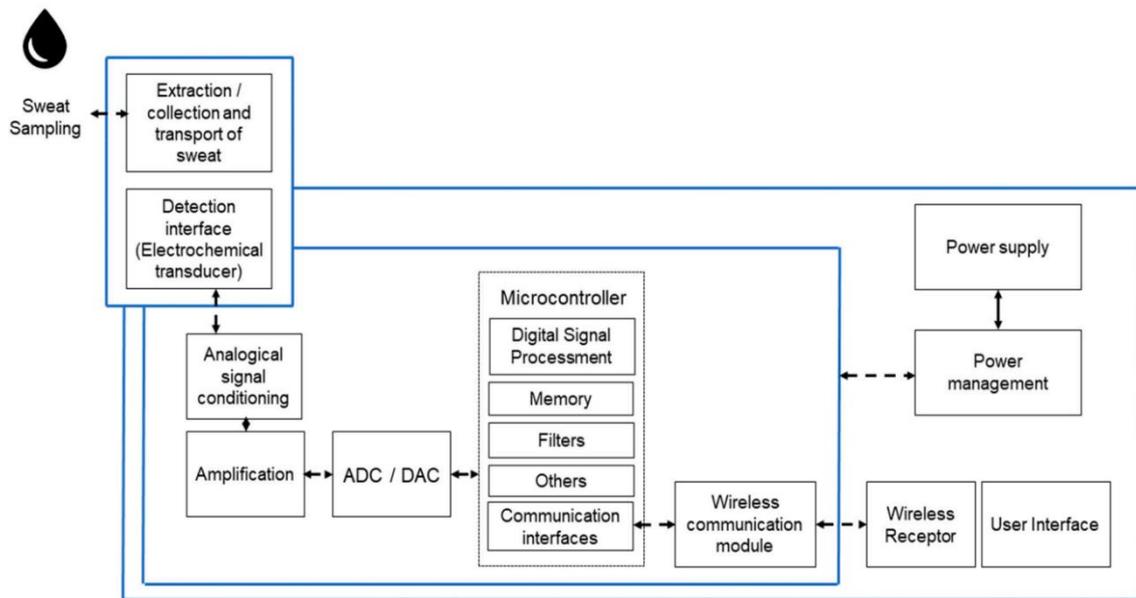


Figura 10: diagramma a blocchi schematico dei fondamentali componenti elettronici dei sensori elettrochimici indossabili per l'analisi del sudore.

L'elaborazione delle informazioni e la trasmissione di esse coinvolgono segnali elettrici o ottici che vengono trasferiti dal dispositivo elettrico a un altro in una forma comprensibile per l'utilizzatore. Un elemento per il processamento dei dati comunemente usato è il circuito stampato flessibile (FPCB). Tale componente permette una efficiente elaborazione dei dati mantenendo l'indipendenza e la selettività delle singole operazioni del sensore. In ogni caso, per i dispositivi indossabili bisogna garantire una soluzione comoda con una buona prestazione meccanica, un basso peso, semplicità nell'adattarsi al corpo umano e una sicurezza sui materiali biocompatibili. Per quanto riguarda la trasmissione dei dati vengono utilizzati varie modalità, tra cui il Bluetooth, la comunicazione di prossimità (NFC) e la identificazione a radio frequenza (RFID). La prima tecnica può comunicare fino a 100 metri di distanza e trasmette molti più dati delle altre opzioni. Inoltre, essa ha il grande vantaggio di non emettere radiazioni, molto più user – friendly e non ha impatto sull'ambiente. La seconda possibilità opera a frequenze di circa 13.56 MHz e permette una distanza di comunicazione di 20 centimetri. La massima velocità di trasmissione è inferiore al Bluetooth, ma non necessita che i dispositivi siano connessi in

