



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“SENSORI INDOSSABILI PER IL MONITORAGGIO DI
METABOLITI ”**

Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello

Laureando: Tommaso Baldan

ANNO ACCADEMICO 2021 –2022

25 novembre 2022

INDICE

SOMMARIO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	6
2. SUDORE E METABOLITI	7
2.1 Fisiologia della produzione del sudore	7
2.2 Principali metaboliti presenti nel sudore	9
3. ATTUALI METODI PER LA QUANTIFICAZIONE	13
3.1 Tecniche di laboratorio per glucosio e lattato	13
3.2 Glucometro	13
3.3 CGM	15
3.4 Test del lattato	16
4. BIOSENSORI PER METABOLITI	18
4.1 Biosensori basati sul sudore	18
4.2 Sensori indossabili non invasivi	20
4.3 Sensori enzimatici e non enzimatici	21
4.4 Principi di trasduzione	23
5. TRASDUTTORI ELETTROCHIMICI	24
5.1 Amperometrici	26
5.2 Impedimetrici	30
5.3 Potenzimetrici	32
6. TRASDUTTORI OTTICI	34
7. ANALISI DI UN ESEMPIO DI DEVICE INTEGRATO	40
7.1 Caratteristiche e Vantaggi del Dispositivo	40
7.2 Microfluidica	42
7.3 Elettronica di condizionamento e trasmissione	42
7.4 Metodi di calibrazione	42
8. CONCLUSIONI	44
9. BIBLIOGRAFIA	45
RINGRAZIAMENTI	49

SOMMARIO

Il monitoraggio di metaboliti, in particolare glucosio e lattato, è di grande utilità nell'analisi dello stato di salute in diagnostica, nel controllo dell'andamento di malattie e nello sport.

Di recente, i biosensori indossabili per l'analisi basata sul sudore stanno ricevendo una crescente attenzione perché permettono un monitoraggio continuo e non invasivo dei parametri fisiologici.

In questo elaborato verranno quindi illustrati i vantaggi di questi sensori rispetto ai metodi convenzionali e confrontate le scelte riguardanti i principi di trasduzione, l'utilizzo o meno di recettori enzimatici e le tecniche di misura.

Infine, verrà portato un esempio di device integrato specificando le caratteristiche che lo rendono una valida opzione per garantire un monitoraggio multi-analita, mantenendo da un lato i costi contenuti e garantendo dall'altro confort per il paziente e affidabilità dal punto di vista medico.

ABSTRACT

Monitoring metabolites, in particular glucose and lactate, is of great use in the analysis of the state of health in diagnostic, in disease control and in sport.

Wearable sweat-based analysis biosensors are recently receiving an increasing amount of attention because they allow continuous, non-invasive monitoring of physiological parameters. This paper will illustrate the advantages of these sensors over conventional methods and compare the choices regarding the principles of transduction, the use or not of enzymatic receptors and measurement techniques.

Finally, an example of an integrated device will be brought by specifying the features that make it a viable option to guarantee multi-analytes monitoring with low cost, high comfort and reliability.

1. INTRODUZIONE

Il crescente interesse per i sensori indossabili negli ultimi anni è dovuto alla possibilità di portare importanti miglioramenti nelle analisi di biomarcatori correlati alla salute e allo stato fisiologico di una persona. Attualmente, la maggior parte dei dispositivi indossabili in commercio si è concentrata nel monitoraggio di parametri vitali come la frequenza cardiaca, a discapito dei sensori che si basano sulla trasduzione di informazioni biochimiche.

L'elaborato pone l'attenzione sui metaboliti, in particolare glucosio e lattato. Questi analiti chiave nella salute umana, tuttavia, vengono spesso rilevati con tecniche costose e invasive come le analisi di laboratorio, dispendiose anche in termini di tempistiche, o i dispositivi commerciali con funzionamento ad ago.

I biofluidi corporei, soprattutto il sudore, hanno dimostrato di avere una composizione chimica in relazione con quella del sangue, rendendoli di fatto valide alternative di facile prelievo e non invasive nella diagnosi e nella prevenzione delle malattie, oltre che nell'ottimizzazione delle prestazioni atletiche. I sensori indossabili che sfruttano il sudore permettono anche un monitoraggio continuo e in tempo reale dei metaboliti, requisito molto importante nella gestione del diabete e nell'utilizzo in ambito sportivo. Nel presentare i sensori indossabili basati sul sudore verranno approfonditi soprattutto i principi di trasduzione con i loro vantaggi e svantaggi, tenendo sempre in considerazione sfide chiave come l'ottenimento di una risposta utilizzando basse concentrazioni di analiti e piccoli volumi di biofluido.

A concludere, verrà illustrato un esempio di dispositivo indossabile integrato, multiplex che permette di effettuare misurazioni selettive e simultanee di glucosio, lattato e anche di elettroliti presenti nel sudore e di elaborare i segnali raccolti direttamente in situ.

2. SUDORE E METABOLITI

Il sudore è un biofluido che mostra svariati vantaggi; può essere generato in modo non invasivo e in maniera controllata (per esempio tramite stimolazione chimica locale) in punti del corpo convenienti per il posizionamento dei sensori consentendo un monitoraggio rapido e continuo della salute umana.

2.1 Fisiologia della produzione del sudore

Nell'analisi del sudore si prendono in considerazione le ghiandole sudoripare eccrine (coinvolte nella regolazione termica sulla maggior parte della superficie corporea), le quali sono preferibili alle ghiandole sudoripare apocrine che hanno lo svantaggio di essere localizzate solamente nell'inguine e nelle ascelle e la loro composizione molto oleosa e ricca di batteri può confondere le misurazioni.

La maggior parte della ghiandola è situata nel derma, una matrice di collagene, in gran parte acellulare e porosa, riempita di ISF (liquido interstiziale).

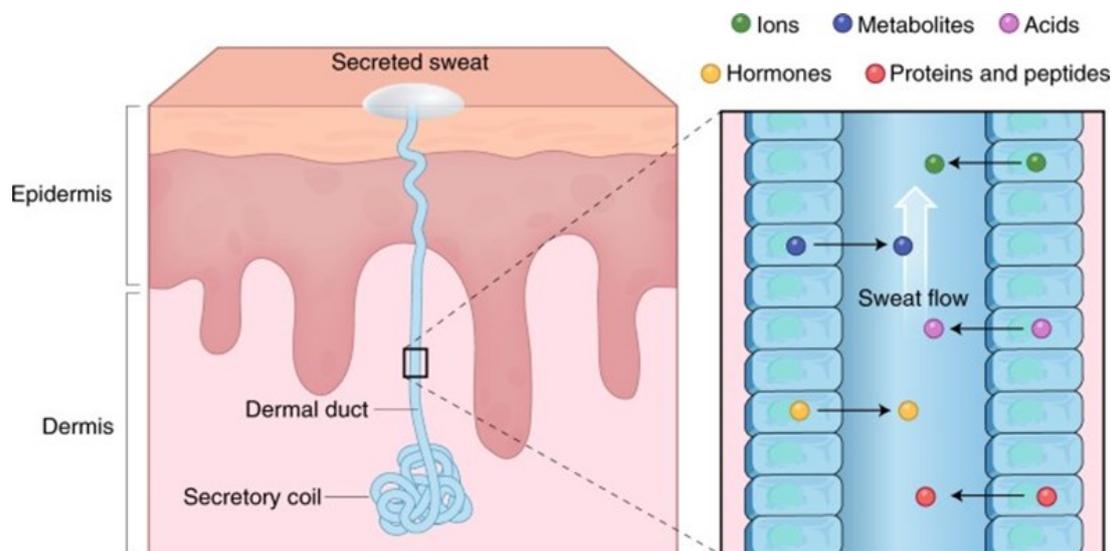


Figura 1 Struttura delle ghiandole sudoripare e ripartizione dei biomarcatori [1]

Il sudore più accessibile proviene dalle ghiandole eccrine composte da una spirale secretoria, altamente vascolarizzata, dove viene generato il sudore per la prima volta, e da un dotto dermico che trasporta il sudore alla superficie della pelle. Durante questo processo, gli analiti inclusi

ioni, metaboliti, acidi, ormoni, piccole proteine e peptidi vengono ripartiti nel sudore. Le specie ioniche più abbondanti sono Na^+ e Cl^- , responsabili della produzione di sudore. [1]

Na^+ e Cl^- vengono attivamente trasportati tra il sangue e la spirale secretoria per creare una differenza di osmolalità che forza il flusso nella ghiandola sudoripara. Quando il sudore scorre attraverso il dotto dermico, Na^+ e Cl^- vengono riassorbiti attraverso i canali nelle pareti del dotto dermico. Il tasso di riassorbimento è abbastanza costante e fa sì che Na^+ e Cl^- nel sudore secreto finale aumentino tipicamente con la sudorazione.

Sebbene i meccanismi di secrezione della maggior parte degli altri analiti nel sudore siano poco conosciuti, si teorizza che molti siano partiti dal sangue vicino o dal liquido interstiziale. L'esatto metodo di partizionamento, combinato con fattori tra cui dimensione carica dell'analita e velocità del sudore, influisce sulla concentrazione finale nel sudore secreto.

Nell'ordine di grandezza dei mM sono presenti ioni, tra cui Ca^{2+} e K^+ . Acidi o basi deboli (come l'ammoniaca) possono diffondersi nella ghiandola sudoripara e ionizzare a causa dell'alto pH del sudore. Altre specie, tra cui lattato e urea, potrebbero separarsi dal sangue o essere generate durante l'attività metabolica della ghiandola sudoripara, producendo concentrazioni dell'ordine dei mM. Molecole più grandi come il glucosio si trovano a concentrazioni intorno ai μM , inferiori rispetto al sangue. Oltre agli analiti generati naturalmente, alcol, droghe e metalli pesanti possono anche essere secreti nel tentativo del corpo di espellere le tossine.

Questo processo di secrezione del sudore avviene in maniera pulsante. Il tasso di generazione del sudore varia da 0,1 nL/min a più di 10 nL/min per ghiandola. Inoltre, poiché la spirale secretoria della ghiandola sudoripara è altamente vascolarizzata, le alterazioni del sangue circolante influiscono sul sudore con un tempo di ritardo piuttosto rapido, anche entro 2-5 minuti.

La generazione di sudore è in grado di creare pressioni fino a circa $70.000 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$, sufficienti affinché il sudore penetri nei pori idrofobici. La generazione di sudore è quindi chiaramente più che adeguata a spingere il sudore in un dispositivo microfluidico. Le densità delle ghiandole sudoripare eccrine variano da decine a centinaia di ghiandole per centimetro quadrato a seconda della zona corporea.

La composizione del sudore dipende in particolar modo dai meccanismi di ripartizione e anche dal metodo di stimolazione della sudorazione. Risulta prevedibile che il sudore prodotto a seguito di esercizio fisico, calore, stress o stimolazione chimica subisca variazioni nella composizione. Ad esempio, il sudore prodotto durante un intenso esercizio fisico, in cui il corpo

subisce rapidi cambiamenti fisiologici, avrà profili dinamici degli analiti che riflettono un'elevata attività metabolica. Pur essendo questo pertinente al monitoraggio della forma e attività fisica, gli screening medici sono realizzati meglio con il sudore proveniente dal corpo a riposo. Ciò può essere ottenuto con la stimolazione chimica locale delle ghiandole sudoripare in un processo chiamato ionoforesi. [2]

2.2 Principali metaboliti presenti nel sudore

Il sudore può fornire un'ampia gamma di informazioni sullo stato fisiologico mediante la rilevazione di composti biochimici, che comprendono metaboliti (ad es. glucosio, lattato, urea, cortisolo ed etanolo), elettroliti (ad es. potassio, sodio, cloruro, ammonio, zinco e rame) e grandi molecole (ad es. DNA, peptidi, proteine e citochine). A causa della loro abbondanza in questo biofluido, queste specie chimiche sono spesso utilizzate come analiti bersaglio nei sensori indossabili.

Inoltre, i composti chimici presenti nel sudore possono essere raccolti in modo non invasivo dagli strati più esterni della pelle e molti di essi possono fungere da surrogati per le concentrazioni di analiti nel sangue.

