



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“IL MONITORAGGIO NON INVASIVO DELLA GLICEMIA NELLA
TERAPIA DEL DIABETE: DISPOSITIVI BASATI SUL PRINCIPIO DELLA
IONOFRESI INVERSA”**

Relatore: Prof. Andrea Facchinetti

Laureando: Alex Clementi

ANNO ACCADEMICO 2021 –2022

20 settembre 2022

Indice

Sommario.....	1
1. Il diabete e il suo monitoraggio.....	2
1.1. La malattia.....	2
1.2. Classificazione del diabete.....	3
1.2.1. Diabete di tipo 1.....	3
1.2.2. Diabete di tipo 2.....	4
1.3. Monitoraggio del glucosio: metodi invasivi.....	4
1.3.1. Sensori per l'automonitoraggio non continuo.....	5
1.3.2. Sensori per il monitoraggio continuo.....	5
2. Metodi non invasivi per il monitoraggio della glicemia.....	7
2.1. Lo scopo dei metodi non invasivi	7
2.2. Spettroscopia infrarossa.....	7
2.2.1. Spettroscopia NIR.....	8
2.2.2. Spettroscopia MIR.....	10
2.3. Spettroscopia Raman.....	11
2.4. Dispositivi basati sulla fluorescenza.....	12
2.5. Dispositivi che sfruttano i liquidi corporei	13
2.5.1. Sudore.....	13
2.5.2. Lacrime	15
2.5.3. Liquido interstiziale (ISF)	18
3. La ionoforesi inversa per il monitoraggio della glicemia.....	19
3.1. La ionoforesi inversa (RI).....	19
3.2. I primi dispositivi: GlucoWatch	20
3.3. I principali fattori per l'estrazione di molecole di glucosio	21
3.4. Apparecchio "SugarBEAT"	22
3.5. Lo sviluppo dei tatuaggi temporanei.....	23
3.6. Come operare nel futuro	26
Conclusioni	27
Bibliografia.....	28

Sommario

Il diabete è una malattia cronica caratterizzata da un livello di glucosio nel sangue anormale. Questo livello, definito glicemia, deve essere mantenuto in equilibrio nel corpo umano, dato che né un livello alto e né un livello basso sono salutari per il nostro organismo. Per questo è importante monitorare frequentemente il glucosio nel sangue. I dispositivi più utilizzati per il monitoraggio della glicemia sono degli apparecchi invasivi che necessitano di frequenti punture che causano infezioni e malessere nei pazienti e in generale un peggioramento della qualità della vita delle persone affette, portando molti individui a non controllare la glicemia. Nel mondo quasi mezzo miliardo di persone ne sono affette e il numero è in continuo aumento.

I problemi legati ai dispositivi invasivi per il monitoraggio della glicemia hanno portato le industrie a pensare a tecniche non invasive. Nel tempo si sono sviluppati diversi metodi non invasivi che potrebbero portare ad un miglioramento sia nella vita dei pazienti, i quali non sarebbero più costretti a frequenti punture e ciò limiterebbe le infezioni e i malesseri, che nei metodi di controllo, ottenendo tecniche che forniscono di continuo informazioni importanti per il controllo medico. È probabile, inoltre, che una diminuzione del dolore e un aumento del comfort nelle tecniche di monitoraggio portino ad una maggiore disponibilità dei pazienti al controllo frequente del livello di glucosio nel sangue.

Questa tesi si propone di descrivere il diabete e i dispositivi invasivi utilizzati attualmente, per poi concentrarsi sulle nuove tecnologie non invasive e in particolare sui dispositivi che sfruttano la ionoforesi inversa.

CAPITOLO 1

IL DIABETE E IL SUO MONITORAGGIO

1.1 LA MALATTIA

Il *diabete* mellito è una malattia cronica che riguarda il processo metabolico. Si nota quando c'è un livello di glucosio nel sangue (glicemia) anormale causato da difetti nella secrezione di insulina, nell'azione dell'insulina, o entrambi. La glicemia viene regolata attraverso l'azione di due ormoni, insulina e glucagone: quando il livello di glucosio nel sangue è alto, le cellule beta presenti nel pancreas vengono attivate per rilasciare l'insulina, l'ormone che consente al glucosio l'ingresso nelle cellule e il suo conseguente utilizzo come fonte energetica; quando invece la concentrazione di glucosio nel sangue è bassa, le cellule alfa del pancreas sono stimolate a rilasciare il glucagone, che segnala al fegato di convertire il glicogeno immagazzinato in glucosio per raggiungere l'omeostasi. Quando vi è un'alterazione di questo meccanismo, il glucosio si accumula nel sangue, causando iperglicemia.

L'iperglicemia cronica del diabete è associata a danni a lungo termine, disfunzioni e insufficienza di diversi organi, in particolare occhi, reni, nervi, cuore e vasi sanguigni. Diversi processi patogeni sono coinvolti nello sviluppo del diabete. Questi variano dalla distruzione autoimmune delle cellule beta del pancreas con conseguente carenza di insulina ad anomalie che si traducono in resistenza all'azione dell'insulina. La base delle anomalie nel metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine nel diabete è l'azione carente dell'insulina sui tessuti bersaglio. L'azione insulinica carente deriva da una secrezione insulinica inadeguata e/o da risposte tissutali all'insulina diminuite in uno o più punti delle complesse vie di azione ormonale. I sintomi di una marcata iperglicemia includono poliuria, polidipsia, perdita di peso, e visione offuscata. Le complicanze a lungo termine del diabete includono retinopatia con potenziale perdita della vista, nefropatia che porta a insufficienza renale e neuropatia periferica con rischio di amputazioni [1].

Mantenere un livello di glucosio nel range normale è essenziale per evitare delle complicazioni che mettono in pericolo la vita: bassi valori (ipoglicemia) possono mettere in pericolo la sopravvivenza

delle cellule neuronali, mentre alti livelli di glucosio (iperglicemia) possono causare gravi problemi di salute come già visto. L'ipoglicemia è definita come un livello del glucosio nel sangue sotto 70 mg/dL, mentre l'iperglicemia si ha quando il livello di zuccheri supera 120 o 180 mg/dL quando si è a digiuno o dopo i pasti. L'incidenza dei casi di diabete sta crescendo significativamente a livello globale: oltre 420 milioni di persone affette in tutto il mondo e una prevalenza globale prevista di 642 milioni entro il 2040.

1.2 CLASSIFICAZIONE DEL DIABETE

La stragrande maggioranza dei casi di diabete rientrano in due ampie categorie: il diabete di tipo 1 e quello di tipo 2. Queste due forme comuni di diabete sono diverse dal diabete gestazionale che consiste in un elevato livello di glucosio nel sangue che compare solamente durante il secondo o il terzo trimestre della gravidanza.

1.2.1 DIABETE DI TIPO 1

In questa forma di diabete, che rappresenta solo il 5-10% delle persone malate, in precedenza chiamato diabete insulino-dipendente o diabete a insorgenza giovanile, la causa è una carenza assoluta di secrezione di insulina che risulta per una distruzione autoimmune delle cellule beta del pancreas. Questo perché degli anticorpi presenti sulle cellule che secernono l'insulina riconoscono come estranee le cellule beta e le attaccano.

In questa forma di diabete, il tasso di distruzione delle cellule beta è abbastanza variabile, essendo rapido in alcuni individui (principalmente neonati e bambini) e lento in altri (principalmente adulti). Alcuni pazienti, in particolare bambini e adolescenti, possono presentare chetoacidosi come prima manifestazione della malattia. Altri hanno una modesta iperglicemia a digiuno che può cambiare rapidamente in una grave iperglicemia e/o chetoacidosi diabetica in presenza di infezione o altro stress. Anche se i pazienti sono raramente obesi quando presentano questo tipo di diabete, la presenza dell'obesità non è incompatibile con la diagnosi.

1.2.2 DIABETE DI TIPO 2

Questa forma di diabete, che rappresenta il 90-95% delle persone colpite ed è quindi molto più diffuso, precedentemente indicato come diabete non insulino-dipendente, diabete di tipo 2, o diabete ad adulto insorgenza, comprende le persone che hanno una insulino-resistenza e di solito hanno una carenza di insulina; la causa è quindi una combinazione di resistenza all'azione dell'insulina e una risposta secretoria insulinica compensativa inadeguata; può essere presente per un lungo periodo di tempo un grado di iperglicemia sufficiente a causare cambiamenti patologici e funzionali in vari tessuti bersaglio prima che il diabete venga rilevato.