precedenza. Infatti, la connessione tra due dispositivi attraverso la NFC avviene in 0.1 secondi. L'ultima opzione utilizza le onde elettromagnetiche. Tipicamente il tempo di trasmissione è estremamente basso, meno di cento millisecondi. La forza di questo metodo è la capacità, grazie alle alte frequenze, di verificare e accedere contemporaneamente a multipli profili di informazione, che facilita molto le performance. La scelta del metodo da utilizzare dipende da molti fattori, come il consumo di energia, la velocità di generazione dei dati, la larghezza di banda richiesta e la compatibilità con gli altri sensori del circuito elettrico. Inoltre, per facilitare l'osservazione dei dati, molti sensori elettrochimici indossabili hanno applicativi che permettono di avviare il rilevamento e la registrazione dei dati da remoto, che poi possono essere visualizzati da un cellulare o un orologio. Infine, le informazioni ricavate dal sensore possono essere mappate per calcolare parametri di salute o benessere attraverso delle curve di calibrazione e algoritmi per il controllo a feedback. Un ulteriore aspetto interessante è l'alimentazione di questi dispositivi. La batteria, infatti, deve garantire il funzionamento del sensore per periodi anche lunghi. La riduzione dei consumi e lo sviluppo di sistemi di energia efficienti per i dispositivi indossabili è un obiettivo della ricerca moderna. In questo momento esistono principalmente due categorie utilizzate: accumulatore agli ioni di litio e dispositivi per la raccolta di energia. I primi offrono il vantaggio di una vita molto lunga e una ricarica veloce. Purtroppo, tale tipologia non permette una sufficiente miniaturizzazione, dunque non soddisfano le richieste dei sensori in questione. Negli ultimi anni sono state ricercate delle modalità per rendere le batterie agli ioni di litio flessibili, per poterle utilizzare. Però tali batterie presentano anche il rischio di esplodere e di essere causa di problemi di sicurezza. Tuttavia, per soddisfare la richiesta dei dispositivi, senza aver bisogno di pause per la ricarica, si sono sviluppati metodi innovativi di accumulo dell'energia. Alcuni esempi sono le celle solari, nano generatori triboelettrici (TENGs) e pile a combustibile microbiologica (BFCs) per raggiungere un funzionamento autosostenibile. La cella fotovoltaica deve flessibile ha una alta capacità di auto ricarica e di accumulo dell'energia. Invece, la tecnologia BFCs è in grado di convertire molecole come il lattosio, il glucosio, l'acido urico o l'etanolo presente nei fluidi biologici in energia per caricare il sensore e anche dispositivi impiantati come pacemaker, pompe o elettrodi stimolatori. Tal metodo viene realizzato con un processo di screen printing su una base estendibile con un inchiostro adattato. Tuttavia, il limite del BFC è che la tensione di uscita richiede ulteriore elettronica che ostacola la flessibilità del dispositivo. Infine, la tecnica con nano generatori triboelettrici converte l'energia meccanica generata dal movimento umano in energia elettrica grazie all'accoppiamenti di induzione e a effetti elettrici frizionali. Questa fonte di energia non dipende da fattori esterni, come il sole; dunque, trova buone applicazioni per sensori indossabili di sudore durante l'attività fisica intensa. Tutte queste tecnologie di

accumulo dell'energia hanno la capacità di mantenere molta più energia per unità di volume delle comuni batterie. Oltre a ciò, sono prodotte da fattori ambientali o biologici e la accumulano in super capacitori che riescono a fornire l'elettricità necessaria per il funzionamento dei sensori anche per periodo lunghi. Perciò la prospettiva sarà di raggiungere il mantenimento dei dispositivi con un'auto alimentazione di questa tipologia. [11], [12], [8]

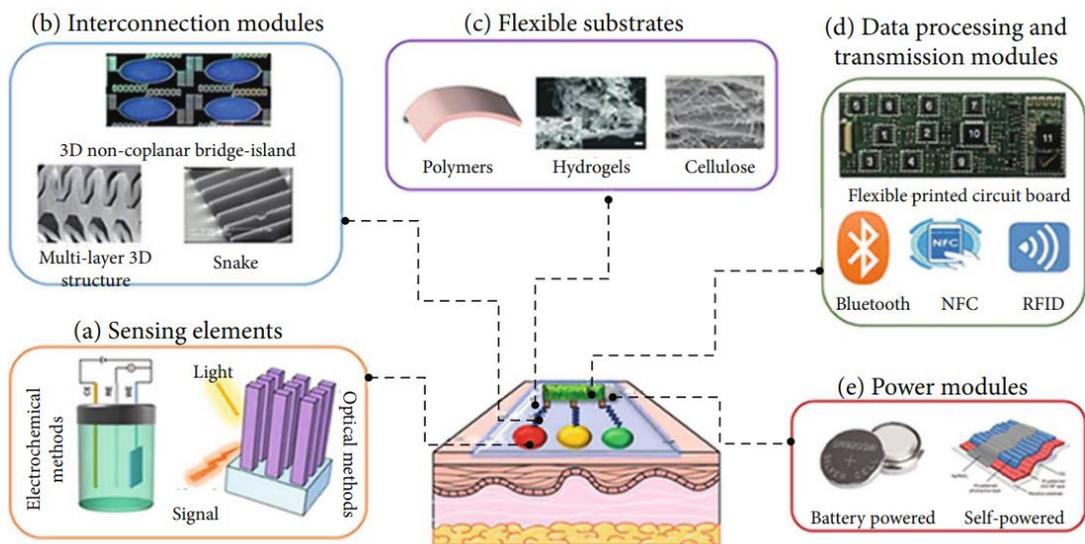


Figura 11: illustrazione dei cinque componenti fondamentali di un sensore indossabile per il sudore. Essi sono: l'elemento sensibile, il modulo di interconnessione, il substrato flessibile, il modulo di elaborazione dei dati e trasmissione e la ricarica. [11]