In particolare, i livelli di glucosio nel sudore sono associati alla glicemia. I livelli di lattato nel sudore possono fungere da biomarcatore per l'ipossia tissutale e l'ischemia da pressione. L'analisi dei livelli di acido urico nel sudore può offrire informazioni sulle malattie renali e sui cambiamenti del pH che possono essere collegati all'alcalosi metabolica. [3]

Tabella 1: concentrazioni fisiologiche dei metaboliti nel sudore [3]

glucosio	lattato	etanolo	urea
18-36 µg/mL	0.45-1.8 mg/mL	0.12-1.04 mg/mL	0.12-3 mg/mL
10-200 µM	5-20 mM	2.5-22.5 mM	2-10 mM

Si definiscono metaboliti le sostanze organiche prodotte nel corso o al termine dei processi metabolici, i quali sono l'insieme di tutte le trasformazioni chimiche che in genere trasformano

piccole molecole, ma includono anche processi macromolecolari come la riparazione e la replicazione del DNA e la sintesi e la degradazione delle proteine. [4]

La possibilità di una rapida e corretta determinazione analitica di un metabolita può dunque svolgere un ruolo chiave nel controllo della salute umana, a tutti i livelli, dalla prevenzione, alla diagnosi, al monitoraggio terapeutico. [5]

L'esempio più eclatante dell'importanza del monitoraggio dei metaboliti nella pratica medica quotidiana è la determinazione dei livelli di glucosio ematico nei pazienti affetti da diabete o da alterazioni della glicemia correlate al dismetabolismo glucidico. Il controllo dei livelli di glucosio nel sangue costituisce in pratica l'obiettivo finale per la prevenzione degli effetti devastanti dell'iperglicemia nei pazienti diabetici, con conseguente allungamento della sopravvivenza e miglioramento della qualità di vita. [6]

Allo stesso modo, il lattato, metabolita dei processi glicolitici anaerobici può essere utilizzato per monitorare stati patologici in cui, per carente apporto o per eccessivo consumo di ossigeno, vi sia accumulo di questo metabolita, come per esempio insufficienza respiratoria e ipossia tissutale (ridotto apporto O₂), acidosi lattica e sepsi (eccessivo consumo O₂). Inoltre, il lattato viene monitorato in ambito medico-sportivo per ottimizzare l'efficienza muscolare. [7]

Glucosio e lattato si possono dunque considerare i metaboliti chiave nel metabolismo umano. Il glucosio è un monosaccaride (zucchero semplice), costituito da una piccola molecola idrofila che circola nel sangue e rappresenta la fonte principale dell'energia che permette il funzionamento delle cellule del nostro organismo. Il livello ematico del glucosio, ovvero la glicemia o tasso glicemico, in condizioni di normalità e a digiuno, deve restare stabile all'interno di un intervallo di valori compresi tra 70 mg/dL (3,9 mmol/L) e 100 mg/dL (5,6 mmol/L). [8]

Vista l'importanza del glucosio nel sangue, il nostro corpo regola in modo intrinseco la glicemia per assicurare così il corretto apporto energetico a tutte le cellule, tessuti e organi, in primo luogo ai neuroni cerebrali. La regolazione della glicemia viene svolta principalmente da due ormoni prodotti dal pancreas: l'insulina, con funzione ipoglicemizzante, per l'accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno e il glucagone, che invece, promuove la produzione di glucosio a partire dal glicogeno, con effetto iperglicemizzante. [9]

L'aumento della glicemia è generalmente dovuto alla scarsa o mancata produzione di insulina e/o a deficit funzionale dell'insulina presente (per esempio per carente utilizzo da parte delle cellule) può comportare la comparsa del diabete.

Il diabete è la malattia metabolica più diffusa; ne deriva l'importanza del monitoraggio dei valori di glucosio nel sangue, che permette l'ottimizzazione della scelta terapeutica. La malattia diabetica si classifica in due principali forme: diabete di tipo 1, caratterizzato da mancanza o grave insufficienza di insulina (attualmente non è possibile prevenirla e la terapia è basata sulla somministrazione di insulina per tutta la vita) e diabete di tipo 2, caratterizzato da deficit insulinico parziale per ridotta produzione dell'ormone o ridotta efficacia dell'attività ormonale stessa.

Il diabete tipo 2, cui corrisponde circa il 90% dei casi di diabete, si presenta generalmente con l'insorgenza graduale di alti valori glicemici, per questo possono passare anni prima della comparsa dei sintomi. La terapia per questa seconda forma di diabete inizialmente può consistere anche solo nell'adozione di un'alimentazione sana e di attività fisica, ma possono essere necessari anche dei farmaci. [10]

Le complicanze legate all'alto tasso glicemico nei pazienti diabetici non trattati sono gravi e numerose: alterazione della parete dei vasi sanguigni, con conseguente riduzione del flusso sanguigno e sofferenza dei tessuti, alterazioni neurologiche con gravi perdite funzionali e, più a lungo termine, problemi cardiovascolari e renali ed elevato tasso di mortalità.

Il lattato, o acido lattico, è un sottoprodotto del metabolismo anaerobico; infatti, la sua concentrazione aumenta quando la richiesta di energia da parte dei tessuti non può essere soddisfatta dalla respirazione aerobica. Per questo motivo il lattato è correlato alla fatica muscolare. [11]

I valori normali di lattato nel sangue variano da 0,5 a 1,5 mmol/L a riposo e possono aumentare fino a 25 mmol/l durante lo sforzo intenso.

L'organismo umano per neutralizzare gli effetti nocivi legati all'eccesso di acido lattico ha diverse strategie: il meccanismo di riconversione del lattato in glucosio, attuato dalle cellule del fegato e l'utilizzo del lattato stesso da parte delle cellule del muscolo cardiaco, il quale è in grado di metabolizzarlo a scopo energetico. Grazie all'esistenza di processi enzimatici che ne permettono l'utilizzo per la produzione di energia, si può dunque affermare che questo metabolita non costituisca, in sé, un prodotto tossico per l'organismo. [12]

Nel ciclo della glicolisi il glucosio (o il glicogeno) viene scisso con liberazione di energia e formazione di piruvato come prodotto finale. Il piruvato a sua volta subisce trasformazioni diverse; la trasformazione da piruvato a lattato, catalizzata dall'enzima lattatodeidrogenasi (LDH), si verifica principalmente, ma non esclusivamente, in ambiente con carenza di ossigeno

(anaerobio), come avviene fisiologicamente a livello del tessuto muscolare dopo intenso esercizio fisico. Tuttavia, anche in condizioni di completo riposo, in condizioni di normalità, il metabolismo cellulare produce lattato.

Il monitoraggio dei livelli ematici di acido lattico permette di ottenere informazioni durante i test clinici da sforzo e durante i test delle prestazioni degli atleti. Concentrazioni elevate di lattato possono essere indicative di ischemia o ipossiemia, ma anche di una risposta fisiologica allo sforzo. Valori di picco si possono registrare già a pochi minuti dall'esercizio; infatti, la concentrazione di lattato aumenta gradualmente e poi più velocemente in seguito ad una intensità progressiva dell'esercizio, in quel caso si parla di soglia del lattato.

Con tale soglia (definita in inglese Lactate Threshold, e quindi con l'acronimo LT) si intende la frequenza di lavoro che, se superata, fa crescere esponenzialmente la concentrazione di lattato nel sangue. Questa soglia è quindi un ottimo metodo nel monitoraggio delle prestazioni atletiche e può essere un indicatore più efficace della frequenza cardiaca come indicatore dell'intensità dell'esercizio. [13]

3. ATTUALI METODI PER LA QUANTIFICAZIONE

3.1 Tecniche di laboratorio per glucosio e lattato

Da quanto detto nei paragrafi precedenti, risulta evidente l'enorme spinta all'evoluzione delle tecniche analitiche di laboratorio data dalla necessità di eseguire determinazioni accurate, precise e rapide dei metaboliti. Il dosaggio ematico del glucosio a livello laboratoristico si esegue su campioni di sangue venoso, prelevato con ago e poi inserito in provetta.

Il metodo più attualmente in uso è quello enzimatico-fotometrico, che assicura la massima specificità; per azione dell'enzima esochinasi, utilizzando ATP, il glucosio viene fosforilato a glucosio-6-fosfato. questo prodotto, in presenza di NADP e per azione di un enzima, viene ossidato con formazione di NADPH. La velocità di formazione di NADPH durante la reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio e viene misurata fotometricamente. [14]

Il lattato invece può essere determinato nel sangue, nel plasma, nel sudore o nelle urine utilizzando apparecchiature di laboratorio come la gascromatografia e la cromatografia liquida, entrambe accoppiate con il rilevamento basato sulla spettrometria di massa. Tuttavia, il costo di questi strumenti è generalmente elevato e le procedure analitiche per il trattamento del campione richiedono del tempo. In alternativa, il lattato può essere determinato mediante misurazioni spettrofotometriche basate sulle reazioni enzimatiche della lattato deidrogenasi (LDH) e della lattato ossidasi (LO). I principali inconvenienti dei metodi enzimatici sono l'instabilità dell'enzima nel tempo, soprattutto se immobilizzato, la necessità di controllare il pH e, in alcuni casi, la necessità di reagenti ausiliari e cofattori (come NAD⁺ o NADP⁺). [15]

3.2 Glucometro

I test eseguiti a casa per il monitoraggio della glicemia vengono attualmente riservati ai pazienti a cui è già stato diagnosticato il diabete. Infatti, è raccomandato ai diabetici che seguono una terapia insulinica di misurare spesso la glicemia (4-8 volte al giorno per i diabetici di tipo 1 e almeno due volte al giorno per i diabetici di tipo 2). I metodi più comuni di monitoraggio domestico sono il glucometro e il CGM

il glucometro a puntura del dito, noto anche come misuratore di glicemia o SMBG (self monitoring blood glucose), è un dispositivo utilizzabile in autonomia anche in assenza di

personale qualificato più volte al giorno; in questo modo il paziente può valutare da sé i livelli glicemici e regolare di conseguenza la terapia nutrizionale, l'esercizio fisico ed il trattamento farmacologico.

Per far funzionare il glucometro è necessario avere una penna punge dito con aghi e strisce reattive usa e getta solitamente inserite in un kit. Il dispositivo, infatti, analizza una piccola goccia di sangue capillare, prelevata pungendo il polpastrello, che risale poi per capillarità all'interno della striscia reattiva chimicamente attiva monouso e interfacciata con un misuratore digitale.

Oggi, la maggior parte dei glucometri sono di tipo elettrochimico e utilizzano strisce serigrafate commerciali. E' richiesto un piccolo campione di sangue e i risultati sono forniti in pochi secondi. La glucosio-ossidasi e la glucosio-deidrogenasi sono due tipi di enzimi che vengono utilizzati per le attuali strisce reattive elettrochimiche commerciali. In quel sito il glucosio si ossida dando un valore legato ad una variazione cromatica o ad una corrente elettrica. I glucometri moderni tipicamente effettuano la misura in 5-10 secondi a differenza dei primi modelli che richiedevano oltre 30 secondi.

Nel caso in cui si sfrutta la variazione cromatica proporzionale alla concentrazione di glucosio si parla di metodo riflettometrico (misura l'intensità del colore generato dalla reazione), in cui sono necessari due enzimi: la glucosio ossidasi GOD e il perossidasi POD. La misura amperometrica (basata sulla corrente elettrica) invece è molto più utilizzata.

La maggior parte dei misuratori di corrente sono calibrati al plasma e convertono automaticamente i risultati. Le moderne strisce reattive elettrochimiche per la glicemia utilizzano lo spazio capillare per aspirare automaticamente il sangue sulla superficie del test, che richiede solo un piccolo volume (circa 0,3 ml) e ha un rilevamento automatico del riempimento che assicura che alla striscia sia fornito un volume sufficiente di sangue. Inoltre, requisiti di volume sanguigno più bassi consentono siti alternativi per il test della glicemia come il braccio o la coscia che potrebbero essere meno dolorosi e fornire risultati simili alla punta del dito.

Le limitazioni di questi dispositivi sono legate alle strisce reattive, le quali devono essere compatibili con il glucometro, non devono essere scadute e vanno conservate in ambienti asciutti e lontane da fonti di calore. Tuttavia, la necessità di prelevare una piccola goccia di sangue riduce di molto il tempo e l'invasività della misura rispetto alle tecniche di laboratorio, oltre che ad avere un buon rapporto costi-benefici. [16] [17]

3.3 CGM

Il monitoraggio continuo della glicemia (CGM) consiste in un dispositivo che misura il glucosio nel liquido interstiziale ogni 10 secondi e che registra un valore medio della glicemia ogni cinque minuti 24 ore al giorno. Questo fornisce un modello più accurato delle fluttuazioni glicemiche giornaliere consentendo l'identificazione dell'effetto sulla glicemia da parte del cibo, dell'attività fisica, dell'insulina e di diversi tipi e dosi di farmaci.

Un sistema CGM è composto da tre parti principali.

La prima è un piccolo sensore monouso (sostituito ogni 3-7 giorni, a seconda del modello) inserito sotto la pelle; i sensori attualmente in uso utilizzano una reazione enzimatica con le molecole di glucosio nel liquido interstiziale in modo da generare una piccola corrente elettrica proporzionale alla concentrazione. La seconda componente è il trasmettitore posizionato sulla pelle ma attaccato al sensore. Il trasmettitore invia informazioni tramite onde radio al ricevitore, che può essere uno smartphone o un monitor wireless il quale è la terza parte del CGM e permette la visualizzazione dei dati. Il monitor può essere legato alla cintura o tenuto in tasca e include l'allarme che avverte di livelli glicemici fuori target (i valori sono impostabili dall'utente per adattare l'allarme ai propri target glicemici).

I vantaggi rispetto alle misure basate sul test del polpastrello sono le seguenti:

- consente di controllare la glicemia senza dover prelevare un campione di sangue
- è possibile esaminare in tempo reale (ogni 5 minuti) i livelli e le variazioni della glicemia all'insulina, all'esercizio fisico, all'alimentazione e ad altri fattori
- è un monitoraggio garantito anche quando il soggetto non può effettuare il test del polpastrello, ad esempio durante il sonno. [18]

Lo svantaggio di questi dispositivi è legato alla necessità occasionale (generalmente due volte al giorno) di calibrazione con la misurazione tradizionale basata sulla puntura del dito. Inoltre, il CGM non è accurato come il test il polpastrello e le misurazioni di glucosio nel fluido interstiziale sono in ritardo di qualche minuto rispetto a quelle classiche. Alcuni soggetti trovano scomodo avere un sensore sottocutaneo e in generale devono comunque confermare i risultati con un test del polpastrello prima di correggere la glicemia con l'insulina. infine, il costo e la mancanza di un formato standard per la visualizzazione dei risultati sono degli ulteriori svantaggi. [19]

3.4 Test del lattato

La base per determinare la soglia del lattato è che esiste un punto di deflessione in corrispondenza di un determinato carico di lavoro (in questo caso, velocità di marcia) dove il lattato nel sangue aumenta esponenzialmente con un corrispondente aumento del carico di lavoro

Il modo più accurato per quantificare la soglia di lattato (LT) di un atleta consiste in un metodo invasivo effettuato in laboratorio. Occorre infatti che vari campioni di sangue capillare, (presi dal polpastrello) devono essere prelevati dall'atleta durante il test da sforzo incrementale graduato, definito anche come test del lattato di Mader.