Almeno inizialmente, e spesso per tutta la loro vita, questi individui non hanno bisogno del trattamento dell'insulina per sopravvivere. Anche se le eziologie specifiche non sono conosciute, la distruzione autoimmune delle cellule beta non accade. La maggior parte dei pazienti con questa forma di diabete sono obesi e l'obesità stessa causa un certo grado di resistenza all'insulina. Questa forma di diabete viene spesso non diagnosticata per molti anni perché l'iperglicemia si sviluppa gradualmente e nelle fasi precedenti non è abbastanza elevata e perciò nel paziente non si nota uno dei sintomi classici del diabete. In questi pazienti, la secrezione di insulina è difettosa e insufficiente a compensare la resistenza all'insulina [2].

La resistenza all'insulina può migliorare con la riduzione del peso e/o il trattamento farmacologico di iperglicemia, ma viene raramente ripristinato alla normalità. Il rischio di sviluppare questa forma di diabete aumenta con l'età, l'obesità e la mancanza di attività fisica. Se l'iperglicemia non viene tenuta sotto controllo, il diabete progredisce e nel lungo termine può creare serie complicanze a tutti gli organi.

1.3 MONITORAGGIO DEL GLUCOSIO: METODI INVASIVI

Siccome ancora non sono state trovate cure per il diabete, un monitoraggio continuo e il controllo della concentrazione di glucosio nel sangue sono l'unica soluzione per ottimizzare lo stile di vita dei diabetici e per prevenirli dall'andare in contro a complicazioni.

Diverse tecniche di monitoraggio del glucosio sono state scoperte recentemente e queste tecnologie sono classificate sulla base dei loro meccanismi in invasive, poco invasive e non invasive. Quelle invasive sono il riferimento principale e sono largamente le più impiegate per la misura del glucosio nel sangue. Ci sono due tipi di dispositivi usati per l'uso personale e per avere una valutazione autonoma: quelli per il monitoraggio non continuo (NCGM, Non Continuous Glucose Monitoring) e quelli per il monitoraggio continuo (CGM, Continuous Glucose Monitoring).

1.3.1 SENSORI PER L'AUTOMONITORAGGIO NON CONTINUO

Come si può capire, i dispositivi NCGM, chiamati più comunemente SMBG (self-monitoring blood glucose) , monitorano il livello di glucosio solo in momenti specifici durante il giorno, con una frequenza che dipende dal tipo di diabete, dalla dieta, dal dosaggio e dalla condizione clinica del paziente.



Figura 1, glucometro commerciale [3]

I dispositivi SMBG sono i tipici glucometri che richiedono una puntura nel dito per avere un piccolo campione di sangue. La misurazione del glucosio avviene sfruttando una reazione elettrochimica: considerando che l'enzima glucosio ossidasi (GOx) è specifico al glucosio, in questo metodo, l'ossidazione del glucosio avviene in presenza del GOx, di ossigeno e acqua per formare glucolettone e acqua ossigenata. L'acqua ossigenata viene ossidata elettrochimicamente da un elettrodo , producendo un segnale amperometrico proporzionale al livello di glucosio nel sangue. Il sangue prelevato viene fatto quindi cadere su una striscia collegata ad un contatore che misura la corrente che si forma.

1.3.2 SENSORI PER IL MONITORAGGIO CONTINUO

I dispositivi CGM possono invece monitorare il livello del glucosio anche a pochi minuti di distanza, rendendo possibile il monitoraggio dei cambiamenti rapidi e degli andamenti che quelli SMBG non registrano.

I dispositivi CGM sono formati da tre parti essenziali: un ricevitore wireless, un



Figura 2, dispositivo CGM [3]

trasmettitore e un sensore. Il ricevitore ha un monitor che espone la lettura del glucosio. Il trasmettitore è collegato al sensore e trasmette la misura al ricevitore attraverso onde RF (radio frequenza). Il sensore è un piccolo dispositivo inserito sotto la cute, che si estende nella pelle per accedere al fluido interstiziale. Qui, con reazione elettrochimiche, il sensore usa GOx per ossidare il glucosio presente nel fluido interstiziale.

L'acqua ossigenata reagisce con il platino per produrre una corrente elettrica, che passa attraverso un piccolo cavetto al trasmettitore che si trova al di fuori della pelle. Quando il ricevitore ottiene il dato dal trasmettitore, calcola il livello di glucosio.

Un altro metodo utilizzato per misurare la glicemia è il metodo dell'esochinasi, noto anche come metodo fotometrico, che consiste in una serie di reazioni chimiche. Nella prima fase, il glucosio reagisce con l'enzima esochinasi, in presenza di adenosintrifosfato (ATP) e ioni magnesio, per produrre glucosio-6-fosfato (G6P) e adenosindifosfato (ADP). Nella seconda fase, G6P e nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) vengono ossidate con glucosio-6-fosfato deidrogenasi fino ad essere ridotte rispettivamente a 6-fosfogluconato e nicotinammide-adenina-dinucleotide-ridotta (NADH). La quantità di NADH è proporzionale alla quantità di glucosio nel campione e ha la proprietà di assorbire la luce a 340 nm. La quantità di assorbimento è proporzionale alla quantità di NADH, il che significa che il glucosio può essere misurato utilizzando tecniche spettrofotometriche standard. Anche questo metodo è invasivo perché necessita di un prelievo di sangue dai pazienti.

CAPITOLO 2

METODI NON INVASIVI PER IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA

2.1 LO SCOPO DEI METODI NON INVASIVI

I metodi appena descritti causano dolore e disagio ed aumentano anche il rischio di infezioni e di danni tissutali con le ripetute punture necessarie per la misurazione. Il monitoraggio continuo del glucosio è altamente desiderato soprattutto durante alcune attività quotidiane, ad es. esercizio fisico o durante il sonno o quando il monitoraggio della glicemia con il glucometro non è effettuabile.

Di conseguenza, dalla fine dello scorso secolo, si sono continuamente sviluppati dispositivi non invasivi, cioè che non necessitano di prelevare sangue, e minimamente invasivi, che puntano a ridurre alcuni dei problemi dei tradizionali metodi invasivi. Lo sviluppo di apparecchi non invasivi per la misura del glucosio rappresenta un fattore che potrebbe cambiare la vita a milioni di persone nel mondo affette da diabete, costrette a frequenti test della glicemia, permettendo loro di monitorare il livello di glucosio in modo sicuro e di ricevere un trattamento veloce se necessario. Questi biosensori non invasivi, infatti, non sono in genere in contatto con il sangue e quindi non sono esposti al sistema immunitario.

2.2 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA

Una tecnica utilizzata è quella che sfrutta l'assorbimento della luce: quando la luce è focalizzata sui tessuti biologici, si riflette, si disperde e si trasmette in base alla composizione strutturale e chimica del campione. Pertanto, la maggior parte degli approcci di monitoraggio non invasivo sono mirati a determinare la caratteristica ottica distintiva del glucosio, che può fornire la sua differenziazione molecolare.

La legge di Lambert-Beer fornisce una formulazione matematica del metodo che consente il calcolo dell'assorbanza di un campione dalla concentrazione e dallo spessore: l'assorbanza è

definita come $\log(I_0/I)$, ovvero il logaritmo del rapporto tra l'intensità della luce iniziale e quella che passa per il materiale; viene definita anche come il prodotto tra la concentrazione delle molecole assorbenti, il coefficiente di assorbimento e lo spessore del materiale che assorbe l'intensità luminosa [4].

Il modello mostra quindi l'intensità luminosa riflessa/trasmessa in funzione dello spessore del campione, della concentrazione e del coefficiente di assorbimento, dove l'effetto della luce diffusa è trascurato. La spettroscopia nel vicino infrarosso (**NIR**) e nel medio infrarosso (**MIR**) sono le tecniche non invasive più comunemente utilizzate.

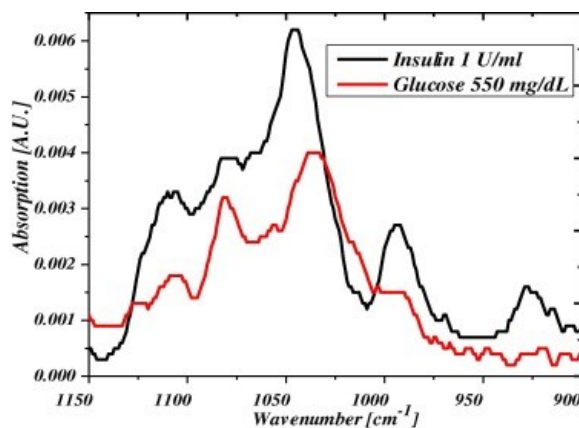


Figura 3, assorbimento del glucosio in relazione all'insulina[5]

2.2.1 SPETTROSCOPIA NIR

La spettroscopia NIR utilizza un fascio di luce con lunghezza d'onda nell'intervallo di 750-2500 nm , che si concentra sul corpo per stimare la concentrazione di glucosio nei tessuti (1-100 mm di profondità) misurando le variazioni dell'intensità luminosa dovute alla trasmissione e alla riflettanza nel tessuto. I cambiamenti nella concentrazione di glucosio influenzano i coefficienti di assorbimento e di dispersione di un tessuto.