CAPITOLO 3:

ESPERIENZA IN LABORATORIO DI MISURE

3.1 Calibrazione di sensori

La taratura di un dispositivo è un'operazione eseguita in condizioni specificate, suddivisa in due fasi. Nella prima fase, si determina la relazione tra le indicazioni date dallo strumento ed i valori di uno o più campioni, con la relativa incertezza di misura. Nella seconda fase, le informazioni ottenute sono utilizzate per stabilire una relazione che permette di ottenere un risultato di misura dall'indicazione fornita dallo strumento. La regolazione di un sistema di acquisizione, invece, è un insieme di operazioni svolte su un sistema di misura affinché esso fornisca indicazioni prescritte in corrispondenza di determinati valori di grandezze da sottoporre a misurazione. Nello specifico, nel caso di sensori elettrochimici, la regolazione consiste nella ripetuta valutazione con concentrazioni note in modo da regolare la curva di taratura in base alle nuove condizioni di laboratorio.

3.2 Attività di calibrazione in laboratorio

Nel caso trattato per questo elaborato, si è svolta la calibrazione di due sensori stampati differenti. In particolare, è stata utilizzata una soluzione di cloruro di sodio a concentrazioni crescenti per ottenere una curva di calibrazione. La misurazione è stata realizzata con un multimetro e successivamente i dati sono stati elaborati con il software di calcolo MatLab.



Figura 12: multimetro Keysight 34461A utilizzato per l'esperienza.

Nei prossimi paragrafi viene specificata l'analisi svolta per un sensore elettrochimico stampato impedenziometrico e uno potenziometrico. Tali sensori sono stati realizzati con una stampante Inkjet Dimatix della Fujifilm. La stampa ink – jet è una tecnica che permette la deposizione di materiali in fase liquida attraverso goccioline controllate. Tale tecnica permette la stampa su substrati di forme irregolari, fondamentale per le applicazioni dei sensori indossabili.



FUJIFILM
Value from Innovation

Figura 13: stampante Dimatix Materials DMP-2850 della Fujifilm

Gli elettrodi utilizzati nell'analisi sono stati realizzati tramite una tecnica di elettronica stampata utilizzando la stampante a getto di inchiostro Dimatix DMP 2850. Per garantire la massima flessibilità in future applicazioni in vitro o in vivo degli elettrodi MEA è stato selezionato un substrato di polimide (Kapton, spessore 25 micrometri). L'inchiostro selezionato è una soluzione di nanoparticelle di argento in un solvente organico (inchiostro codice I40DM-106 della Silver PVNanocell) caratterizzato da un'elevata conducibilità e ottima adesione su substrati flessibili. La geometria è stata realizzata tramite il software inkscape che permette la progettazione direttamente in pixel, in modo da favorire la corretta esportazione nel formato bitmap accettato dalla stampante, nonché una più semplice gestione delle dimensioni, previa conoscenza del drop-spacing, ovvero la distanza tra le varie goccioline che verrà impostata nella stampante. Una volta caricata la geometria, il substrato è stato pulito con alcool isopropilico per rimuovere eventuali particelle di polvere o sporco e migliorare la regolarità del substrato incontrato dall'inchiostro. Il substrato inoltre è stato mantenuto a 60 °C costanti per tutta la durata della stampa per favorire una prima asciugatura. Una volta realizzata la stampa, i sensori sono stati sinterizzati a circa 200 gradi e conservati in glove box per evitarne l'ossidazione fino all'utilizzo.

3.2.1 Sensore impedenziometrico stampato

La calibrazione del sensore elettrochimico impedenziometrico è stata svolta in varie fasi. La prima fase consiste nel collegamento degli elettrodi con il multimetro attraverso due cavi. La connessione è stata fissata con del nastro conduttivo e successivamente chiusa da nastro isolante. Lo strumento fornisce in uscita il valore di impedenza corrispondente alla concentrazione specifica.

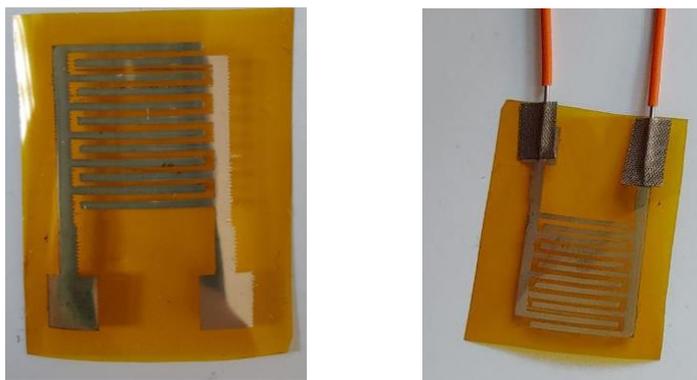


Figura 14: a sinistra sensore elettrochimico impedenziometrico stampato, a destra stesso sensore con collegamenti e nastro conduttivo applicato.