Il sangue viene messo su una piccola striscia reattiva e inserito in un analizzatore di lattato ematico automatizzato il quale, dopo alcuni secondi, visualizza la concentrazione di lattato con l'unità di misura mmol/L.

Quando il campione di sangue è stato prelevato correttamente, l'atleta riprende l'esercizio con maggiore intensità, nel caso della corsa con maggiore velocità. Utilizzando questo metodo, è possibile trovare la curva mostrata in Figura 2 contenente le concentrazioni di lattato ematico in relazione all'aumento della velocità di corsa. E' infatti visibile un punto di deflessione in corrispondenza di una certa velocità.

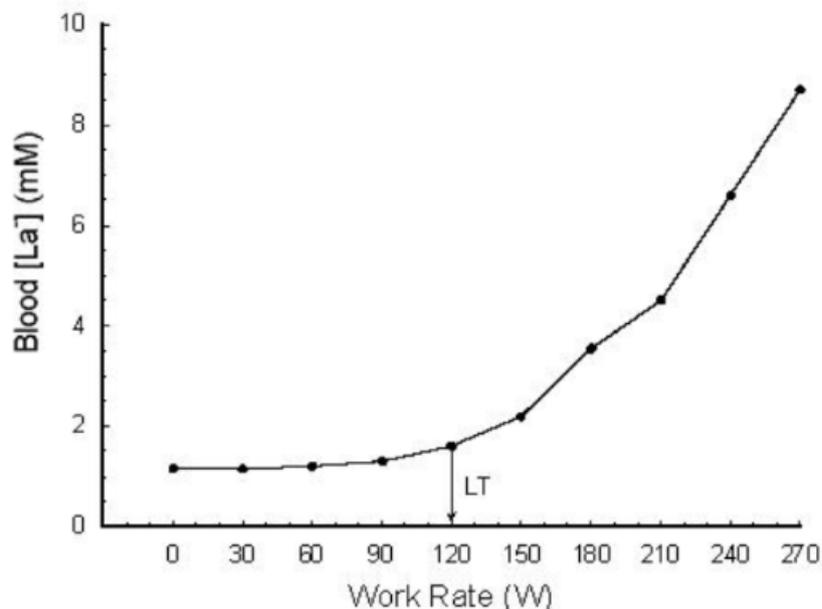


Figura 2 Concentrazione di lattato nel sangue in risposta ad uno sforzo incrementale [13]

Per prassi, la soglia di lattato viene associata all'intensità correlata a una concentrazione di lattato di 4 mmol/l.

Questo test viene ancora oggi considerato il più valido e attendibile in quanto effettua misurazioni dirette della concentrazione di lattato nel sangue, ma è un metodo costoso (circa 100-150 €) e invasivo. Le limitazioni di questo metodo includono anche l'interruzione del test per ogni raccolta del campione, rendendo impossibile il feedback in tempo reale e il valore standard di 4 mmol/l non è corretto per tutti i soggetti. [20]

4. BIOSENSORI PER METABOLITI

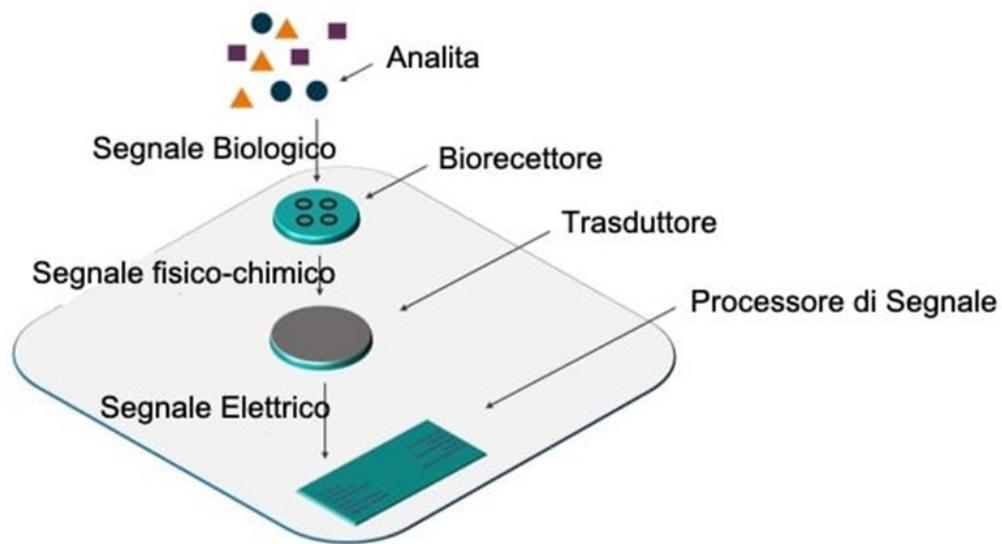
Il monitoraggio continuo di biomarcatori come i metaboliti ha trasformato il processo di cura del paziente permettendo di raccogliere statistiche cliniche fondamentali nella diagnosi della malattia, nella sua progressione, nel monitoraggio della terapia del paziente ma anche nel controllo di parametri utili in altri ambiti come lo sport. A questo scopo risultano fondamentali i sensori biochimici continui, o biosensori, che consentono l'interazione tra biomarcatore di interesse e recettore in tempo reale e danno in output segnali quantificabili proporzionali alla concentrazione del biomarcatore.

4.1 Biosensori basati sul sudore

Un biosensore è un compatto dispositivo analitico con un elemento di riconoscimento biologico utilizzato per rilevare concentrazioni di analiti biologici mediante l'interazione selettiva tra recettore e biomarcatore. Questa interazione, producendo una risposta elettrica, ottica, termica o di altro tipo, è misurata dal trasduttore che emette in uscita un segnale misurabile proporzionale alla presenza dell'analita target nel campione. Idealmente il dispositivo deve funzionare in modo continuo, reversibile e senza modificare il campione. [21]

Tipicamente i biosensori sono costituiti da tre componenti:

- un biorecettore, l'elemento sensibile di origine biologica per il riconoscimento degli analiti di interesse, i più comuni in uso includono enzimi, anticorpi e DNA/RNA. È proprio questa componente a conferire selettività e sensibilità al biosensore e solitamente è strettamente collegata o integrata al trasduttore mediante immobilizzazione.
- un trasduttore per la conversione delle informazioni chimico-fisiche dovute all'interazione tra analita e biorecettore in un segnale di tipo elettrico od ottico che può essere amplificato e misurato.
- un processore di segnale per riportare il segnale dell'analita [22]



STRUTTURA DI UN BIOSENSORE

Figura 3 Struttura di un biosensore [23]

Negli ultimi anni vari sensori di sudore indossabili sono stati sviluppati combinando diversi fattori di forma, substrati e meccanismi di rilevamento. Per il monitoraggio continuo della forma fisica, i sensori integrati nei comuni accessori per gli atleti (come braccialetti o fasce per la testa) possono essere indossati comodamente e con un'ostruzione minima nel movimento. In ambito medico invece sono preferibili cerotti per la loro capacità di poter aderire alla pelle con una maggiore flessibilità di posizionamento. Inoltre, è possibile l'estrazione locale del sudore all'equilibrio mediante la ionoforesi, molto utile per garantire una quantità sufficiente di sudore estratto. [1]

Per quanto riguarda il rilevamento di analiti nel sudore sono disponibili vari metodi. Il più comune e versatile è il rilevamento elettrochimico, che consiste nel misurare correnti o potenziali su degli elettrodi funzionalizzati per la trasduzione delle concentrazioni di analiti. Un'altra tecnica molto utilizzata è il rilevamento colorimetrico, basato su dei reagenti i quali, dopo l'esposizione ai loro specifici analiti target, subiscono variazioni di colore misurabili. Tra gli altri metodi sono inclusi il rilevamento ottico e basato sull'impedenza.

Nel caso in cui il monitoraggio degli analiti nel sudore non possa essere fatto durante l'esercizio fisico, ossia in condizione di soggetto a riposo, è molto utile sfruttare la ionoforesi, la quale, applicando una corrente locale sotto la pelle permette di ottenere quantità sufficienti di sudore per garantire un monitoraggio continuo.

La corrente viene applicata tra pilogel o idrogel contenenti un farmaco che stimola le ghiandole sudoripare, la pilocarpina. Questo farmaco viene spinto sotto la superficie della pelle e attiva le ghiandole eccrine. Tuttavia, è stato riportato che l'uso della ionoforesi in corrente continua (dc) dà effetti spiacevoli, dovuti alla polarizzazione della pelle, tra cui ustioni elettriche, bruciore o eritema. Pertanto, l'applicazione della ionoforesi in corrente continua è limitata a circa 15 minuti ed è stato anche studiato l'uso della ionoforesi in corrente continua pulsata o alternata (ac). [1] [24]

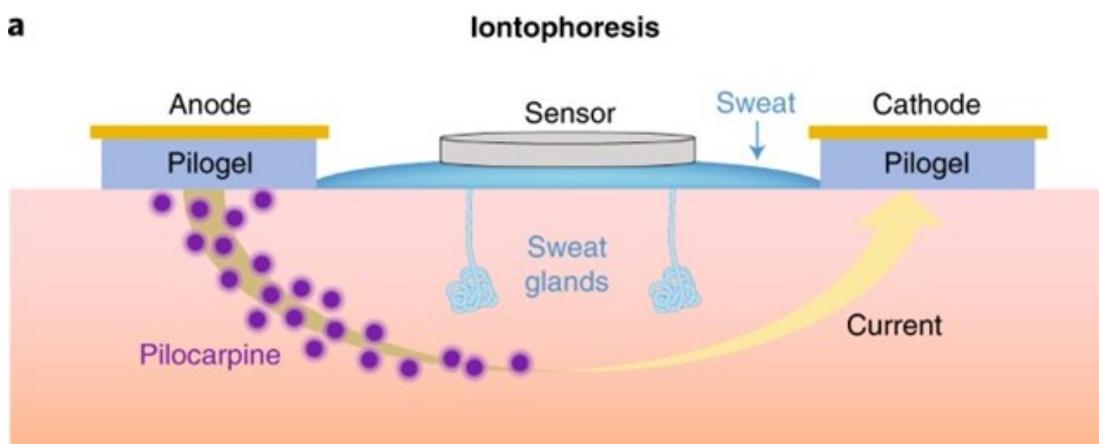


Figura 4 Ionoforesi per la stimolazione del sudore [24]

4.2 Sensori indossabili non invasivi

Negli ultimi anni i biosensori indossabili non invasivi hanno ottenuto molto interesse nel monitoraggio dello stato fisiologico grazie al loro potenziale di fornire misurazioni continue e non invasive di biomarcatori da fluidi come sudore, lacrime, saliva, e liquido interstiziale cutaneo, i quali sono stati presi in considerazione poiché essere facilmente accessibili senza interrompere gli strati esterni della pelle e senza entrare in contatto con il sangue.

L'utilizzo di materiali flessibili ha dato importanti miglioramenti nella combinazione di biorilevamento multiplex, campionamento microfluidico e sistemi di trasporto, la quale è stata integrata e miniaturizzata per una migliore indossabilità e facilità d'uso. [3]

Anche lo sviluppo recente della tecnologia wireless ne ha ulteriormente facilitato l'utilizzo mediante con moduli wireless integrati, capaci di collegare trasduzione, elaborazione e trasmissione del segnale tra i biosensori e visualizzazione in tempo reale. Per questo motivo, gli sforzi nella ricerca si sono spostati dai sensori fisici che monitoravano la mobilità e i segni

vitali, come i passi, le calorie bruciate o la frequenza cardiaca alle applicazioni sanitarie, come la gestione del diabete o il monitoraggio degli anziani da remoto.

Tuttavia, per l'affidabilità delle misure è ancora necessario comprendere meglio le correlazioni tra le concentrazioni di analiti nel sangue e i biofluidi non invasivi i quali rappresentano spesso una sfida in termini di volumi del campione, velocità di secrezione, filtraggio, canali attivi dell'analita, pH e salinità variabili e altri fattori confondenti nelle misurazioni.