Nel campo spettrale del vicino infrarosso, la luce ha una capacità relativamente forte di penetrare i fluidi biologici e i tessuti molli (>0,5 mm), disperde meno dell'ultravioletto (UV) o della luce visibile, e il suo rilevamento e la sua misurazione possono essere raggiunti sia

dalla riflessione che dalla trasmissione. Nelle soluzioni acquose del glucosio, la spettroscopia di assorbimento è in grado di misurare la dipendenza della lunghezza d'onda dall'assorbimento del glucosio. L'acqua è la sostanza più abbondante nei fluidi biologici, quindi viene considerato il suo assorbimento della luce incidente. Nella banda NIR, il coefficiente di assorbimento del glucosio è basso, ed è molto più piccolo di quello dell'acqua a causa della grande differenza nelle loro concentrazioni. Il coefficiente di assorbimento e la concentrazione in questa regione sono tali che il segnale di glucosio costituisca circa solo 1 parte su 100.000, il maggior contributo infatti è dovuto all'acqua. Pertanto, gli spettri NIR più forti di acqua, emoglobina, proteine e grassi si sovrappongono alle bande spettrali deboli del glucosio [6].

Questa tecnica è stata impiegata per determinare il glucosio nel lobo dell'orecchio, nel dito, nella pelle dell'avambraccio, nella mucosa del labbro, nella mucosa orale, nella lingua, nel setto nasale e nella guancia. Le misure NIR sul dito sono correlate con la glicemia ma erano clinicamente inaccettabili per via di un'accuratezza insufficiente. Tuttavia, le misurazioni del labbro interno sono correlate bene con un ritardo di pochi minuti.

La tecnica ha limitazioni serie poichè è influenzata da parametri fisico-chimici quali cambiamenti nella temperatura corporea, pressione sanguigna, idratazione della pelle e concentrazioni di trigliceridi e albumina. Inoltre, è sensibile alle variazioni ambientali della temperatura, umidità, pressione atmosferica e contenuto di anidride carbonica. Le misurazioni sono influenzate anche dallo spessore e le proprietà termiche della pelle e gli stati di malattia come iperglicemia e iperinsulinemia (eccesso di insulina nel sangue).

Le misurazioni NIR determinano la concentrazione complessiva di glucosio nel sangue e nel liquido interstiziale nei tessuti, ma è difficile isolare il contributo del segnale dato dalla concentrazione di glucosio nel sangue o nel fluido interstiziale. I dispositivi non invasivi per misurare la glicemia basati sulla spettroscopia NIR sono SugarTrack (utilizzando 650 nm, 880 nm, 940 nm e 1300 nm) e Sensys (utilizzando 750-2500 nm). Orsense ha impiegato una tecnica migliorata di misurazione del glucosio sulla base della spettroscopia occlusale, dove il flusso di sangue sulla punta del dito viene temporaneamente fermato, utilizzando la luce proiettata a 610 nm e 810 nm.

2.2.2 SPETTROSCOPIA MIR

La spettroscopia MIR impiega un raggio luminoso nella gamma spettrale di 2500-10.000 nm. Si basa sullo stesso principio fisico della spettroscopia NIR, ma viene ridotta la dispersione e aumentato l'assorbimento a causa delle lunghezze d'onda più elevate.

Tuttavia, i metodi di rilevazione basati sulla MIR possono essere implementati solo in riflessione, a causa della capacità molto più debole della luce di penetrare i tessuti (pochi micrometri). Le bande spettrali della spettroscopia MIR prodotte dal glucosio sono più acute di quelle della NIR, ma soffre dagli stessi problemi, oltre alla forte limitazione dovuta alla scarsa penetrazione. Pertanto, viene utilizzata la riflettanza totale attenuata (ATR, Attenuated Total Reflectance) per aumentare la penetrazione della luce, sfruttando un fascio di luce guidato attraverso un cristallo.

La misurazione del glucosio avviene mettendo il cristallo a contatto con la pelle utilizzando olio di squalano, dove il campo elettromagnetico creato dalla luce riflessa misura il glucosio nel fluido interstiziale del derma.

Apparentemente, l'assorbimento della luce da parte dell'acqua è più significativo nella gamma MIR rispetto alla NIR. Tuttavia, la complessità della struttura interna dei tessuti umani e la sovrapposizione delle informazioni spettrali di varie sostanze interferiscono notevolmente con l'accuratezza dei risultati, quindi in genere viene richiesto qualche algoritmo per estrarre le informazioni materiali richieste [7].

Le misure spettrali MIR di glucosio nel sangue sono di solito fatte sulla pelle delle dita o sulla mucosa orale e hanno dimostrato di essere dipendenti dal contenuto di acqua nella pelle. Sebbene esistano esempi di sensori di glucosio non invasivi spettroscopici NIR/MIR utilizzati commercialmente, la sensibilità e la selettività dei sensori, la correlazione tra i risultati delle misurazioni e i valori effettivi, e gli algoritmi successivi che vengono utilizzati devono essere ulteriormente migliorati e modificati.

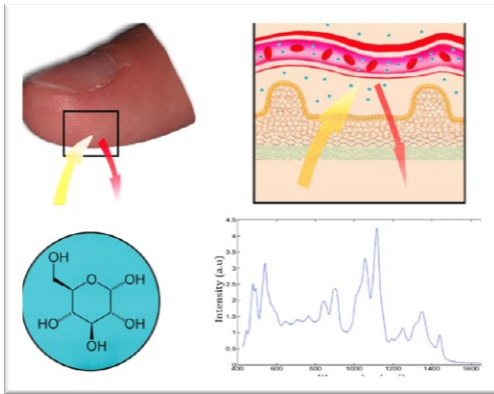


Figura 4, spettroscopia Raman [8]

2.3 SPETTROSCOPIA RAMAN

Un'ulteriore tecnica che viene sfruttata prende il nome di scattering Raman, un fenomeno che determina il grado di diffusione della luce monocromatica in base all'effetto Raman: quando la luce a lunghezza d'onda singola colpisce un bersaglio, produce luce diffusa che viaggia in

tutte le direzioni; la maggior parte di questa radiazione, chiamata dispersione Rayleigh, ha la stessa lunghezza d'onda della luce incidente, mentre il resto è solo una piccola quantità di radiazione sparsa con una lunghezza d'onda diversa, chiamata "dispersione anelastica" o "dispersione Raman".

Tale differenza di lunghezza d'onda viene definito spostamento di Raman, e rappresenta la differenza tra gli stati vibrazionali iniziali e finali della molecola in studio [9].

Come tale, la spettroscopia Raman dipende dagli stati rotazionali e vibrazionali all'interno delle molecole e può essere usata per individuare le bande di assorbimento specifiche e quantificare le molecole corrispondenti, ovvero le posizioni di picco nello spettro di Raman mostrano i modi vibrazionali di ciascun gruppo funzionale all'interno della molecola. Nel caso del glucosio, i modi di vibrazione più rappresentativi sono quelli legati alla banda di allungamento C-H e le bande di allungamento C-O e C-C.

La configurazione di base di uno spettrometro Raman consiste in una lente che cattura una parte della radiazione diffusa e la dirige verso un filtro per lasciare che solo la luce diffusa Raman venga catturata dal rivelatore. Il computer esegue poi l'elaborazione del segnale e fornisce il corrispondente spostamento Raman. Purtroppo, interferenze e problemi di instabilità impediscono a questa spettroscopia di fornire misurazioni accurate del glucosio in vivo. A causa della scarsa penetrazione in profondità della banda MIR, la maggior parte dello studio del rilevamento del glucosio con la spettroscopia Raman avviene nelle basse frequenze della banda NIR, nonostante la presenza di caratteristiche spettrali più ampie che causano interferenze e variabilità nello spettro del segnale rilevato.