La seconda fase comprende l'incubazione del sensore con una soluzione contenente diverse concentrazioni di sodio cloruro e la misura dell'impedenza corrispondente. Le soluzioni utilizzate sono soluzioni di acqua e cloruro di sodio a concentrazioni di 0.25 molare, 0.5 molare e 1 molare. Come base si è proceduti con la misura della soluzione a 0 molare, cioè l'acqua deionizzata. Non è stata utilizzata l'acqua comune, potabile, poiché anche se non salata, dunque a concentrazione di cloruro di sodio nulla, essa contiene altri sali minerali, ovvero ioni. Essi permettono il passaggio di corrente, dunque l'impedenza risultante sarebbe molto bassa; invece, nel caso della soluzione base ci aspetteremmo una misura molto alta. Per garantire che la soluzione aderisca completamente alla superficie del sensore si utilizza un foglio di tessuto non tessuto. Dopo l'applicazione è necessario aspettare diverso tempo perché la misura vada a regime. Infatti, bisogna attendere che si formano le correnti tra i terminali del sensore. Più ioni sono presenti, maggiore sarà la facilità con cui si formano i passaggi di corrente. Dunque, ci aspetteremo che più sarà concentrata la soluzione, minore sarà il valore di impedenza. Raggiunto un valore stabile si procede al salvataggio dei file su una chiavetta USB per consentire l'elaborazione successiva delle informazioni ottenute.

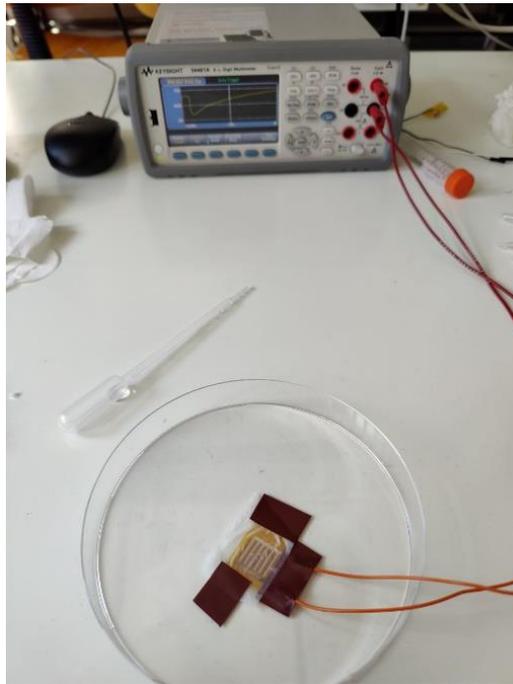


Figura 15: zona di lavoro per la misurazione di impedenza. Sono presenti il sensore, il multimetro, i cavi e una pipetta per facilitare l'applicazione della soluzione da analizzare.

La terza fase si svolge sul software di calcolo MatLab. Per prima cosa vanno scaricati i dati sul computer che si presentano come tabella, e poi inseriti sul programma di elaborazione. A questo punto viene fatta la media sui campioni in cui il valore si è stabilizzato e poi si procede a graficare tali valori sul valore di concentrazione corrispondente. Tale grafico prende il nome di curva di calibrazione. Nello specifico caso dei valori di impedenza si nota come all'aumentare della concentrazione il valore di impedenza cali. Di seguito viene riportata la tabella delle misure svolte e la conseguente curva di calibrazione.

	1 misura	2 misura	3 misura	4 misura
Concentrazione (Mol)	0.00	0.25	0.50	1.00
Impedenza (Ohm)	85.903×10^6	62.569×10^3	34.393×10^3	25.837×10^3