Bisogna anche tenere conto delle basse concentrazioni di analiti nel biofluido e di fattori come la resilienza meccanica, la possibile incrostazione (biofouling) e la biocompatibilità del sensore. Attualmente, i biosensori indossabili non invasivi come alternativa ai dispositivi di monitoraggio del sangue richiedono ulteriori studi di convalida per la commercializzazione, ma sono promettenti grazie alla loro specificità, velocità di misura, portabilità, costi ridotti e bassi requisiti di alimentazione. [2],[25]

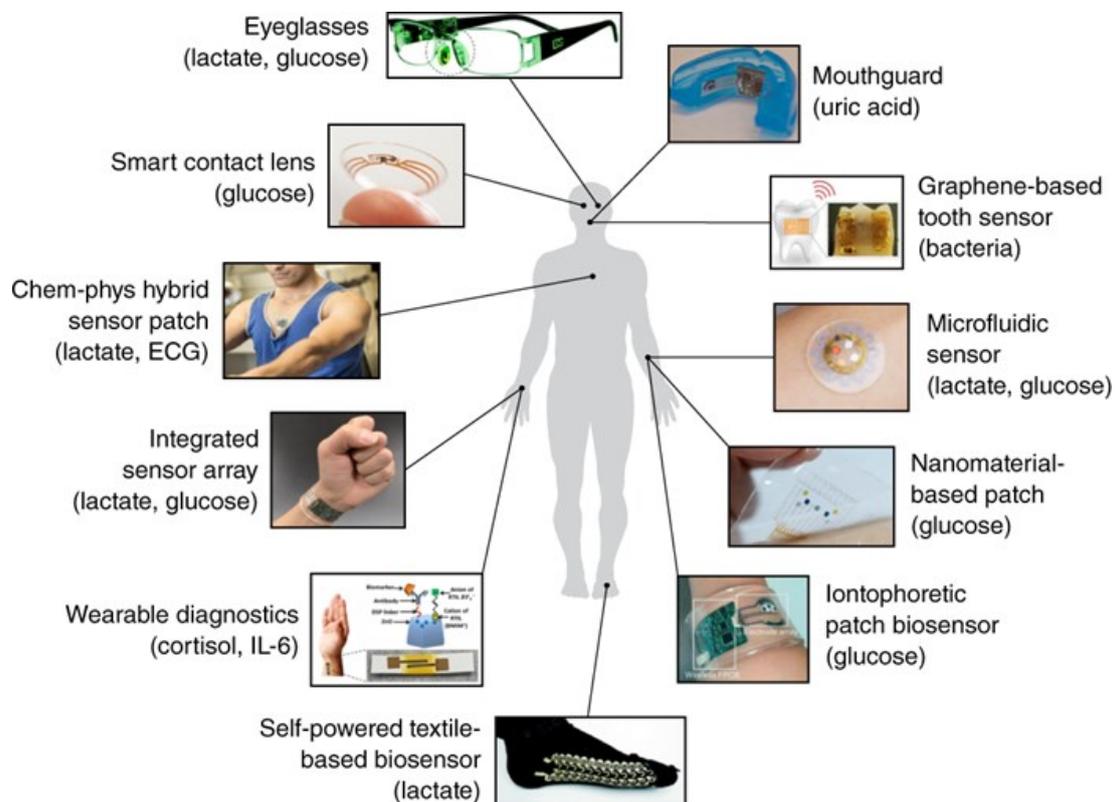


Figura 5 Esempi rappresentativi di biosensori indossabili. [25]

4.3 Sensori enzimatici e non enzimatici

I biosensori possono essere classificati in più categorie sulla base del tipo di recettore (l'elemento di riconoscimento biologico, collegato al trasduttore) utilizzato e del meccanismo

di trasduzione. In base al tipo di recettore, i sensori possono essere enzimatici, immunosensori (basati sulle interazioni anticorpo-antigene), ad aptameri (molecole di RNA o DNA a filamento singolo che si legano ai loro bersagli con elevata specificità e affinità), a DNA/RNA, a base di peptidi e a cellula intera.

Ad oggi, i biosensori enzimatici sono i più usati a livello commerciale per le loro prestazioni in termini di sensibilità, costo, compattezza e semplicità di funzionamento; inoltre, non richiedono strutture di laboratorio o personale addestrato.

I biosensori enzimatici più comunemente usati nei dispositivi indossabili sono per il rilevamento di lattato, glutammato, urea e colesterolo e si basano sul rilevare un trasferimento di elettroni nelle reazioni enzimatiche sulla superficie dell'elettrodo per monitorare gli analiti bersaglio nei biofluidi. [3]

L'utilizzo di enzimi richiede un ambiente appropriato per mantenerne la stabilità. L'attività massima dell'enzima dipende tipicamente dalla natura dell'elemento biologico, dal trasduttore, dalle proprietà dell'analita e dalle condizioni operative. È necessario immobilizzare gli enzimi attraverso approcci come l'adsorbimento.

Sebbene i sensori enzimatici siano altamente selettivi, l'immobilizzazione è una procedura impegnativa e la durata di conservazione pone dei limiti. Oltre a queste difficoltà, esistono problemi di selettività se la concentrazione di un composto interferente è più alta rispetto all'analita di interesse: infine c'è un cambiamento nella corrente di fondo dovuto all'incrostazione della superficie dell'elettrodo.

Per questo motivo sono stati sviluppati i sensori non enzimatici. Questi biosensori utilizzano nanomateriali per ottenere stabilità, riproducibilità e semplicità. I nanomateriali svolgono un ruolo fondamentale nel miglioramento dell'attività elettrocatalitica e della selettività.

Tuttavia, l'uso di elettrodi non rivestiti porta a una cinetica lenta, bassa sensibilità e alti sovrapotenziali. Per evitare questi problemi occorre modificare l'elettrodo di lavoro tramite diversi tipi di nanomateriali che includono metalli come oro e platino e materiali a base di carbonio. [22] [26]

4.4 Principi di trasduzione

Sulla base del meccanismo di trasduzione, i sensori possono essere classificati in elettrochimici, ottici, piezoelettrici e termici/calorimetrici, ma solo le prime due categorie sono le più comunemente utilizzate.

I sensori elettrochimici sono molto versatili, semplici da fabbricare e permettono di ottenere la concentrazione degli analiti di interesse misurando correnti o potenziali ai capi degli elettrodi.

I sensori ottici invece si differenziano in due tipologie: colorimetrici e fluorimetrici. Qui, le interazioni tra analita e biorecettore inducono dei cambiamenti quantificabili nell'intensità e nella lunghezza d'onda. Il loro vantaggio si basa sulla semplicità, sul poter funzionare senza una fonte energetica, sulla sensibilità e selettività. Restano comunque difficoltà legate alla loro ripetibilità.

5. TRASDUTTORI ELETTROCHIMICI

I biosensori elettrochimici (ECB) sono dispositivi che uniscono la sensibilità dei trasduttori elettrochimici con la specificità dei biorecettori per fornire informazioni analitiche semiquantitative o quantitative

La maggior parte dei biosensori utilizza il rilevamento elettrochimico come principio di trasduzione grazie ai suoi vantaggi: bassi limiti di rilevamento, ampio intervallo di risposta lineare, buona stabilità e riproducibilità, semplicità di costruzione, basso costo, portabilità e piccoli volumi di campione. In molti casi i biosensori elettrochimici utilizzano reazioni catalitiche enzimatiche e, convenzionalmente, il substrato del sensore contiene tre elettrodi separati.

L'elettrodo di lavoro (WE, working electrode), in materiale conduttivo chimicamente stabile, come carbonio, oro, platino o altro, è l'elemento di trasduzione sulla cui superficie viene fissato il biorecettore (dove avviene la reazione).

L'elettrodo ausiliario (CE, counter electrode) chiude il circuito con il WE, consentendo il flusso e la lettura della carica proveniente dalla reazione avvenuta sulla superficie del WE. In genere è costituito da carbonio o platino ed è di dimensioni molto più grandi del WE per evitare limitazioni di corrente.

L'elettrodo di riferimento (RE, reference electrode) produce un potenziale stabile e dato per controllare il potenziale del WE o per consentire la misura di un elettrodo. Il più comune è l'elettrodo standard a idrogeno con un potenziale nullo di semicella o un filo d'argento rivestito con cloruro d'argento. [27] [28]

Ad eccezione della cella elettrochimica convenzionale composta da elettrodi solidi e che richiede diversi millilitri di campione, esistono varianti e versioni miniaturizzate. Le celle microfluidiche offrono un campionamento e una pulizia più semplici, maggiore sensibilità, maggiore SNR (rapporto segnale-rumore) e un consumo minore di reagenti. [29]

Le tecnologie di stampa hanno portato a vantaggi importanti mediante la miniaturizzazione degli elettrodi, l'uso di inchiostri nanostrutturati, i percorsi microfluidici stampati e l'estensione a substrati non convenzionali.

In questo caso si parla di elettrodi serigrafati, i quali sono minielettrodi che vengono depositati o stampati su un substrato polimerico formando un sistema di misurazione molto piccolo. Vengono prodotti in serie con elevata riproducibilità e bassi costi e consentono facili modifiche della superficie dell'elettrodo di lavoro.

I vantaggi più evidenti comprendono la riduzione del volume di campione richiesto da millilitri a un intervallo tra i picolitri e i microlitri e la riduzione del rumore accoppiato agli elettrodi (la ridotta area superficiale e il percorso della corrente riducono la corrente capacitiva di fondo e la caduta resistiva tra elettrodo e soluzione). [30]

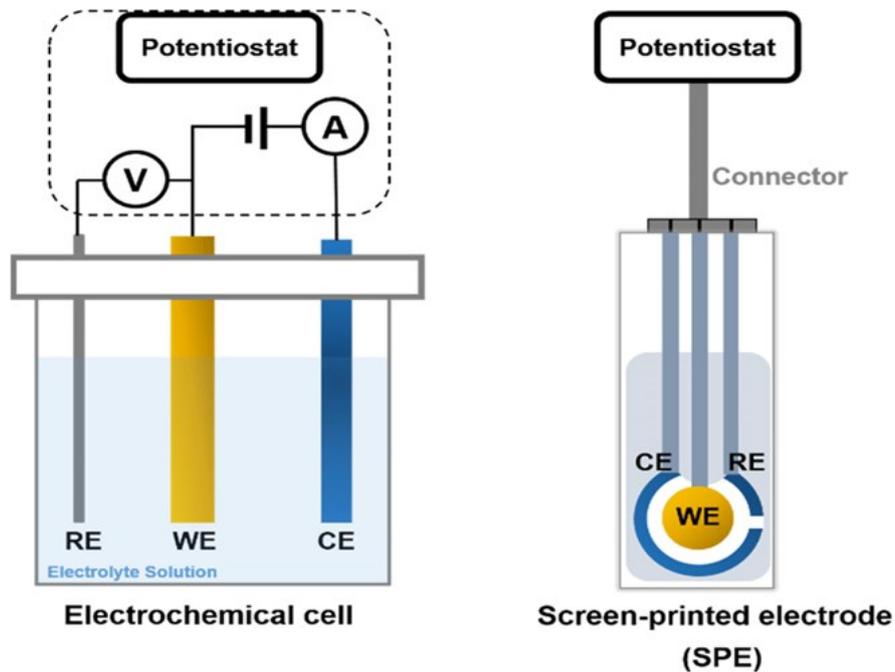


Figura 6 Due tipi di biosensori elettrochimici con tre elettrodi collegati ad un potenziostato. [31]

In generale, le variazioni elettriche dovute alle reazioni di ossidazione/riduzione dell'analita possono essere analizzate misurando correnti o potenziali. La produzione o consumo di elettroni provoca un cambiamento delle proprietà della soluzione; questo cambiamento viene misurato relativamente ad un elettrodo di riferimento sempre stabile. Il processo dipende dall'attività della specie e non dalla concentrazione della soluzione perché si focalizza sulla superficie dell'elettrodo di lavoro.

Esistono anche tecniche elettrochimiche che non sfruttano il flusso di elettroni e non si concentrano sulla reazione redox. È infatti possibile analizzare i cambiamenti in parametri come resistenza, capacità o impedenza sulla superficie dell'elettrodo.

Pertanto, la semplicità nel trasformare le interazioni biologiche in segnali elettrici e la varietà di proprietà elettriche misurabili con metodi come potenziometria, amperometria, impedimetria, conduttometria e voltammetria rendono i biosensori elettrochimici un'ottima opzione nel monitoraggio di parametri fisiologici.

La realizzazione di dispositivi di rilevamento indossabili, tuttavia, richiede l'utilizzo di sensori elettrochimici dai tradizionali substrati rigidi a fogli flessibili, indossabili e conformi. Il dispositivo indossabile idealmente deve mantenere la capacità di rilevamento sotto le condizioni di normale usura che può imporre importanti deformazioni meccaniche. Questi requisiti di robustezza impongono ulteriori vincoli come la conservazione dell'area di rilevamento, l'efficace intrappolamento dell'elemento di bioriconoscimento e la riduzione al minimo della lisciviazione e delle potenziali fonti di interferenza. [33]

Ad oggi è stata sviluppata un'ampia gamma di biosensori elettrochimici indossabili per il monitoraggio non invasivo in tempo reale di elettroliti e metaboliti nel sudore, nelle lacrime o nella saliva come indicatori dello stato di salute potenzialmente utilizzabili in assistenza sanitaria personale, così come in applicazioni sportive. [32]

Per quanto riguarda i sensori di sudore, la maggior parte si basa su tecniche di trasduzione amperometriche e potenziometriche grazie alla loro eccellente sensibilità e semplicità nello sviluppo di circuiti elettronici miniaturizzati. [34]

5.1 Amperometrici

Nei trasduttori amperometrici viene utilizzata una conformazione a tre elettrodi (WE, CE e RE). Un potenziale fisso viene applicato all'elettrodo di lavoro attraverso un segnale proveniente da un generatore e viene misurata la corrente risultante, proporzionale alla concentrazione dell'analita target e dovuta alla reazione redox di molecole elettroattive che scambiano elettroni con la superficie conduttiva del WE. [29]

I vantaggi di questa tecnica riguardano la semplicità del rilevamento e della post-elaborazione per convertire la corrente misurata in una concentrazione ed è possibile ridurre il potenziale necessario e quindi il consumo di energia tramite dei mediatori.