2.4 DISPOSITIVI BASATI SULLA FLUORESCENZA

Un nuovo metodo non invasivo si basa invece sul decadimento della molecola da uno stato eccitato di energia superiore allo stato fondamentale attraverso un processo di rilassamento e l'emissione di fotoni, chiamato fenomeno di rilassamento delle radiazioni. Questo fenomeno di rilassamento comporta *fluorescenza* e fosforescenza e ci sono un gran numero di gruppi fluorescenti nel sangue umano che possono emettere fluorescenza quando sono in uno stato eccitato . La fluorescenza impiega l'eccitazione dei tessuti attraverso la luce ultravioletta a frequenze specifiche, seguita dal rilevamento della fluorescenza a una particolare lunghezza d'onda.

La rilevazione del glucosio basata sulla fluorescenza nelle lacrime viene fatta facendo uso di arrays colloidali cristallini polimerizzati che rispondono alle concentrazioni differenti del glucosio con la diffrazione di luce visibile . I sensori di fluorescenza non solo hanno il vantaggio di essere altamente sensibili, ma anche di avere un'alta specificità agli spettri di emissione caratteristici dei fluorofori. L'assorbimento e la lunghezza d'onda del fluoroforo sono tutti fattori da considerare in un sensore di fluorescenza.

Alcuni materiali fluorescenti, quali i punti quantici (QDs, Quantum Dots) ed i punti quantici del carbonio (CDs, Carbon Dots), sono usati come sonde fluorescenti per la rilevazione del glucosio. Ad esempio, l'acqua ossigenata (H_2O_2) prodotta dalla reazione enzimatica tra GOx e glucosio può causare l'attenuazione della fluorescenza dei QD. Il grado di "spegnimento" della fluorescenza rappresenta la quantità di glucosio, che può essere rilevata dal sensore colorimetrico su un macro livello [10].

Zhai et al. hanno sviluppato un nuovo sensore a fluorescenza con CD per il rilevamento del glucosio utilizzando la teoria che l'ossido di m-diidrossibenzene (mDHB) può generare fluorescenza e anche estinguere la fluorescenza dei CD. Anche se mDHB non produce fluorescenza, i suoi ossidi possono produrla ed estinguere quella dei CD. L'ossidazione del glucosio catalizzata da Gox genera H_2O_2 , che viene poi ossidata in mDHB , in modo da costruire una relazione quantitativa tra gli ossidi di mDHB e il glucosio. Gli ossidi mDHB generati causano quindi un cambiamento nel rapporto di fluorescenza tra CD e ossidi mDHB, che è il principio di base di questo sensore di

glucosio. I risultati hanno mostrato che il contenuto di glucosio possiede una buona relazione lineare con il rapporto di fluorescenza di ossido di mDHB e CD, e il limite di rilevazione può raggiungere 0,35 mM. Macroscopicamente, sotto la luce solare e i raggi UV, il colore della soluzione di rilevamento varia con la concentrazione di glucosio, che è il principio di base dei sensori colorimetrici a fluorescenza.

Gli sforzi di ricerca in corso sono focalizzati verso l'uso di lenti a contatto colorate che possono cambiare colore in risposta alla concentrazione di glucosio. Ciò eviterà l'uso di dispositivi di eccitazione e di rilevamento in quanto il segnale può essere rilevato visivamente confrontando il cambiamento di colore con una striscia di colore precalibrata.

Oltre alla concentrazione di glucosio, la fluorescenza dipende anche dallo spessore epidermico, dalla pigmentazione della pelle e da altri parametri. Inoltre, l'uso della luce laser ultravioletta nei tessuti ha anche una forte diffusione.

2.5 DISPOSITIVI CHE SFRUTTANO I LIQUIDI CORPOREI

Recentemente, gli studi si sono orientati maggiormente sullo sviluppo di tecnologie non invasive indossabili in grado di monitorare continuamente i livelli di glucosio nei fluidi corporei esterni, come lacrime e sudore, o nel liquido interstiziale (ISF). Uno dei principali vantaggi riguarda la facilità con cui questi liquidi possono essere estratti, anche se la composizione di questi fluidi biologici varia continuamente e può essere influenzata da parametri circostanti, come vento, umidità, idratazione e attività. Vediamoli nello specifico

2.5.1 SUDORE

Il sudore è un fluido biologico che può essere utilizzato per applicazioni di monitoraggio non invadenti e continue a causa dei suoi vantaggi distinti: la composizione ricca di biomarcatori chimici e la sua semplice raccolta epidermica grazie alla secrezione nei pori della pelle sono solo alcuni di essi, insieme ad una possibilità di accesso continuo, avere la maggior parte dei siti di campionamento al di fuori del corpo e la facilità di posizionamento del dispositivo di raccolta.

Le numerose ghiandole sudoripare distribuite in tutto il corpo e la rapida diffusione di

piccole molecole, come il glucosio, nel sudore, rendono possibile la raccolta di campioni di sudore "fresco" in tempi brevi, pronto per essere monitorato dopo l'integrazione con dispositivi di rilevamento del glucosio, ottenendo informazioni utili per il monitoraggio continuo. In termini di glucosio, le concentrazioni di sudore hanno dimostrato di essere correlate in modo affidabile alle concentrazioni simultanee di glucosio nel sangue quando raccolte correttamente, anche se il percorso di separazione dal sangue al sudore non è ancora stato chiaramente verificato.

Nonostante la buona correlazione, le misurazioni devono affrontare notevoli ostacoli, derivanti dalle variazioni dei parametri operativi, principalmente variazioni di temperatura e pH, dalla contaminazione cutanea da biomarcatori o dall'ambiente circostante, oltre che dal glucosio, e soprattutto la bassa concentrazione di glucosio nel sudore (0,02-0,6 mM), che richiede sensori altamente sensibili, soprattutto durante l'ipoglicemia.

Infatti, la composizione del sudore può variare significativamente tra i diversi punti del corpo e può anche essere facilmente contaminato dalla superficie della pelle e dal vecchio sudore rimasto sull'epidermide.

Moyer et al. hanno mostrato una forte correlazione tra sudore e glicemia nei soggetti diabetici, concentrandosi sul campionamento rapido del sudore senza contaminazioni cutanee. Per eliminare il glucosio residuo, la superficie della pelle viene pulita con sapone, acqua e 70% isopropanolo (in acqua), in sequenza. Successivamente, il sudore viene generato utilizzando la stimolazione ionoforetica tramite la somministrazione di farmaci Pilocarpina e raccolti con un metodo di perfusione, poiché le concentrazioni di glucosio sulla superficie della pelle possono interrompere le misurazioni accurate. Durante le prove su volontari, è stato utilizzato il rilevamento simultaneo dell'umidità per rilevare la copertura completa del sudore del dispositivo e garantire misurazioni elettrochimiche accurate del pH del sudore e della concentrazione di glucosio.

Il pH osservato nel sudore raccolto variava durante il periodo di esercizio a causa del cambiamento delle concentrazioni di acido lattico, che potrebbe influenzare l'attività del GOx. Questo segnale di pH monitorato simultaneamente è stato utilizzato per

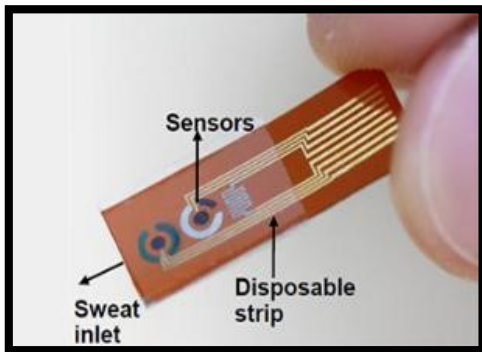


Figura 5, apparecchio sviluppato da Kim per la misurazione del glucosio nel sudore [11]

standardizzare le concentrazioni di glucosio misurate ogni ora sul sudore corporeo, che ha mostrato una correlazione adeguata con le concentrazioni di glucosio nel sudore misurate utilizzando un kit di dosaggio commerciale e le concentrazioni di glucosio nel sangue misurate con un glucometro commerciale su 14 ore,

inclusi tre pasti. I recenti progressi nei materiali

flessibili avanzati, nelle tecniche di fabbricazione e negli approcci di rilevamento hanno fornito interessanti possibilità per una buona integrazione nei processi fondamentali di estrazione, cattura e analisi del sudore in tempo reale nei dispositivi di monitoraggio.