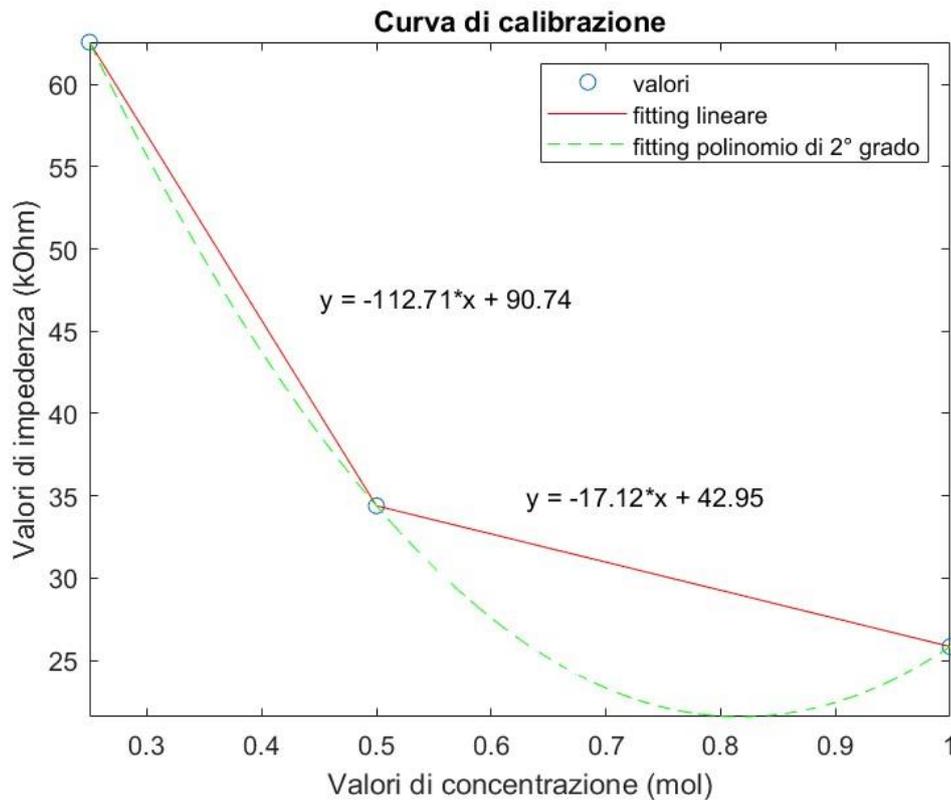


Figura 16: curva di calibrazione del sensore elettrochimico impedenziometrico con soluzione di acqua e cloruro di sodio a concentrazioni crescenti.

Dalla curva di calibrazione ottenuta possiamo osservare che la sensibilità del sensore, ovvero la pendenza della curva stessa, è maggiore nell'intervallo di concentrazioni tra 0.25 e 0.5 M, con un valore di 112.71 kOhm/mol; invece si abbassa per concentrazioni che tendono a 1 M con un valore di 17.12 kOhm/mol. Ciò significa che il sensore impedenziometrico risulta più sensibile per piccole variazioni di concentrazione.

3.2.2 Sensore potenziometrico stampato

La calibrazione del sensore elettrochimico potenziometrico si svolge attraverso fasi uguali all'analisi precedente, utilizzando la medesima strumentazione, con piccole accortezze.

Dunque, la prima fase consiste nel collegamento degli elettrodi con il multimetro attraverso due cavi. Tale sensore ha però tre elettrodi, quello centrale chiamato elettrodo di riferimento e due elettrodi laterali, gli elettrodi di lavoro. Su questi elettrodi è stata applicata una membrana selettiva per gli ioni sodio, Na^+ . La membrana selettiva è stata preparata con 1.5×10^{-3} moli di ionofori di sodio, 0.940×10^{-3} moli di Na-TFPB, 232.420×10^{-3} moli di DOS e PVC, tutti sciolti in tetraidrofurano. È necessario mescolarli fino ad ottenere la membrana selettiva in soluzione trasparente. Successivamente viene strettamente sigillata e conservata a 4° centigradi fino all'utilizzo. La connessione è stata fissata con del nastro conduttivo e successivamente chiusa da nastro isolante. Lo strumento fornisce in uscita il valore della differenza di potenziale tra l'elettrodo di riferimento e un elettrodo dei due aventi la membrana. In questo modo, si misura una differenza di potenziale che dipende dalla concentrazione di cloruro di sodio della soluzione. In particolare, gli ioni sodio dissociati all'interno dell'acqua reagiranno con gli ionofori presenti sulla membrana selettiva, rendendo il potenziale di quell'elettrodo più positivo. Dunque, più alta sarà la concentrazione di cloruro di sodio, maggiore la differenza di potenziale. [13]

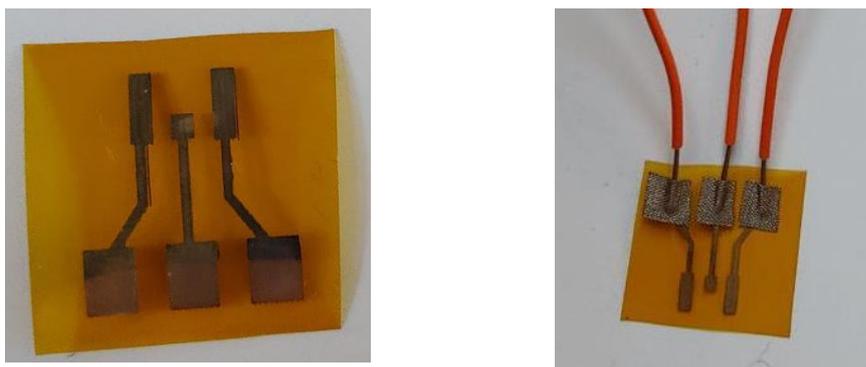


Figura 17: a sinistra sensore elettrochimico potenziometrico stampato, a destra stesso sensore con collegamenti e nastro conduttivo applicato.