Tuttavia, per le specie tracciate al di sotto dei μM , il segnale può decadere del tempo e fornire imprecisioni nella conversione in concentrazione. Un altro limite dell'amperometria è la necessità, in genere, di avere un enzima per fornire selettività.

Nei biosensori amperometrici stampati l'effetto dell'ambiente circostante, delle interferenze nella composizione del tampone e della sensibilità incrociata è ancora un problema. Altre limitazioni, nel caso di elettrodi impiantabili e di analisi eseguite sui biofluidi, riguardano l'incrostazione (fouling) degli elettrodi che può limitare lo scambio di elettroni. [30]

Se il segnale proveniente dal generatore viene fatto variare, le tecniche appartengono alla sottoclasse dei trasduttori voltammetrici, molto utilizzati dai gruppi di ricerca nell'analisi del biorilevamento. In voltammetria viene eseguita una scansione di tensione tra l'elettrodo di lavoro e quello di riferimento e le caratteristiche risultanti di corrente vengono estratte per determinare la concentrazione degli analiti target.

Il sensore misura quindi la relazione tra corrente e potenziale; quest'ultimo specifico per le specie esaminate in corrispondenza dei picchi redox la cui dimensione è proporzionale alla concentrazione. Risulta possibile rilevare più composti con diversi potenziali caratteristici in una sola misurazione.

Infatti, la posizione della corrente di picco è correlata allo specifico analita e la densità di corrente di picco è proporzionale alla concentrazione delle specie corrispondenti.

I metodi voltammetrici possono essere suddivisi in varie categorie, ma le più utilizzate sono la voltammetria ciclica (CV), a scansione lineare (LSV) e differenziale a impulsi (DPV).

La LSV è la più semplice, in cui il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro aumenta linearmente nel tempo. La scansione inizia prima del potenziale di scarica e poi viene interrotta.

La corrente che scorre attraverso l'elettrodo di lavoro ha come componenti la corrente faradica e la corrente capacitiva.

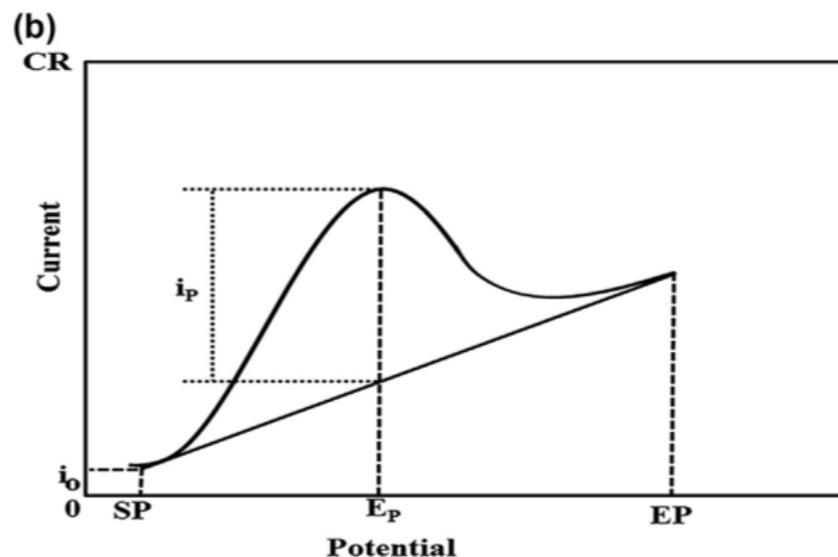


Figura 7 Grafico del voltammogramma per la LSV [22]

Nell'immagine è rappresentata la relazione tra corrente misurata e potenziale e sono evidenti elementi come SP il potenziale iniziale, E_p il potenziale finale, i_0 la corrente all'inizio della scansione, i_p la corrente di picco ed E_p potenziale di picco.

La corrente faradica è dovuta alla scarica del composto elettroattivo; invece, la corrente capacitiva è prodotta dalla crescita di un doppio strato elettrico che funge da condensatore all'interfaccia tra l'elettrodo e la soluzione. Infine, la corrente totale attraverso l'elettrodo è data dalla somma della corrente di carica del condensatore (capacitiva) e della corrente faradica.

Nella voltammetria a scansione lineare la corrente capacitiva aumenta all'aumentare della velocità di scansione e non può essere compensata elettronicamente. Questo limita le prestazioni della LSV con limiti di rilevamento che variano a livelli di $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

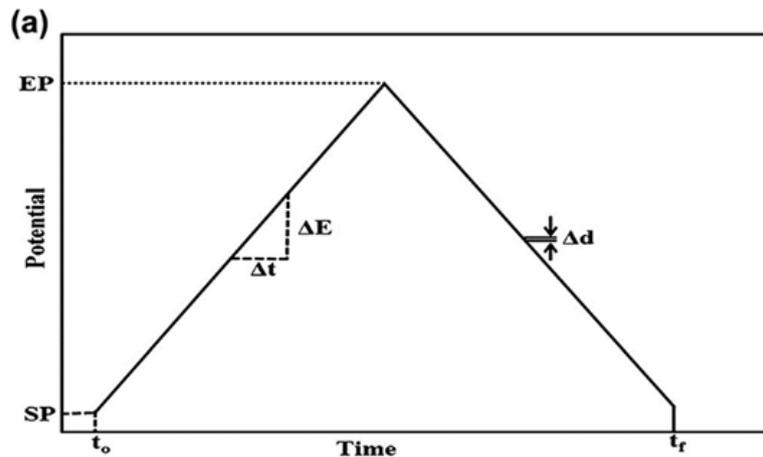


Figura 8 Voltammetria ciclica [22]

Tra le varie tecniche voltammetriche, la voltammetria ciclica è la più utilizzata. La CV esegue una scansione di forma triangolare all'elettrodo di lavoro immerso in soluzione e misura la corrente risultante. Il segnale triangolare di eccitazione fa variare linearmente nel tempo il potenziale con una velocità definita come sweep rate.

Il grafico della relazione tra potenziale e corrente mostra una curva chiusa anche definita come voltammogramma ciclico.

Questa tecnica viene sfruttata per analizzare il comportamento delle coppie redox che, se reversibili, mostrano picchi sia catodici che anodici, mentre i sistemi redox irreversibili mostrano un solo picco.

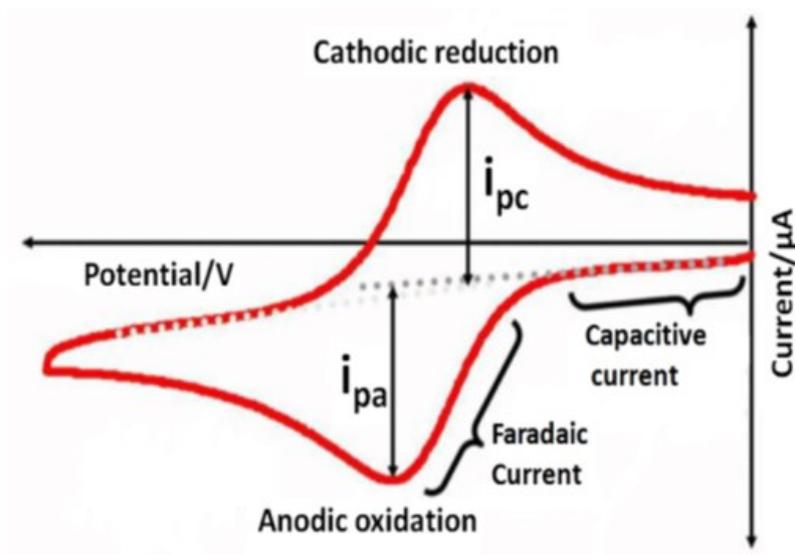


Figura 9 Voltammometria ciclica: relazione potenziale-corrente [22]

Infine, nella voltammometria a impulsi differenziali (DPV) vengono sovrapposti degli impulsi periodici a potenziale costante ad una scansione lineare. Questo permette di ottenere un voltammogramma a picco se avviene una lettura differenziale meno influenzata dalla corrente capacitiva; di conseguenza si ha una misurazione molto sensibile con limiti di rilevamento dell'ordine dei $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

I vantaggi della voltammometria consistono nella possibilità di utilizzare una sola scansione di tensione sugli stessi due elettrodi per estrarre informazioni su più analiti (con potenziali redox unici) contemporaneamente; per ottimizzare il rapporto segnale-rumore è disponibile una varietà di sotto-tecniche; è possibile accoppiarla con tecniche pre-concentrazione per ottenere limiti di rilevamento maggiori in confronto con l'amperometria.

Purtroppo, le scansioni di tensione possono innescare reazioni di fondo che interferiscono con il segnale utile e, rispetto all'amperometria, è richiesta una post-elaborazione più complessa per estrarre i picchi corrispondenti all'analita desiderato.

In generale, sia l'amperometria che la voltammometria possono raggiungere un limite di rilevamento (LOD) inferiore a 10^{-12} M; hanno ottime sensibilità e specificità, permettono il monitoraggio continuo di composti con diversi potenziali caratteristici in una sola misurazione. Sono comunque necessarie l'elettroattività e la produzione di corrente; queste tecniche sono suscettibili a interferenze e non rimangono stabili a lungo termine. [22]

Per quanto riguarda i sensori indossabili, l'amperometria è molto utilizzata. [35]

Per il monitoraggio continuo e non invasivo dei metaboliti salivari, in particolare del lattato, è stato progettato un paradenti integrando un biosensore enzimatico amperometrico. Il trasduttore stampabile era composto dal blu di Prussia, il quale offre una buona selettività del prodotto delle reazioni di ossidazione. [36]

Un altro esempio di dispositivo indossabile che sfrutta questa tecnica è stato progettato da Gao et. Al. in cui i sensori amperometrici di glucosio e lattato sono basati sugli enzimi glucosio ossidasi e lattato ossidasi. Un elettrodo Ag/AgCl funge da RE condiviso e da CE per entrambi i sensori. L'uso del blu di Prussia come mediatore riduce al minimo i potenziali di riduzione a circa 0 V, eliminando così la necessità di una fonte di alimentazione esterna per attivare i sensori. Questi sensori enzimatici generano autonomamente segnali di corrente proporzionali alla concentrazione dei corrispondenti metaboliti tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo Ag/AgCl. [37]

5.2 Impedimetrici

Molto utilizzati sono i trasduttori impedimetrici, basati sulla correlazione diretta tra le variazioni di impedenza e le variazioni di concentrazione dell'analita target sulla superficie del sensore. Tutto questo senza la necessità di etichette aggiuntive o elettroattività della biomolecola analizzata.

Il metodo viene definito come spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) e consiste nell'applicare una tensione alternata ai due elettrodi di lavoro e di riferimento. Questa tensione deve avere un'ampiezza costante, solitamente compresa tra i 5 e i 10 mV, e un intervallo di frequenza definito. Successivamente, viene misurata direttamente la corrente alternata risultante e l'impedenza complessiva Z .

Tra i vantaggi dei biosensori impedimetrici ci sono le basse tensioni impiegate, che non danneggiano o disturbano gli strati di riconoscimento; inoltre, il legame selettivo tra l'analita target e la superficie del sensore produce selettivamente il cambiamento di impedenza; quindi, non è richiesto che le specie inattive elettrochimicamente siano accoppiate alle etichette redox prima del rilevamento.

Rispetto ai metodi potenziometrici o amperometrici, i limiti di rilevamento sono peggiori (intorno a 10^{-8} M), i tempi di analisi richiesti sono più lunghi, la post-elaborazione è più complessa e il principale inconveniente riguarda i falsi positivi. Inoltre, la sensibilità al

rilevamento diretto del legame può risultare troppo bassa, con conseguente necessità di integrare tecniche di amplificazione.

Fattori come pH, temperatura, caratteristiche del tampone o degli ioni non reattivi influenzano l'accuratezza e la ripetibilità della misura. Anche l'ampio spettro di frequenze della tensione applicata porta ad una potenza ridotta e, di conseguenza, ad un SNR limitato quando viene misurata l'impedenza. Resta tuttavia rilevante la possibilità di fornire direttamente il risultato, anche senza l'elettroattività dell'analita target.

I biosensori impedimetrici possono essere ulteriormente classificati in reattivi e conduttometrici.

I primi si basano sul principio che le biomolecole legate su una superficie conduttiva stampata agiscono come isolanti; i secondi invece misurano la conducibilità elettrolitica per monitorare l'andamento delle reazioni chimiche ioniche.