Diversi team di ricerca hanno sviluppato strategie intelligenti, ad esempio sensori estensibili fatti di grafene drogato con oro (Au) e combinato con una maglia d'oro per il rilevamento del glucosio elettrochimico realizzato dal gruppo di Kim alla Seoul National University. Per correggere le potenziali distorsioni causate dalle variazioni di temperatura e pH che influenzano l'attività enzimatica, gli indicatori di temperatura e pH sono stati inclusi nella progettazione del sensore, in modo da migliorare la precisione offrendo correzioni in tempo reale del livello di glucosio misurato sulla base di dati pre-calibrati. Un rilevamento simultaneo dell'umidità è stato incorporato per garantire che una quantità sufficiente di sudore sia presente sulla pelle e quindi per consentire misure elettrochimiche accurate sia di glucosio che di pH nel sudore.

Tuttavia, in generale, il sudore può essere rilevato e analizzato solo quando raggiunge la superficie della pelle, quindi come raccoglierlo è una limitazione unica.

2.5.2 LACRIME

Le lacrime umane sono un fluido corporeo emergente per applicazioni di monitoraggio sanitario. Il liquido lacrimale viene escretato dalla ghiandola lacrimale come il film protettivo che copre l'occhio e generalmente contiene più di 20 specie diverse, tra cui acqua, elettroliti, proteine, metaboliti ecc [12].

Relativamente al glucosio, diversi studi hanno mostrato una buona correlazione tra i livelli di glucosio nelle lacrime con quelli nel plasma attraverso efficienti metodi di campionamento, anche se qualsiasi irritazione o stimolazione oculare può compromettere questa correlazione. Considerando il tempo medio necessario per equilibrare il glucosio consumato, durante il monitoraggio del glucosio nelle lacrime si dovrebbe anche tener conto di un tempo minimo di 15 minuti.

I primi sforzi pionieristici nella realizzazione di sensori indossabili flessibili per il rilevamento del glucosio lacrimale si basavano sull'immobilizzazione di Gox su elettrodi fotolitografici e serigrafici fabbricati su substrati polimerici flessibili. Successivamente, sono state introdotte piattaforme a base di lenti a contatto per lo sviluppo di sensori indossabili in quanto sono costantemente esposti alle lacrime basali e possono essere facilmente indossati senza indurre alcuna irritazione oculare.

Le lenti a contatto "intelligenti" (smart CL, smart contact lenses) hanno un potenziale promettente per essere utilizzate come sensori, oltre a svolgere un ruolo importante nella lubrificazione degli occhi e nel nutrimento della cornea. Nelle condizioni standard di umidità e temperatura, il tasso medio di produzione di liquido lacrimale è di 2,2 $\mu\text{L}/\text{min}$. I sensori sono incorporati tra due strati morbidi di materiale per lenti e un piccolo foro nella lente consente al fluido lacrimale di filtrare nel sensore e di essere utilizzato per misurare i livelli di glucosio. Un'antenna wireless molto sottile funge da controller per comunicare informazioni ad un dispositivo wireless esterno. Le lenti possono analizzare i livelli di glucosio ogni secondo e trasmettere i dati ad un'app associata; potrebbero potenzialmente diminuire il problema del monitoraggio dinamico dei livelli di glucosio per determinare e correggere i picchi di glucosio indesiderati durante il giorno e la notte, ottenendo un controllo molto più stretto dell'oscillazione ormonale [13].

Esistono due tipi diffusi di sensori intelligenti CL: quelli passivi e quelli attivi. I sensori passivi sono costituiti da pochi componenti, come condensatori biocompatibili, resistenze, raddrizzatori, antenne e diodi al silicio a microscala che emettono luce (μLED). Essi sono destinati a funzionare come indicatori visivi semplici da usare, avendo due stati binari (on-off), a seconda delle riduzioni di resistenza. Maggiore è il livello di glucosio, minore è la

resistenza, maggiore è la corrente che mantiene μ LED nello stato on. Al contrario, a bassi livelli di glucosio, quindi alta resistenza, la corrente scende, e al di sotto di una certa soglia il μ LED viene spento.

Il μ LED emette luce visibile, mentre un'antenna induttiva trasparente ed estensibile riceve energia da un trasmettitore di potenza esterno. Un circuito raddrizzatore viene utilizzato in questo sistema per alimentare il resto del circuito.

I vantaggi di questo tipo passivo di sensore includono il suo costo più economico e la sua semplicità di fabbricazione. D'altra parte, un sensore CL passivo restituisce solo informazioni visive suggerendo che una soglia di livello di glucosio predefinita è stata superata, e inoltre, funziona solo per distanze fino a 5 mm da un trasmettitore di potenza.

I sensori CL attivi offrono potenzialmente benefici più essenziali per un monitoraggio continuo del glucosio. Usano la tecnica amperometrica per misurare le concentrazioni di glucosio, incorporando un'elettronica wireless integrata per la trasmissione continua dei dati. Inoltre, i sensori intelligenti attivi richiedono un design del circuito più complesso e più strati di grafene per impedire il trasferimento di calore al nucleo dell'occhio.

È necessario un piccolo circuito integrato per imballare raddrizzatori di potenza, modulatori di segnale, generatori di impulsi, potenziostati e regolatori di tensione per operare a tensione e frequenza costante, fino a quando si verifica la trasmissione dei dati. Il potenziostato è il circuito elettronico necessario per eseguire la maggior parte degli esperimenti elettroanalitici.

Un sensore CL attivo è in grado di stimare continuamente le concentrazioni di glucosio nel fluido lacrimale, può operare a una distanza di 15 cm dal trasmettitore di potenza consumando solo 3 μ W ed è compatibile con dispositivi abilitati alla comunicazione vicino al campo, come gli smartphone. A sua volta, un sensore CL attivo ha un processo di fabbricazione più complicato e coinvolge circuiti integrati di dimensioni maggiori.

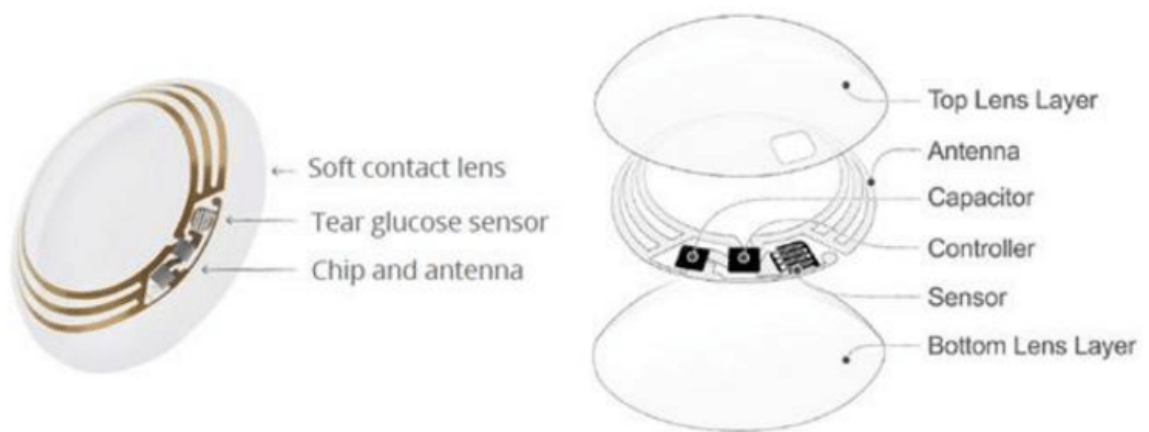


Figura 6, smart CL [14]

2.5.3 LIQUIDO INTERSTIZIALE (ISF)

Dopo il sangue, il liquido interstiziale è la fonte più importante per ottenere informazioni sui livelli di glucosio in termini di precisione e velocità. Questo fluido, abbreviato a ISF dall'inglese, è il liquido extracellulare che circonda le cellule del tessuto.

Il fluido interstiziale fornisce nutrienti attraverso la diffusione dall'endotelio capillare, che porta ad una correlazione affidabile tra il sangue e il livello di glucosio nel liquido interstiziale. È composto da molti biomarcatori importanti ed ha un potenziale diagnostico medico simile al sangue. Questa funzione si traduce in correlazioni affidabili tra sangue e i livelli di ISF per molte biomolecole, tranne le grandi molecole come i lipidi.

Per sfruttare questo fluido, si utilizza principalmente una tecnica chiamata ionoforesi inversa (RI, Reverse Iontophoresis).

CAPITOLO 3

LA IONOFRESI INVERSA PER IL MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA

3.1 LA IONOFRESI INVERSA (RI)

Come già anticipato precedentemente, ISF circonda le cellule della pelle fornendo loro nutrienti attraverso la diffusione diretta dall'endotelio capillare, fornendo correlazioni tra sangue e liquido interstiziale.