La seconda fase comprende l'applicazione della soluzione da investigare e la misura della differenza di potenziale corrispondente. Le soluzioni utilizzate sono medesime all'analisi precedente con concentrazioni di 0.5 molare e 1 molare. Come base si è proceduti con la misura della soluzione a 0 molare, cioè l'acqua deionizzata. In questo caso una goccia di fluido è stata applicata direttamente sul sensore con pipetta, con l'attenzione di applicarla sopra la membrana e sull'elettrodo di riferimento. Dopo l'applicazione bisogna aspettare diverso tempo perché la misura vada a regime. Raggiunto un valore stabile si procede al salvataggio dei file su una chiavetta USB per consentire l'elaborazione successiva delle informazioni ottenute.

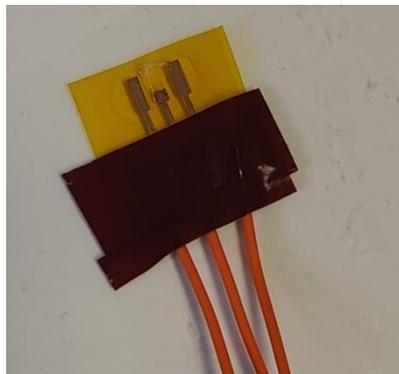


Figura 18: sensore elettrochimico potenziometrico in cui si può notare la membrana selettiva applicata sugli elettrodi laterali.

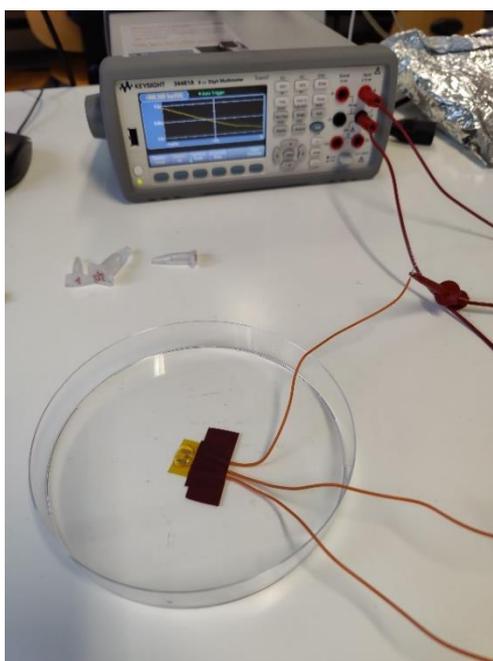


Figura 19: zona di lavoro per la misurazione della differenza di potenziale. Sono presenti il sensore, il multimetro, i cavi e una pipetta per facilitare l'applicazione della soluzione da analizzare. Si può osservare la goccia di soluzione applicata sul sensore.

La terza fase si svolge sul software di calcolo MatLab. Per prima cosa vanno scaricati i dati sul computer che si presentano in una tabella, e poi inseriti sul programma di elaborazione. A questo punto viene fatta la media sui campioni in cui il valore si è stabilizzato e poi si procede a graficare tali valori sul valore di concentrazione corrispondente. Tale grafico prende il nome di curva di calibrazione. In particolare, all'aumentare della concentrazione di cloruro di sodio, aumenta la differenza di potenziale. Di seguito viene riportata la tabella delle misure svolte e la conseguente curva di calibrazione.

	1 misura	2 misura	3 misura
Concentrazione (Mol)	0.00	0.50	1.00
Differenza di potenziale (mV)	-0.0995	0.0231	0.0250