I trasduttori conduttometrici misurano infatti la variazione della forza ionica della soluzione, che cambia il flusso di corrente o la conduttività elettrica. Pur avendo vantaggi come l'applicazione a film sottili a basso prezzo, il monitoraggio diretto in tempo reale, l'assenza di dover usare elettrodi di riferimento e la possibilità di miniaturizzazione, questa tecnica ha una sensibilità ridotta in confronto agli altri metodi elettrochimici. Infine, la capacità a doppio strato di analiti non target può portare ad errori, non è presente la specificità intrinseca e la modellazione matematica è necessaria per estrarre informazioni. [29]

Han-Byeol Lee et. al. ha progettato una piattaforma indossabile composta da un biosensore impedimetrico deformabile e un dispositivo estensibile per il rilevamento del cortisolo nel sudore. Il biosensore così progettato utilizza tre elettrodi, di cui l'elettrodo di lavoro in oro nanostrutturato tridimensionale per il miglioramento del segnale, e compie una lettura del segnale faradaico con un mediatore redox. Il biosensore ha dimostrato una buona stabilità meccanica e un ingombro minimo, il che lo rende adatto per un dispositivo indossabile. [38]

Ashlesha Bhide et. al., per ottenere il rilevamento simultaneo di glucosio e alcol nel sudore, ha creato un biosensore utilizzando elettrodi flessibili nanoporosi a film sottile di ossido di zinco e funzionalizzati con gli enzimi alcol-ossidasi e glucosio-ossidasi. Il rilevamento di questi due analiti, mediante la spettroscopia di impedenza elettrochimica, era funzionale anche con bassi volumi di sudore, dell'ordine di 1–3 μL . [39]

5.3 Potenzimetrici

I biosensori potenziometrici misurano il cambiamento di potenziale, indicativo della concentrazione di ioni target, sull'elettrodo di lavoro rispetto all'elettrodo di riferimento, senza la necessità di un generatore o di un dispositivo di misurazione della corrente. La differenza di potenziale elettrico, o forza elettromotrice (EMF), viene misurata in condizioni di corrente zero. La tensione attraverso i due elettrodi viene misurata con un dispositivo ad alta impedenza di ingresso, in modo da ridurre al minimo il contributo della caduta di potenziale ohmico alla differenza di potenziale totale. Il potenziale sul WE dipende unicamente dalla concentrazione dell'analita target grazie ad un accumulo di ioni, mentre il RE serve a fornire un potenziale definito di riferimento.

Questo tipo di biosensori è facilmente miniaturizzabile e integrabile nei dispositivi stampati perché richiedono una strumentazione di misura semplice e a basso costo. Tramite il semplice circuito di condizionamento, viene mostrata una risposta rapida, facilità d'uso e robustezza. È quindi possibile il monitoraggio in tempo reale con invasività limitata e in assenza di un flusso di corrente.

La potenziometria risulta ideale per specie con uno stato di carica fisso ed è buona nell'intervallo dei mM per quanto riguarda le concentrazioni.

Rimane un importante svantaggio la non specificità intrinseca ed è necessario sviluppare uno strato di membrana selettivo per indirizzare ioni specifici.

Inoltre, è applicabile solo per il rilevamento di specie cariche ed è suscettibile alle variazioni di temperatura e all'interferenza di altre specie cariche (che portano a falsi positivi) per ioni meno concentrati. Per questi motivi sono necessarie frequenti ricalibrizioni.

Tuttavia, grazie ai progressi nei biosensori potenziometrici stampati, ci sono stati miglioramenti nei limiti di rilevamento che hanno raggiunto i 10^{-8} M e si presentano opportunità nel realizzare sensori su substrati degradabili o biologici, quindi impiantabili direttamente sulla pelle.

I sensori ionici potenziometrici indossabili (WPIS, wearable potentiometric ion sensors) si sono sviluppati di molto negli ultimi anni. Sia in ambito sanitario che nel monitoraggio delle prestazioni sportive, i WPIS sono adatti ad essere integrati in dispositivi indossabili. Ad oggi, gli esempi di WPIS per la valutazione di ioni e pH sono, nella maggior parte dei casi, basati sul monitoraggio del sudore.

Infatti, i livelli ionici nel sudore umano soddisfano i requisiti comuni di sensibilità e gamma lineare dei sensori potenziometrici. Inoltre, fasce antisudore, cerotti epidermici e piattaforme

indossabili in tessuto con la corrispondente integrazione della cella di campionamento sono le configurazioni più utilizzate per i test sul corpo con i WPIS.

Tuttavia, ci sono ancora difficoltà che impediscono l'implementazione di questi dispositivi: la frequenza di ricalibrazione, la resilienza del dispositivo indossabile, l'incorporazione di una cella di campionamento adeguata e il rilevamento multi-ione sono questioni non risolte del tutto. [40]

6. TRASDUTTORI OTTICI

I biosensori ottici (OB, optical biosensors) sono uno strumento molto comune di rilevamento e analisi di biomolecole sulle superfici.

Nel processo di misurazione i fotoni interagiscono con l'analita modificando le proprietà e la luce incidente iniziale. Un fotorilevatore, che funge da trasduttore, converte i cambiamenti in un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione di analita misurata. Quando la luce passa attraverso l'analita, è influenzata dall'assorbimento, trasmissione, emissione, dispersione elastica o anelastica dall'analita.

solitamente i dispositivi emettitori di luce possono essere LED e diodi laser, mentre quelli di ricezione comprendono fotorilevatori e celle solari.

I materiali luminescenti, come le molecole fluorescenti e fosforescenti, possono assorbire la radiazione elettromagnetica e riemetterla sotto forma di luce visibile.

Nei fenomeni di scattering la luce cambia attraverso l'oggetto. Nello scattering elastico, chiamato anche scattering di Rayleigh per particelle <5 nm e scattering di Mie per particelle >5 nm, la luce modifica la sua traiettoria, ma l'energia e la lunghezza d'onda della luce incidente non cambia e l'elettrone, dallo stato eccitato, ritorna al suo livello di energia iniziale. Invece nello scattering anelastico, o scattering Raman, se l'energia e la lunghezza d'onda della luce incidente cambiano e l'elettrone, dallo stato eccitato, torna a un livello di energia superiore o inferiore.

Pertanto, il rilevamento ottico può basarsi sulla misurazione della luminescenza, della fluorescenza, dei cambiamenti di colore, dell'assorbanza, della riflettanza o delle emissioni di fluorescenza che si verificano nelle regioni spettrali dell'ultravioletto (UV), del visibile o del vicino infrarosso (NIR). [22] [41]

Gli OB sono vantaggiosi in quanto hanno un'elevata specificità (quindi una bassa quantità di falsi positivi), un ingombro ridotto e un basso costo di produzione. Un altro aspetto da considerare è che la quantità di analita richiesta dal dispositivo può essere piccola pur ottenendo una risposta accurata; questo risulta essere molto utile quando l'analita è presente a basse concentrazioni.

I biosensori ottici, in maniera simile agli altri biosensori, sfruttano elementi di bioriconoscimento come enzimi, anticorpi e proteine. Il trasduttore di tipo ottico può comprendere SPR (surface plasmon resonance), interferometri e rifrattometri.

Le componenti principali sono la sorgente luminosa, il mezzo di trasmissione ottico (come una fibra o una guida d'onda) e l'elemento di riconoscimento biologico immobilizzato e il sistema di rilevamento ottico. [42]

Tutti i metodi in questione hanno in comune l'utilizzo di deboli radiazioni inattiniche (ossia luce che non incide sul materiale fotosensibile) per il rilevamento e quindi non sono per nulla distruttivi.

I biosensori ottici hanno tra i loro vantaggi i buoni rapporti segnale/rumore, con conseguente aumento della precisione e possono essere utilizzati per eseguire misurazioni rapide in tempo reale e in situ. Altri aspetti positivi offerti sono la selettività, l'isolamento dalle interferenze elettromagnetiche, il possibile rilevamento multiparametrico, il design compatto e minimamente invasivo per le misurazioni in vivo, e le dettagliate informazioni chimiche sugli analiti.

Vista la diversità di indicatori chimici reattivi a livello ottico, l'elevata sensibilità di rilevamento in modalità come la fluorescenza, l'uso non necessario di elettrodi di riferimento e la facilità di miniaturizzazione, i biosensori ottici si prestano bene all'integrazione nei dispositivi indossabili. Inoltre, in un sistema ottico indossabile, il segnale di uscita può essere letto anche ad occhio nudo o da una telecamera. [41]

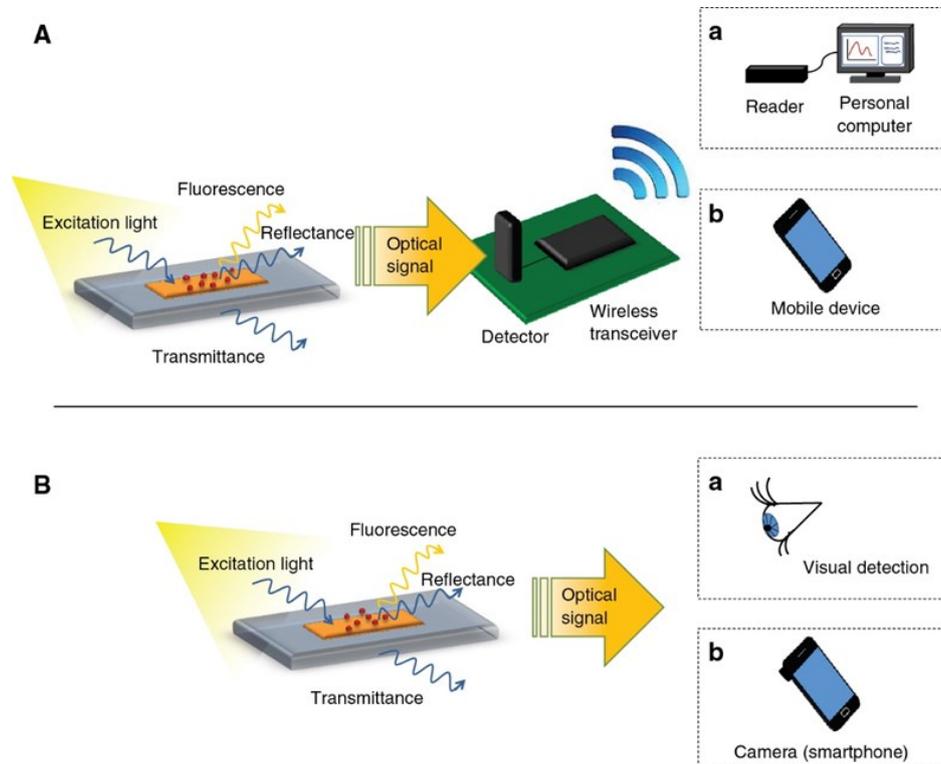


Figura 10 funzionamento di un sensore biochimico ottico wireless. [43]

Tuttavia, per fare una distinzione generale, si possono suddividere in label-free, in cui il segnale rilevato viene direttamente generato dall'interazione tra analita e trasduttore e non è necessaria un'etichetta, e label based. Questi ultimi permettono di ottenere un segnale ottico sfruttando particolari biomolecole marcate che vengono immobilizzate ed emettono una risposta fluorescente in seguito alla reazione con l'analita. I metodi possono essere colorimetrici, di fluorescenza o di luminescenza.

I biosensori label-free sono ideali per le molecole che sono complicate da etichettare o che non ne hanno ancora una identificata. Inoltre, hanno tempi di analisi ridotti, un basso consumo di solventi organici, ridotte dimensioni e costi, alta sensibilità e possono quantificare le molecole in tempo reale.

In questa categoria sono presenti i biosensori basati sulla risonanza plasmonica di superficie (SPR). In questi biosensori la misurazione avviene mediante stimolazione diretta della luce incidente di molecole a basso peso molecolare che è polarizzata a un certo angolo, noto come angolo di risonanza. L'interazione della luce con il campione genera plasmoni di superficie sulla superficie di un materiale conduttore inserito tra due mezzi, come vetro e liquido.

Il trasduttore è in grado di riconoscere un cambiamento nella lunghezza d'onda e nell'angolo di risonanza quando vengono generati i plasmoni; tale cambiamento risulta essere proporzionale alla massa dell'analita sulla superficie e quindi alla sua concentrazione in soluzione.

I biosensori SPR permettono infatti di rilevare, monitorare e quantificare i biomarcatori, rilevare le interazioni molecolari e le interazioni di legame dipendenti dal tempo. Tuttavia, rimangono ancora delle sfide legate alla loro sensibilità, specificità e riproducibilità.

La spettroscopia Raman con superficie migliorata (SERS) invece consente l'imaging e il rilevamento ultrasensibile per rilevare lo scattering Raman (anelastico). Essendo lo spettro Raman caratteristico di ogni molecola, consente un'analisi qualitativa e quantitativa di un campione misto. [42]

Passando ai metodi label-based, un esempio rilevante è la colorimetria, fondata sulla relazione tra concentrazione dell'analita e intensità del colore risultante dalle interazioni. Tale intensità cambia sul sensore in base all'assorbimento della luce dato dalla reazione chimica. Questo metodo è molto semplice, non richiede circuiti e la visualizzazione dei risultati può anche effettuarsi ad occhio nudo, ma generalmente i sensori colorimetrici sono monouso e hanno basse sensibilità se confrontati con altri sensori.

In generale, nei biosensori label-based, i fluorofori e le molecole fosforescenti sono tra le etichette più utilizzate; invece, le etichette fosforescenti continuano a rilasciare fotoni dopo che la sorgente di luce incidente si è interrotta, mentre i fluorofori hanno bisogno di una fonte di energia costante per brillare.