Tuttavia, per valutare il glucosio nell'ISF senza perforare la pelle, deve essere estratto dal tessuto sottocutaneo alla superficie cutanea, che richiede metodologie di campionamento avanzate con efficienza di estrazione ottimale e minima contaminazione dalla superficie della pelle. La

ionofresi inversa (RI) è l'approccio più riconosciuto per "attrarre" l'ISF sulla superficie della pelle senza perforarla o entrare in contatto il sangue. La ionofresi, ovvero il passaggio di corrente elettrica attraverso la pelle, è stata utilizzata per oltre un secolo per la consegna transdermica di farmaci. Dato che il trasporto di glucosio avviene nella direzione opposta (dalla pelle verso

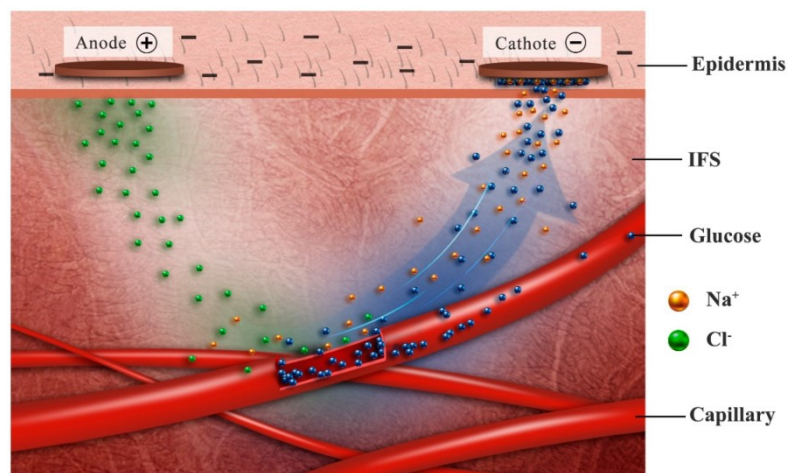


Figura 7, ionofresi inversa[16]

l'esterno), questo processo è stato definita 'ionofresi inversa' [15]. La ionofresi inversa transdermica è una tecnica non invasiva, che può estrarre biomolecole e farmaci attraverso la pelle intatta per raggiungere lo scopo di rilevamento della glicemia. In realtà, visto che il glucosio è privo di carica, il trasporto avviene tramite elettro-osmosi: la RI avviene applicando una corrente lieve con due elettrodi appoggiati sulla pelle per indurre una migrazione di ioni attraverso la cute, provocando la migrazione degli ioni Na⁺ e Cl⁻ da sotto la pelle verso il catodo e l'anodo, rispettivamente, che genera la corrente elettrica; a pH fisiologico, la pelle ha

una carica negativa netta, perciò la migrazione degli ioni sodio positivi produce un flusso di solvente convettivo (elettro-osmotico) che provoca anche il movimento del glucosio neutro verso lo stesso elettrodo.

3.2 I PRIMI DISPOSITIVI: GLUCOWATCH

Il primo monitor approvato per la misurazione del glucosio non invasiva dal Food and Drug Administration (FDA) è stato il GlucoWatch G2 di Cygnus, nel 2001. Questo sistema da indossare al polso misura elettrochimicamente la concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale cutaneo estratto grazie al meccanismo di ionoforesi inversa ed è formato approssimativamente da dischi di idrogel, elettrodi e dei biosensori. Il disco idrogel contiene GOx (glucosio ossidasi), che reagisce con il glucosio estratto attraverso RI.

Quando il dispositivo viene indossato come un orologio, produce una corrente ($300 \mu\text{A}$) che interessa le molecole sottocutanee. Le concentrazioni di glucosio nel fluido interstiziale estratto sono previste per essere 1000 volte più diluite rispetto al glucosio nel sangue.



Figura 8, GlucoWatch [17]

Un ciclo di misurazione del GlucoWatch consisteva nell'applicare la ionoforesi inversa per 3 minuti, seguito da un periodo di rilevamento di 7 minuti, che consente di effettuare 6 misurazioni all'ora su un periodo di 12 ore [4].

Il GlucoWatch aveva un'interfaccia user-friendly che includeva un allarme per variazioni superiori al 35% del glucosio, un'attività marcatore (per pasti, esercizio fisico e iniezione di insulina), software di accompagnamento per l'analisi dei dati e la memoria interna per memorizzare fino a 8500 letture.

Il sensore può riconoscere il numero di elettroni trasferiti in proporzione alle molecole di glucosio estratte. Il segnale viene convertito nel corrispondente livello glicemico da un algoritmo di conversione dei dati.

Tuttavia, il dispositivo ha molte limitazioni, come la necessità di utilizzare un glucometro standard

per la calibrazione, un lungo tempo di riscaldamento(2/3h), la necessità di cambiare le guarnizioni ogni 12 ore; inoltre il dispositivo non può essere utilizzato durante la sudorazione e la corrente elettrica prolungata può causare danni alla pelle degli utenti. Infatti, nonostante le prove cliniche dell'orologio mostrassero un'adeguata precisione per il monitoraggio da casa, è stato ritirato dal mercato nel 2007 per le diverse ragioni già citate (irritazioni cutanee e vesciche causate dalla corrente necessaria per estrarre il fluido, il lungo tempo di riscaldamento e la necessità di calibrazione usando strisce glicemiche standard).

3.3 I PRINCIPALI FATTORI PER L'ESTRAZIONE DI MOLECOLE DI GLUCOSIO

In termini di estrazione di molecole di glucosio, i principali fattori sono i seguenti:

- i. spessore cutaneo Normalmente, più spessa è la pelle, minore è la permeabilità e peggiore è l'effetto di estrazione. Lo spessore della pelle varia notevolmente tra gli individui, a seconda dell'età, del sesso, della condizione della pelle e dallo stato di malattia;
- ii. intensità della corrente generalmente, RI adotta la corrente continua e la relazione tra l'intensità della corrente e la quantità di estrazione è quasi lineare. L'aumento dell'intensità di corrente può aumentare la migrazione ionica, ma con il continuo aumento dell'intensità di corrente, il tasso di trasferimento tende ad essere stabile, indicando che lo stato di saturazione è stato raggiunto. In quel momento, un ulteriore aumento dell'intensità non contribuisce in modo significativo alla migrazione ionica. Inoltre, la pelle formerà pori microscopici ad alta densità di corrente, e l'elettroporazione può aprire il canale contenente acqua per aumentare la penetrazione della pelle, in modo da promuovere l'effetto della RI. Questo metodo di combinazione dell'elettroporazione con RI implica un migliore effetto di estrazione in un tempo di estrazione più breve e una corrente più piccola. Zhao et al. hanno suggerito che l'elettroporazione per 5 minuti seguita da RI per 12 minuti ha dato risultati migliori, indicando che l'effetto sinergico di elettroporazione e RI potrebbe promuovere la penetrazione della pelle;
- iii. corrente costante o corrente pulsata se la corrente continua viene applicata alla pelle continuamente, può causare formicolio ed eritema sull'epidermide. La corrente pulsata può efficacemente ridurre questo effetto collaterale della ionoforesi inversa. La forma d'onda dell'impulso dà alla pelle il tempo di depolarizzare e tornare al suo stato originale prima di

- iv. attivare il successivo impulso, che riduce in modo significativo l'irritazione della pelle in modo che il paziente possa tollerare livelli più elevati di corrente;
- v. durata della corrente Quando l'intensità della corrente è costante, l'estrazione del glucosio è proporzionale alla durata della corrente applicata. La pelle può tornare alla normalità entro un periodo di tempo, ma si possono verificare danni irreversibili quando la pelle è esposta ad alti livelli di corrente per lungo tempo. Normalmente, l'intensità di corrente dovrebbe essere compresa tra 0,1 e 0,3 mA e la durata di ogni estrazione non dovrebbe superare i 20 minuti;
- vi. materiali dell'elettrodo Anche la dimensione, la forma e la posizione degli elettrodi sono fattori cruciali per RI. La densità di corrente è strettamente correlata alla dimensione dell'elettrodo. Gli elettrodi sono disponibili in una varietà di forme, come quella dei dischi sottili nel GlucoWatch o altre. Non solo è necessario che l'elettrodo possa essere strettamente attaccato alla pelle umana, ma anche che mantenga un'adeguata micro-distanza dalla superficie della pelle; quindi, sono generalmente selezionati per l'elettrodo materiali flessibili. Nello studio iniziale sono stati utilizzati elettrodi in alluminio, platino e zinco, ma essi possono causare elettrolisi dell'acqua, che provoca cambiamenti di pH e produce gas che si accumulano sulle superfici cutanee e sugli elettrodi, interferendo con la distribuzione della corrente. Per evitare la reazione elettrochimica dell'acqua, vengono generalmente utilizzati materiali con basso potenziale redox. Ad esempio, l'elettrodo Ag/AgCl ha un'eccellente biocompatibilità, reversibilità e resistenza a variazioni del pH. Al momento, sono favoriti dai ricercatori dei piccolissimi elettrodi in oro perché hanno eccellenti prestazioni elettrochimiche, elevata elasticità e bassa resistenza (minor modulo di Young rispetto ai normali elettrodi in oro) ed un'eccellente biocompatibilità.