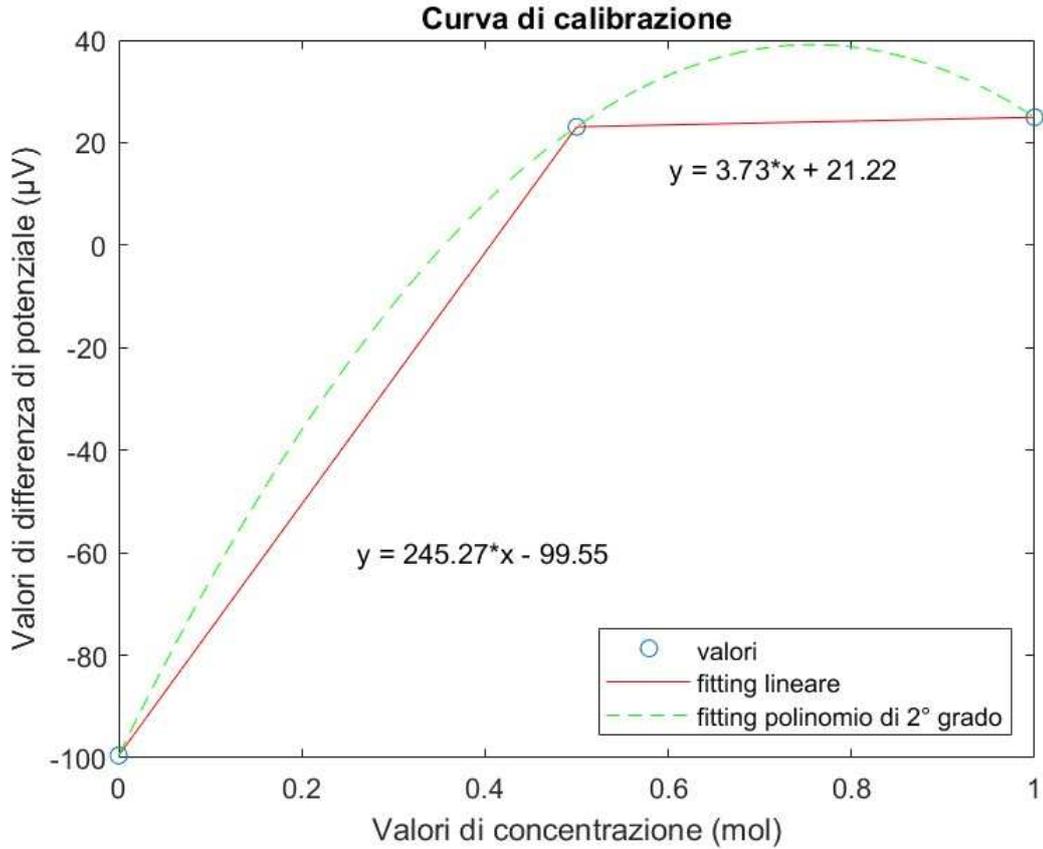


Figura 20: curva di calibrazione del sensore elettrochimico potenziometrico con soluzione di acqua e cloruro di sodio a concentrazioni crescenti.

Dalla curva di calibrazione ottenuta possiamo osservare che la sensibilità del sensore, ovvero la pendenza della curva stessa, è maggiore nell'intervallo di concentrazioni tra 0 e 0.5 M, con un valore di $245.27 \mu\text{V}/\text{mol}$; invece, si abbassa e rimane quasi stabile per concentrazioni che tendono a 1M, con un valore di $3.73 \mu\text{V}/\text{mol}$. Ciò significa che il sensore potenziometrico è più sensibile per concentrazioni inferiori a 0.5M, mentre subisce un fenomeno di saturazione avvicinandosi a concentrazioni di 1M.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

4.1 Opportunità e sfide future

Il sudore umano rappresenta un fluido biologico molto prezioso per molti motivi. Grazie ad esso si ha la possibilità di ricavare informazioni utili per la diagnosi, il monitoraggio di malattie croniche, la condizione fisiologica del paziente, sia in ambito ospedaliero che sportivo. Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi per la realizzazione di sensori per il sudore, soprattutto per farli diventare indossabili e flessibili, con forme e materiali sempre più innovativi. Le sfide da dover affrontare per migliorarli sono ancora molteplici. Un esempio potrebbe essere aumentare la loro sensibilità per ioni che sono presenti in concentrazioni basse e migliorare i metodi per collezionare i campioni di sudore. Un altro aspetto importante è l'auto alimentazione di tali dispositivi, di grande aiuto per analisi continue per lunghi periodi, mantenendo una certa stabilità della misura. In questo campo si stanno cercando materiali e tecniche nuove con proprietà significative per l'accumulo di energia chimica o biologica o solare. Inoltre, lo sviluppo dei sensori elettrochimici per il sudore richiede più sensibilità, alta selettività nella rilevazione degli analiti e che la trasduzione si integri bene con gli altri circuiti elettronici presenti nel dispositivo. La ricerca si sta concentrando nello studio dei biosensori per diminuire il limite di rilevazione (LOD) e per aumentare la sensibilità, insieme a una più lunga durata sotto condizioni di lavoro. Per quanto riguarda invece l'elaborazione dei segnali derivati dai sensori elettrochimici per il sudore è fondamentale che sia gestita al meglio per enfatizzare le proprietà del dispositivo. Questo obiettivo si sviluppa in vari step che coinvolgono filtri per il rumore, l'identificazione e la caratterizzazione di eventi rilevanti nel segnale e la loro interpretazione. Tali strumenti sono fondamentali per instaurare una relazione corretta tra il segnale primario e la concentrazione di analiti e i relativi indici di salute. Solitamente si utilizzano diversi algoritmi, anche se negli ultimi tempi si sta sviluppando l'apprendimento automatico, detto machine learning (ML), sottoinsieme dell'intelligenza artificiale. Tale tecnica