La fluorescenza, comunemente usata nella trasduzione del segnale, si verifica quando un elettrone assorbe un fotone da una sorgente di energia luminosa e passa a uno stato elettronico superiore; l'energia viene quindi emessa sotto forma di fotone quando l'elettrone ritorna allo stato iniziale generando così luce che può essere misurata esternamente. Tipicamente, le energie di eccitazione sono nello spettro UV o visibile mentre le energie di emissione vanno dalla luce visibile al vicino infrarosso.

I biosensori basati sulla fluorescenza possono identificare gli analiti in base alla variazione della lunghezza d'onda o dell'intensità della fluorescenza. Poiché la fluorescenza ha elevate omogeneità e sensibilità intrinseche, la ricerca sperimentale si è molto concentrata sull'emissione di fluorescenza di singole molecole anche a concentrazioni molto basse.

I biosensori basati sulla fluorescenza incorporati con molecole di fluorocromo vengono utilizzati per produrre luce durante l'evento di bioriconoscimento. Poiché la maggior parte degli elementi di rilevamento biologico e la maggior parte degli analiti non possiedono proprietà spettrali intrinseche, l'evento di bioriconoscimento viene trasdotto in segnale ottico accoppiando reagenti di fluorescenza otticamente sensibili agli elementi di rilevamento.

I biosensori fluorescenti possono anche essere ottenuti immobilizzando intere cellule sulla superficie di uno strato di sensori. Questo strato bioattivo viene solitamente posizionato davanti alla punta di un fascio di fibre ottiche per generare un segnale fluorescente. Le fibre ottiche sono necessarie per inviare la radiazione di eccitazione al bioelemento fluorescente e convogliare la radiazione di fluorescenza fino a un fluorimetro. [41]

Infine, la luminescenza si basa sull'emissione di luce da un composto eccitato elettronicamente che ritorna allo stato fondamentale da parte di batteri vitali in risposta a un qualsiasi cambiamento chimico, biologico o fisico dell'analita. Nel caso in cui questo avviene nel corso di reazioni chimiche si parla di chemiluminescenza.

La bioluminescenza è un caso particolare di chemiluminescenza che avviene in alcuni organismi viventi e coinvolge una proteina, per esempio un enzima. Le misurazioni di tale fenomeno consistono nel monitorare la velocità di produzione dei fotoni nella reazione luminescente, un parametro correlato all'intensità della luce.

Nel progettare questi biosensori a luminescenza dei trasduttori convenienti possono essere le fibre ottiche associate a un rivelatore di luce. La reazione biochimica tra l'analita e la biomolecola immobilizzata e contrassegnata con specie di chemiluminescenza avrà come risultato una luce emessa che può essere rilevata utilizzando un tubo fotomoltiplicatore (PMT). La chemiluminescenza è uno strumento ancora emergente in diagnostica ma presenta una sensibilità elevata, proprietà di risposta dinamica rapida e un ampio range di calibrazione. Tuttavia, la trasduzione presenta inconvenienti come i costi elevati e una minore accuratezza quantitativa a causa della breve durata che rende questi sensori non adatti per il monitoraggio in tempo reale. [22]

Sebbene in letteratura sia presente una quantità significativa di sensori indossabili di tipo elettrochimico, il rilevamento ottico è meno popolare. Il motivo principale potrebbe essere la necessità della sorgente luminosa e del rivelatore, che sono componenti rigidi e difficili da implementare in un sistema indossabile. [43]

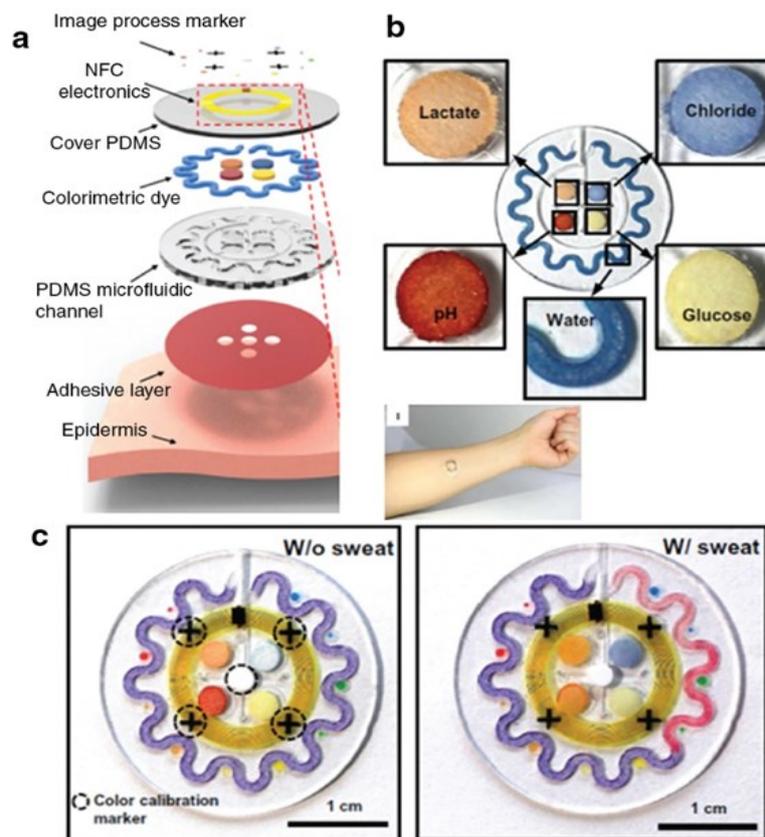


Figura 11 Schematizzazione di un dispositivo di monitoraggio del sudore microfluidico basato su colorimetria. [43]

Un esempio è dato da Koh et al. (2016) che ha sviluppato un biosensore morbido, flessibile ed estensibile per il rilevamento simultaneo di quattro analiti nel sudore: pH, cloruro, lattato e glucosio, ma anche volume e velocità del sudore. Questa piattaforma microfluidica è composta da tre parti: uno strato adesivo con aperture per la cattura del sudore, un sistema di microcanali e serbatoi con reagenti per analisi colorimetriche su carta e l'elettronica che include un'antenna ad anello magnetico per NFC (near-field communication) wireless. Il sudore viene catturato mediante l'azione capillare e la pressione naturale si sposta verso le regioni per l'analisi. Infine, La fotocamera dello smartphone acquisisce un'immagine digitale. Le prove sul corpo umano hanno dimostrato un'elevata biocompatibilità senza fastidi o irritazioni della pelle. [44]

7. ANALISI DI UN ESEMPIO DI DEVICE INTEGRATO

Attualmente molti biosensori non invasivi basati sul sudore monitorano un solo analita per volta e/o non effettuano in loco l'elaborazione del segnale e la calibrazione del sensore stesso.

A tale scopo, Gao et. al. Ha progettato un sistema indossabile che consente il monitoraggio simultaneo e multiplex dei biomarcatori target presenti nel sudore in tempo reale. [37]

7.1 Caratteristiche e Vantaggi del Dispositivo

Il dispositivo consiste in un array indossabile di sensori completamente integrato e meccanicamente flessibile in cui vengono effettuate misurazioni selettive e simultanee di metaboliti, come glucosio e lattato, ma anche di elettroliti come ioni sodio e potassio.

Il vantaggio principale di questo progetto consiste nell'aver colmato il divario tecnologico nei biosensori tradizionali tra trasduzione del segnale, condizionamento (che comprende amplificazione e filtraggio), elaborazione e trasmissione wireless. Tutto questo è stato reso possibile unendo le tecnologie a circuito integrato, disponibili in commercio e consolidate su un circuito stampato, con quelle dei sensori flessibili fabbricate su substrati di plastica.

Pertanto, disaccoppiando elettricamente le interfacce di ogni sensore si è mantenuto il funzionamento selettivo e indipendente dei singoli sensori.

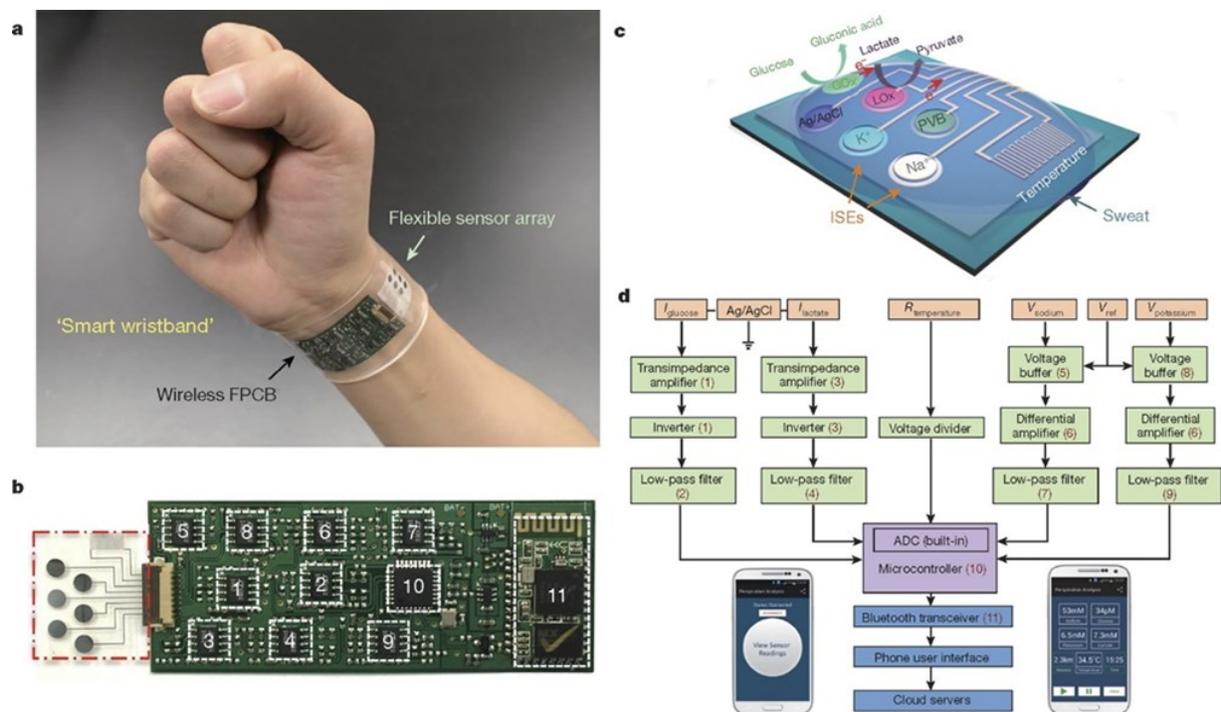


Figura 12 Array di sensori indossabili completamente integrati per analisi multiplex del sudore [37]

In figura 12 è illustrato il dispositivo indossato al polso. Il componente di rilevamento utilizza l'array di sensori attaccati ad un substrato di polietilene tereftalato (PET) flessibile per il contatto con la pelle. Mediante un pozzetto polimerico morbido che circonda gli elettrodi di rilevamento è stata creata una camera per il riempimento del sudore riducendo al minimo l'evaporazione e per proteggere gli elettrodi da abrasione per contatto diretto con la pelle. Il circuito stampato (PCB, Printed Circuit Board) traduce i segnali grezzi in concentrazioni significative e li trasmette all'applicazione telefonica.

Sempre in figura, il diagramma a blocchi mostra le fasi di trasduzione del segnale dove V, I, R sono rispettivamente potenziale, corrente e resistenza), il condizionamento, l'elaborazione e infine la trasmissione wireless.

Per il glucosio e il lattato sono stati scelti sensori amperometrici basati sugli enzimi glucosio ossidasi e lattato ossidasi immobilizzati all'interno di un film permeabile del polisaccaride lineare chitosano. L'elettrodo di riferimento in Ag/AgCl è condiviso e funge anche da contro elettrodo per semplificare la progettazione del circuito e facilitare l'integrazione del sistema.

Inoltre, si è osservata una relazione lineare tra correnti e concentrazioni con sensibilità di $2,35 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ e $220 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1}$ per i sensori di glucosio e lattato rispettivamente.

Per gli ioni sodio e potassio invece sono stati usati sensori potenziometrici con elettrodi ionoselettivi. Infine, un sensore basato sulla resistenza in microfilari metallici in Cr/Au per la misurazione della temperatura.

Un dato incoraggiante riguarda la selettività del dispositivo a ciascun analita; infatti, i biomarcatori non target davano interferenze trascurabili ad ogni sensore. Il dispositivo permette quindi di misurare l'output di più sensori selettivi e di elaborare il segnale per una maggiore accuratezza.

Il funzionamento è garantito anche in condizioni di attività fisica all'aperto e il dispositivo può essere comodamente indossato su varie parti del corpo, tra cui fronte, polsi e braccia ed è alimentato da una singola batteria ricaricabile; pertanto, può essere utilizzato in applicazioni che comprendono sia la diagnostica sia la valutazione dello stato fisiologico.

7.2 Microfluidica

Un sottile tampone di rayon è stato posizionato tra la pelle e l'array di sensori per mantenere una quantità sufficiente di sudore per letture stabili e affidabili e per prevenire il contatto diretto tra i sensori e la pelle; la quantità assorbita è di circa 10 μ l. Il sudore in entrata riempiva il tampone e "risciacquava" il vecchio sudore.

Per garantire ulteriormente la fedeltà delle letture del sensore, la raccolta dei dati di ciascun canale è avvenuta solo quando era presente un sufficiente volume sudore.