3.4 APPARECCHIO SUGARBEAT

Per ridurre le problematiche relative al GlucoWatch, Nemauro Medical, una società di tecnologia medica con sede nel Regno Unito, ha recentemente sviluppato SugarBEAT, un patch adesivo quotidiano usa e getta, utilizzando lo stesso tecnologia del GlucoWatch.

Il sensore elettrochimico di tipo patch di Nemauro attira l'ISF passando una corrente elettrica non percettibile attraverso la pelle. Il dispositivo si collega a un trasmettitore ricaricabile e offre



Figura 9, dispositivo SugarBeat [18]

misurazioni in tempo reale e continue del glucosio, a intervalli di 5 minuti (12 all'ora) dopo un periodo di riscaldamento di 30 minuti. In questo modo il tempo di riscaldamento viene ridotto e sono possibili molte più misurazioni, fornendo un controllo migliore del livello di glucosio. Questo dispositivo ha ricevuto l'approvazione CE (o "Conformità europea") a maggio 2019 ed è previsto che sarà presto commercializzato sul mercato europeo.

3.5 LO SVILUPPO DEI TATUAGGI TEMPORANEI

Per affrontare gli inconvenienti del GlucoWatch, le recenti ricerche si sono concentrate sulla produzione di piattaforme di monitoraggio del glucosio non invasive affidabili ed efficienti.

Wang ha recentemente sviluppato una piattaforma di monitoraggio del glucosio non invasivo, indossabile e usata come tatuaggio. Questo dispositivo si basa sull'integrazione della ionoforesi inversa con il rilevamento amperometrico del glucosio su un substrato flessibile. Gli elettrodi di rilevamento sono stati fabbricati su un'unica piattaforma di tatuaggio temporaneo utilizzando la serigrafia, portando a un dispositivo flessibile, facile da indossare e conforme per misurazioni monouso del glucosio.

Questa piattaforma di rilevamento ha ovviato al disagio del Gluowatch, riducendo la corrente applicata per l'estrazione del fluido e utilizzando un rilevamento catodico a bassa tensione. Tale piattaforma flessibile, a basso costo ed esteticamente più gradevole, può essere facilmente accoppiata con la pelle umana con il minimo livello di invadenza alla routine di chi lo indossa. Per realizzare entrambe le operazioni di estrazione e rilevamento utilizzando una piattaforma, sono stati incorporati ulteriori elettrodi Ag/ AgCl, insieme al rivestimento di idrogel di agarosio, per la "consegna" efficiente del



Figura 10, dispositivo sviluppato da Wang a base di tatuaggio [19]

fluido interstiziale vicino agli elettrodi di lavoro e a quelli contatori e di riferimento [20] .

Il nuovo biosensore richiede un diverso modello di elettrodo che include gli elettrodi ionofori, rispetto al design a tre elettrodi dei precedenti biosensori elettrochimici a base di tatuaggio.

Ogni sensore consiste in delle parti anodiche e catodiche. Ogni parte è composta da un elettrodo Ag/AgCl utilizzato come elettrodo contatore o di riferimento. Un trasduttore modificato col blu di Prussia viene utilizzato per la sua elevata selettività verso il perossido di idrogeno, il prodotto rilevabile della reazione enzimatica del glucosio con la glucosio ossidasi. Durante l'operazione di ionoforesi inversa, il glucosio viene estratto nel catodo, quindi l'elettrodo di lavoro della parte catodica viene modificata con l'enzima Gox per la rilevazione selettiva del glucosio. Il chitosano viene utilizzato come matrice polimerica per immobilizzare l'enzima sulla superficie del trasduttore.

Durante l'esecuzione della RI, si deve fare attenzione a garantire un contatto corretto tra la pelle e il sensore per un'estrazione efficiente del glucosio ed evitare irritazioni cutanee. Questo requisito è stato soddisfatto coprendo uniformemente uno strato di gel di agarosio biocompatibile su ciascun contingente per coprire tutti gli elettrodi. Studi preliminari sul corpo hanno rivelato che l'assenza dello strato di idrogel causa irritazione della pelle e bruciore. Tuttavia, applicando il gel di agarosio al sensore di glucosio questo problema viene risolto. Questo potrebbe essere attribuito al maggiore contatto elettrico tra il sensore e la pelle offerto dal gel.

Il sensore risultante può essere facilmente applicato sulla pelle, è aderente e conforme ai contorni dell'epidermide, simile a un tipico tatuaggio temporaneo strofinato. Lo strato reagente è stato ottimizzato per fornire la sensibilità necessaria per la rilevazione di basse concentrazioni di glucosio (micromolare) nell'ISF estratto e un' elevata specificità in presenza di specie elettroattive interferenti.

Dopo l'ottimizzazione in vitro e la dimostrazione della sensibilità e selettività del sensore, il sensore ionoforetico basato su tatuaggio è stato valutato per il monitoraggio non invasivo del glucosio in soggetti umani ed è stato convalidato da misurazioni simultanee utilizzando un

glucometro commerciale. La specificità del sistema è stato convalidato applicando contemporaneamente anche un sensore senza enzimi (nessun controllo Gox) su soggetti umani; l'esigenza di eseguire la ionoforesi inversa prima del rilevamento è stata dimostrata analizzando la risposta del sensore con e senza estrazione attiva di glucosio nell'ISF verso la superficie del sensore. Queste dimostrazioni rivelano che la piattaforma ha una notevole promessa per il monitoraggio non invasivo del glucosio in situazioni di vita reale.

Le caratteristiche attraenti del nuovo sistema indossabile evidenziano anche il suo potenziale per il monitoraggio sul corpo di altre sostanze chimiche target presenti nel fluido interstiziale.

Il dispositivo ancora richiede la calibrazione intrusiva per misurare i livelli di glucosio nel sangue per correlare in modo affidabile il glucosio misurato nel liquido interstiziale con la concentrazione di glucosio nel sangue. Una soluzione che è stata suggerita per realizzare il monitoraggio del glucosio completamente non invasivo è attraverso l'uso di uno standard interno con ionoforesi inversa; ciò comporta l'estrazione di Na^+ contemporaneamente con il glucosio mediante RI. La concentrazione del sodio nel liquido interstiziale rimane quasi costante nel tempo e quindi può essere utilizzata come standard interno. In questo modo, i rapporti di concentrazione glucosio/ Na^+ nel sangue e nell'ISF sarebbero proporzionalmente correlati con un coefficiente facilmente determinabile. Questo approccio offre quindi una promessa per prevedere il rapporto di concentrazione ISF/ glucosio nel sangue, senza bisogno della calibrazione rispetto a un campione.

Chen et al. hanno sviluppato un sistema di monitoraggio del glucosio ISF clinicamente applicabile basato sull'integrazione di una batteria di carta sottile, flessibile e biocompatibile con un elettrodo d'oro [21].

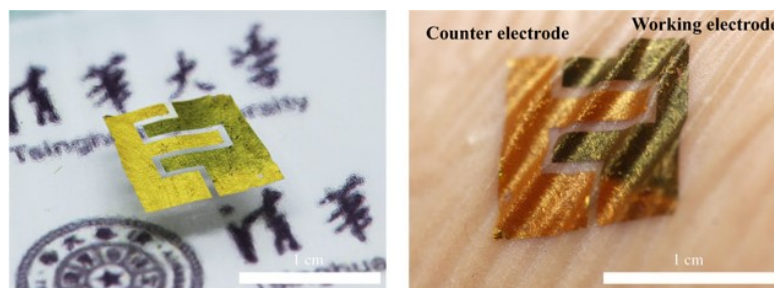


Figura 11, apparecchio applicabile sulla pelle sviluppato da Chen [22]

Per migliorare la raccolta del liquido interstiziale, l'acido ialuronico (HA) viene spinto transdermicamente nell'ISF attraverso un canale anodico sotto la batteria di carta; l'HA caricato positivamente ad alta densità aumenta la pressione osmotica dell'ISF, rompendo l'equilibrio tra la filtrazione del fluido e il riassorbimento, e quindi promuove il trasporto del glucosio intravascolare nell' ISF. Il glucosio presente nel liquido interstiziale estratto attraverso il canale catodico viene rilevato con tecnica amperometrica attraverso una reazione enzimatica basata sulla glucosio ossidasi (Gox).