facilita l'interpretazione e il processamento dei segnali, riuscendo a trovare anche una correlazione tra segnali, aumentando il grado di sicurezza e affidabilità delle misure. Nonostante tutte le difficoltà da dover affrontare, i sensori elettrochimici indossabili per la quantizzazione di ioni nel sudore hanno una grande potenzialità in ambito della telemedicina e del benessere delle persone, rendendo il controllo fisiologico più agevole e accessibile a tutti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Sardini, M. Serpelloni, and S. Tonello, "Printed electrochemical biosensors: Opportunities and metrological challenges," *Biosensors*, vol. 10, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2020. doi: 10.3390/bios10110166.
- [2] S. Khan, S. Ali, and A. Bermak, "Recent developments in printing flexible and wearable sensing electronics for healthcare applications," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 5. MDPI AG, Mar. 01, 2019. doi: 10.3390/s19051230.
- [3] A. Ma'mun, M. K. Abd El-Rahman, and M. Abd El-Kawy, "Real-time potentiometric sensor; an innovative tool for monitoring hydrolysis of chemo/bio-degradable drugs in pharmaceutical sciences," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 154, pp. 166–173, May 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.02.007.
- [4] G. Avanzolini and E. Magosso, *Strumentazione biomedica - Progetto e impiego dei sistemi di misura*. 2015.
- [5] J. Leva-Bueno, S. A. Peyman, and P. A. Millner, "A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 209, no. 3. Springer, pp. 343–362, Jun. 01, 2020. doi: 10.1007/s00430-020-00668-0.
- [6] J. Ding and W. Qin, "Recent advances in potentiometric biosensors," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 124. Elsevier B.V., Mar. 01, 2020. doi: 10.1016/j.trac.2019.115803.
- [7] V. Kumar, R. Suri, and S. Mittal, "Review on new ionophore species for membrane ion selective electrodes," *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 20, no. 3. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 509–540, Mar. 01, 2023. doi: 10.1007/s13738-022-02708-3.
- [8] E. Bilbao *et al.*, "Electrochemical Sweat Sensors," *Chemosensors*, vol. 11, no. 4. MDPI, Apr. 01, 2023. doi: 10.3390/chemosensors11040244.
- [9] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, and A. Mulchandani, "Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications," *Sensors*, vol. 21, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/s21196578.

- [10] S. Tonello, G. Abate, M. Borghetti, N. F. Lopomo, M. Serpelloni, and E. Sardini, “How to Assess the Measurement Performance of Mobile/Wearable Point-of-Care Testing Devices? A Systematic Review Addressing Sweat Analysis,” *Electronics (Switzerland)*, vol. 11, no. 5. MDPI, Mar. 01, 2022. doi: 10.3390/electronics11050761.
- [11] W. Ji *et al.*, “Wearable Sweat Biosensors Refresh Personalized Health/Medical Diagnostics,” *Research*, vol. 2021, Jan. 2021, doi: 10.34133/2021/9757126.
- [12] F. Gao *et al.*, “Wearable and flexible electrochemical sensors for sweat analysis: a review,” *Microsystems and Nanoengineering*, vol. 9, no. 1. Springer Nature, Dec. 01, 2023. doi: 10.1038/s41378-022-00443-6.
- [13] B. Paul, S. Demuru, C. Lafaye, M. Saubade, and D. Briand, “Printed Iontophoretic-Integrated Wearable Microfluidic Sweat-Sensing Patch for On-Demand Point-Of-Care Sweat Analysis,” *Adv Mater Technol*, vol. 6, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.1002/admt.202000910.
- [14] M. S. Cosio, M. Scampicchio, and S. Benedetti, “Electronic Noses and Tongues,” in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Elsevier, 2012, pp. 219–247. doi: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00008-X.
- [15] M. Carminati, “Advances in High-Resolution Microscale Impedance Sensors,” *Journal of Sensors*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017. doi: 10.1155/2017/7638389.
- [16] E. B. Bahadir and M. K. Sezgintürk, “A review on impedimetric biosensors,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 44, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 248–262, Jan. 01, 2016. doi: 10.3109/21691401.2014.942456.

*Grazie con tutto il cuore alla mia famiglia
che mi ha permesso di seguire i miei sogni
sostenendomi nel farlo*