3.6 COME OPERARE NEL FUTURO

I lavori futuri per lo sviluppo di tali sistemi dovrebbero concentrarsi nell'uso a lungo termine, l'integrazione del sensore con l'elettronica wireless e l'esame con grandi quantità di individui sia sani che diabetici.

I dispositivi più utilizzati rimangono quelli invasivi, i quali non possono tenere traccia delle fluttuazioni dei livelli di glucosio, in particolare durante il sonno o le attività quotidiane impegnative; ciò ha portato allo sviluppo, alla commercializzazione e all'uso crescente di dispositivi di monitoraggio continuo del glucosio verso sistemi di erogazione dell'insulina a circuito chiuso.

L'attuale pandemia coronavirus, con un gran numero di pazienti diabetici infettati da COVID-19, ha ulteriormente aumentato l'interesse per i dispositivi CGM in tempo reale. Con gli enormi progressi delle nanotecnologie negli ultimi dieci anni, c'è stata un'esplosione di attività di ricerca sui sensori elettrochimici di glucosio basati su nanomateriali.

Combinare i biosensori del glucosio con le caratteristiche uniche delle nanostrutture emergenti basate sui materiali avanzati, sulle strutture dell'idrogel e sui materiali ibridi, ha portato ad una prestazione notevolmente migliorata del sensore e in continua evoluzione, sia in termini di sensibilità che di selettività.

CONCLUSIONI

Varie tecnologie non invasive per il monitoraggio della glicemia sono in fase di sviluppo o sono già sul mercato. Questi approcci utilizzano diverse metodi e si pongono diversi obiettivi.

Lo sviluppo di queste nuove tecnologie ha completamente trasformato il modo in cui il diabete viene gestito offrendo trattamenti personalizzati, riducendo le complicanze e portando ad un miglioramento della qualità della vita nei pazienti. Come tale, le piattaforme per il monitoraggio continuo giocano un ruolo chiave nel controllo del livello del glucosio e dovrebbero diventare il nuovo standard di cura per i pazienti affetti da diabete.

Molto importante è lo sviluppo dei metodi non invasivi per un monitoraggio continuo e per eliminare tutte le complicazioni e i rischi dovuti ai controlli invasivi; professori e ricercatori, infatti, sono in continua ricerca per migliorare questi aspetti e per superare le sfide attuali, la più importante delle quali è la precisione per proteggere la salute dei malati.

Considerando i principali risultati nell'affidabilità e nell'accuratezza dei sistemi negli ultimi anni, si prevede che, con ulteriori progressi, i pazienti potranno basarsi su letture non invadenti con dispositivi per il monitoraggio continuo dei livelli di glucosio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bolla, A. S., & Priefer, R. (2020). Blood glucose monitoring- an overview of current and future non-invasive devices. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(5), 739–751. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.05.016>
- [2] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2012). *Diabetes Care*, 36(Supplement_1). <https://doi.org/10.2337/dc13-s067>
- [3] Freestyle Libre Systems. Continuous Glucose Monitoring (CGM). (n.d.). Retrieved September 2022, from <https://www.freestyle.abbott/us-en/home.html>
- [4] Kim, J., Campbell, A. S., & Wang, J. (2018). Wearable non-invasive epidermal glucose sensors: A Review. *Talanta*, 177, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.077>
- [5] Romo-Cárdenas, G., Sánchez-López, J. de, Luque, P. A., Cosío-León, M., Nieto-Hipólito, J. I., & Vázquez-Briseño, M. (2017). Insulin overlapping in whole blood FTIR spectroscopy in blood glucose measurements. *Results in Physics*, 7, 1221–1222. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.03.017>
- [6] Tang, L., Chang, S. J., Chen, C.-J., & Liu, J.-T. (2020). Non-invasive blood glucose monitoring technology: A Review. *Sensors*, 20(23), 6925. <https://doi.org/10.3390/s20236925>
- [7] Vashist, S. K. (2012). Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A Review. *Analytica Chimica Acta*, 750, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.043>
- [8] Pandey, R., Paidi, S. K., Valdez, T. A., Zhang, C., Spegazzini, N., Dasari, R. R., & Barman, I. (2017). Noninvasive monitoring of blood glucose with Raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 50(2), 264–272. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00472>
- [9] Alsunaidi, B., Althobaiti, M., Tamal, M., Albaker, W., & Al-Naib, I. (2021). A review of non-invasive optical systems for continuous blood glucose monitoring. *Sensors*, 21(20), 6820. <https://doi.org/10.3390/s21206820>
- [10] Villena Gonzales, W., Mobashsher, A., & Abbosh, A. (2019). The progress of glucose monitoring—a review of invasive to minimally and non-invasive techniques, devices and sensors. *Sensors*, 19(4), 800. <https://doi.org/10.3390/s19040800>
- [11] MDBR (2017). south korean researchers develop sweat based glucose monitoring device. <https://doi.org/140317-5761737>
- [12] Chen, C., Zhao, X.-L., Li, Z.-H., Zhu, Z.-G., Qian, S.-H., & Flewitt, A. (2017). Current and emerging technology for continuous glucose monitoring. *Sensors*, 17(12), 182. <https://doi.org/10.3390/s17010182>
- [13] Bamgboje, D., Christoulakis, I., Smanis, I., Chavan, G., Shah, R., Malekzadeh, M., Violaris, I., Giannakeas, N., Tsipouras, M., Kalafatakis, K., & Tzallas, A. (2021). Continuous non-invasive glucose monitoring via contact lenses: Current approaches and future perspectives. *Biosensors*, 11(6), 189. <https://doi.org/10.3390/bios11060189>

- [14] Malewar, A. (2022, June 21). Google's new Smart contact lens. Tech Explorist. Retrieved August 2022, from <https://www.techexplorist.com/googles-new-smart-contact-lens/4189/>
- [15] Potts, R., Tamada, J., & Tierney, M. (2002). Glucose Monitoring by Reverse Iontophoresis, 18, 49–53. <https://doi.org/10.1002/dmrr.210>
- [16] Bakshi, P., Vora, D., Hemmady, K., & Banga, A. K. (2020). Iontophoretic skin delivery systems: Success and failures. International Journal of Pharmaceutics, 586, 119584. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119584>
- [17] Cygnus. (2001). Glucoband & GLUCOWATCH. GLUCOBAND & GLUCOWATCH. Retrieved September 2022, from <http://mybiomedical.blogspot.com/2007/08/glucoband-glucowatch.html>
- [18] Nemauro, medical. (n.d.). SugarBEAT® - glucometro in continuo by Nemauro medical: Medicaexpo. Il marketplace B2B del settore medico-sanitario. Retrieved 2022, from <https://www.medicaexpo.it/prod/nemauro-medical/product-112238-739565.html>
- [19] Wang, J. (2015, September 24). Tattoo-based sensor detects glucose levels. Diabetes In Control. A free weekly diabetes newsletter for Medical Professionals. Retrieved August 2022, from <https://www.diabetesincontrol.com/tattoo-based-sensor-detects-glucose-levels/>
- [20] Bandodkar, A. J., Jia, W., Yardimci, C., Wang, X., Ramirez, J., & Wang, J. (2014). Tattoo-based noninvasive glucose monitoring: A proof-of-concept study. Analytical Chemistry, 87(1), 394–398. <https://doi.org/10.1021/ac504300n>
- [21] Teymourian, H., Barfidokht, A., & Wang, J. (2020). Electrochemical glucose sensors in diabetes management: An updated review (2010–2020). Chemical Society Reviews, 49(21), 7671–7709. <https://doi.org/10.1039/d0cs00304b>
- [22] Chen, Y., Lu, S., Zhang, S., Li, Y., Qu, Z., Chen, Y., Lu, B., Wang, X., & Feng, X. (2017). Skin-like biosensor system via electrochemical channels for noninvasive blood glucose monitoring. Science Advances, 3(12). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701629>