7.3 Elettronica di condizionamento e trasmissione

Il percorso di condizionamento per ciascun sensore è in relazione alla rispettiva modalità di rilevamento. Nel caso dei sensori di glucosio e lattato, il segnale originariamente era una corrente elettrica. Per convertirlo in una tensione è stato utilizzato un amplificatore a transimpedenza.

Nelle misurazioni di corrente, la direzione era verso l'elettrodo di lavoro, quindi è necessario uno stadio invertitore per rendere positive le tensioni. Infine, ogni percorso di condizionamento del segnale analogico terminava con un filtro passa basso a quattro poli a guadagno unitario, ciascuno con una frequenza di -3 dB a 1 Hz per ridurre al minimo rumore e interferenza. I filtri passa basso sono stati poi collegati al convertitore analogico-digitale a 10 bit integrato nel microcontrollore.

Le capacità di comunicazione del microcontrollore sono servite per calibrare, compensare e trasmettere i segnali condizionati a un ricetrasmittitore wireless integrato che invia i dati via Bluetooth ad un telefono cellulare.

7.4 Metodi di calibrazione

La calibrazione degli array di sensori è stata eseguita prima delle misurazioni ex situ utilizzando sudore artificiale, ma sono state necessarie anche le misurazioni della temperatura cutanea per compensare ed eliminare l'influenza della variazione di temperatura nelle letture.

Sebbene la temperatura abbia un effetto minimo sui sensori potenziometrici per gli ioni sodio e potassio, influenza molto le prestazioni dei sensori enzimatici.

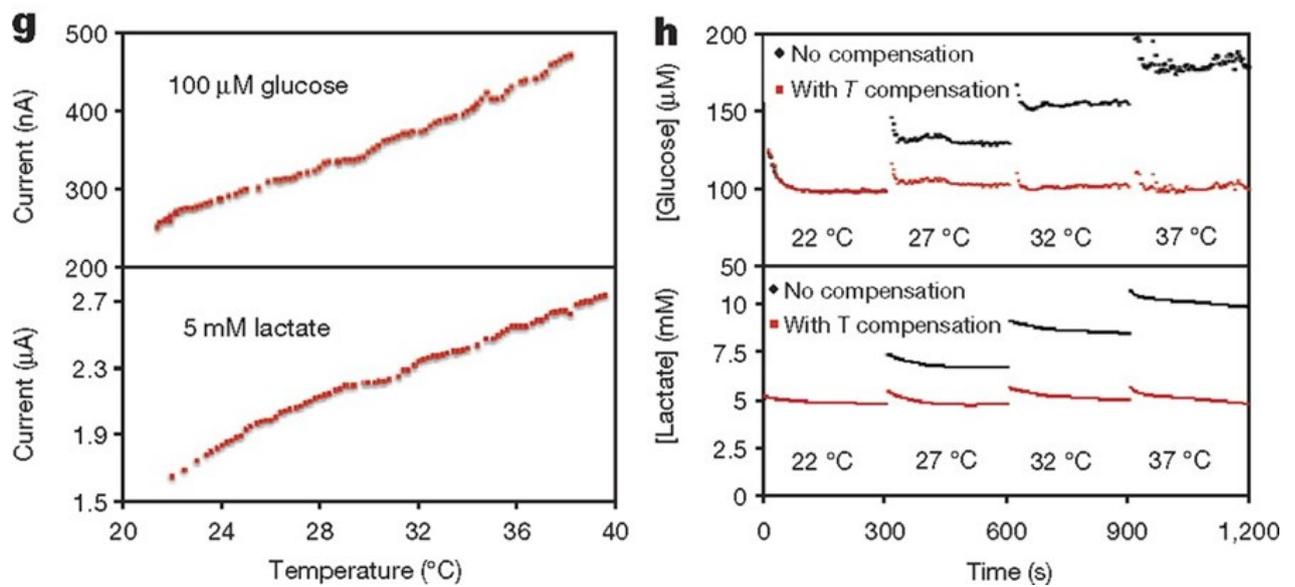


Figura 13 Effetto della temperatura e compensazione in tempo reale [37]

Nella prima figura è mostrato che le risposte dei sensori di glucosio e lattato aumentano rapidamente all'aumentare della temperatura della soluzione; questo è dovuto ad un aumento delle attività enzimatiche.

La seconda figura illustra che con l'aumento della temperatura, le letture non compensate possono portare a una sovrastima delle concentrazioni effettive di glucosio e lattato; tuttavia, la compensazione della temperatura in tempo reale consente di calibrare il sensore per ottenere letture accurate e coerenti. [37]

8. CONCLUSIONI

Il monitoraggio di metaboliti come glucosio e lattato è di grande importanza nel mantenere sotto controllo la salute sia in ambito diagnostico e clinico, sia potenzialmente nella quotidianità e nello sport. Il sudore rappresenta un biofluido di facile raccolta con tecniche non invasive, a differenza del prelievo di sangue nei metodi tradizionali, ma bisogna tenere conto delle minori concentrazioni di analiti che impongono una maggiore sensibilità e accuratezza e delle correlazioni con i valori ematici.

Attualmente i dispositivi indossabili per l'analisi del sudore sono in grande espansione e necessitano di ulteriori miglioramenti. Nonostante le innovazioni in termini di raccolta del sudore, di rilevamento, di trasduzione e di elaborazione di un segnale rappresentativo delle concentrazioni di analiti chimici, una sfida attuale consiste nel contenere tutti questi elementi in un unico dispositivo, pur mantenendo i requisiti di indossabilità che riguardano le dimensioni ridotte e la flessibilità. La scelta di biorecettori enzimatici o non enzimatici e della tecnica trasduzione che separa i biosensori in ottici ed elettrochimici è fondamentale nella specificità del biosensore e si traduce in cambiamenti anche drastici nelle caratteristiche progettuali dell'intero dispositivo. A tale scopo novità come gli elettrodi miniaturizzati e le tecniche di serigrafia sono molto interessanti.

I dispositivi portati sulla cute dovranno incorporare circuiti morbidi e flessibili e fonti di alimentazione per affrontare le forze meccaniche dovute al movimento e per adattarsi alla pelle del soggetto monitorato. Sono quindi necessarie ulteriori ricerche per la scelta dei materiali da utilizzare e per i metodi di fabbricazione di questi dispositivi, che devono pur sempre mantenere costi contenuti per la commercializzazione su larga scala e rimanere comodi nell'essere indossati.

Pertanto, questo settore è ancora in una fase di sviluppo se si pensa alla parziale sostituzione delle tecnologie cliniche attuali, ma l'enorme interesse per i dispositivi interfacciati alla pelle permetteranno alle ricerche future nel raggiungimento della progettazione di strumenti indossabili comodamente, a basso costo che permettono delle analisi complete e precise dello stato di salute in tempo reale con un impatto critico sulla vita quotidiana delle persone. [3]

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bariya, M., Nyein, H.Y.Y. & Javey, A. “Wearable sweat sensors”. *Nat Electron* 1, 160–171 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41928-018-0043-y>
- [2] Heikenfeld, J., Jajack, A., Feldman, B. *et al.* “Accessing analytes in biofluids for peripheral biochemical” monitoring. *Nat Biotechnol* 37, 407–419 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0040-3>
- [3] Laicong Qiao, Mercy Rose Benzigar, J. Anand Subramony, Nigel H. Lovell, and Guozhen Liu. “Advances in Sweat Wearables: Sample Extraction, Real-Time Biosensing, and Flexible Platforms” (2020). DOI: 10.1021/acsami.0c07614
- [4] Royal Society of Chemistry. “Metabolic process” (2022). [Online]. Available : <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=GO:0008152&MSID=b904571f>
- [5] Mamas, M., Dunn, W.B., Neyses, L. *et al.* The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 85, 5–17 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- [6] Wikipedia, “Glucose”, From Wikipedia, the free encyclopedia
- [7] Robert A. Robergs, Farzenah Ghasvand, and Daryl Parker. “Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis” 2004. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00114.2004>
- [8] World Health Organization. “Mean fasting blood glucose” 2022. [Online]. Available : <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/2380>
- [9] Stephen L. Aronoff, Kathy Berkowitz, Barb Shreiner, Laura Want; “Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon”. *Diabetes Spectr* 1 July 2004; 17 (3): 183–190. <https://doi.org/10.2337/diaspect.17.3.183>
- [10] Tai, N., Wong, F.S. & Wen, L. “The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity”. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 55–65 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11154-015-9309-0>
- [11] Goodwin ML, Harris JE, Hernández A, Gladden LB. “Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians”. *J Diabetes Sci Technol*. 2007 Jul;1(4):558-69. doi: 10.1177/193229680700100414. PMID: 19885119; PMCID: PMC2769631.
- [12] Kavita Rathee, Vikas Dhull, Rekha Dhull, Sandeep Singh, “Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review”. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>

- [13] Goodwin ML, Harris JE, Hernández A, Gladden LB. “Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise”: A Guide for Clinicians. *Journal of Marketing*. 2007;1(4):17-28. doi:[10.1177/002224297604000304](https://doi.org/10.1177/002224297604000304)
- [14] David D. Cunningham, Julie A. Stenken. “In Vivo Glucose Sensing”. John Wiley & Sons, 19 nov 2009
- [15] Massimo Onor, Stefano Gufoni, Tommaso Lomonaco, Silvia Ghimenti, Pietro Salvo, Fiodor Sorrentino, Emilia Bramanti, "Potentiometric sensor for non invasive lactate determination in human sweat", 2017, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.050>.
- [16] Chiara Fabris, Boris Kovatchev. Imprint: Academic Press. “Glucose Monitoring Devices: Measuring Blood Glucose to Manage and Control Diabetes”. 2020. eBook ISBN: 9780128168844
- [17] Hirsch IB. Introduction: “History of Glucose Monitoring”. 2018 Aug. In: Role of Continuous Glucose Monitoring in Diabetes Treatment. Arlington (VA): American Diabetes Association; 2018 Aug. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538968/> doi: 10.2337/db20181-1
- [18] Alicia M. Thomas Diaz, MD. “Continuous Glucose Monitoring”. 2017. [Online]. Available: <https://web.archive.org/web/20171222052236/https://www.hormone.org/diseases-and-conditions/diabetes/diabetes-management/continuous-glucose-monitoring>
- [19] John R. Petrie, Anne L. Peters, Richard M. Bergenstal, Reinhard W. Holl, G. Alexander Fleming, Lutz Heinemann; “Improving the Clinical Value and Utility of CGM Systems: Issues and Recommendations”. 2017; <https://doi.org/10.2337/dci17-0043>.
- [20] McGehee, James & Tanner, Charles & Houmard, Joseph. (2005). “A Comparison of Methods for Estimating the Lactate Threshold”. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 19. 553-8. 10.1519/15444.1.
- [21] Bhide A, Ganguly A, Parupudi T, Ramasamy M, Muthukumar S, Prasad S. “Next-Generation Continuous Metabolite Sensing toward Emerging Sensor Needs”. *ACS Omega*. 2021. doi: 10.1021/acsomega.0c06209
- [22] Benjamin, Robson, Bhargava, Kalpana, Karunakaran, Chandran. Elsevier. “Biosensors and Bioelectronics”. 2015. pag 3-4. ISBN 978-0-12-803100-1
- [23] “Biosensori: nuove tecnologie per la sicurezza alimentare”, in <https://www.foodhubmagazine.com/2020/12/11/biosensori-sicurezza-alimentare/>, 2020

- [24] C.T.S. Ching, P. Connolly, "Reverse iontophoresis: A non-invasive technique for measuring blood lactate level", *Sensors and Actuators B*, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.08.031>.
- [25] Kim, J., Campbell, A.S., de Ávila, B.EF. et al. "Wearable biosensors for healthcare monitoring". *Nat Biotechnol* 37, 389–406 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0045-y>.
- [26] C. Revathi, R.T. Rajendra kumar, "Enzymatic and Nonenzymatic Electrochemical Biosensors", 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102577-2.00007-5> .
- [27] Niina J. Ronkainen, H. Brian Halsall b and William R. Heineman. 2010, "Electrochemical biosensors" DOI: 10.1039/B714449K
- [28] Aiguo Wu, Waheed S. Khan. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA "Nanobiosensors: From Design to Applications". 2020 DOI:10.1002/9783527345137
- [29] Karolina Dziąbowska, Elżbieta Czaczyk and Dawid Nidzworski "Application of Electrochemical Methods in Biosensing Technologies". 2017. DOI: 10.5772/intechopen.72175
- [30] Sardini, E.; Serpelloni, M.; Tonello, S. "Printed Electrochemical Biosensors: Opportunities and Metrological Challenges. *Biosensors*" 2020, 10, 166. <https://doi.org/10.3390/bios10110166>.
- [31] Damiaty, Samar & Schuster, Bernhard. (2020). "Electrochemical Biosensors Based on S-Layer Proteins". *Sensors*. 20. 1721. 10.3390/s20061721.
- [32] Joshua Ray Windmiller, Joseph Wang, "Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review", 2012, <https://doi.org/10.1002/elan.201200349>
- [33] A.M.Vinu Mohan, Vinoth Rajendran, Rupesh K. Mishra, Mathiyarasu Jayaraman, "Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors", 2020, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116024>
- [34] Amay J. Bandodkar, Joseph Wang, "Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review", 2014, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.04.005>
- [35] Juan ZHOU, Dong MEN, Xian-En ZHANG, "Progress in wearable sweat sensors and their applications", 2022, <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2021.11.004>
- [36] Jayoung Kim, Gabriela Valdés-Ramírez, Amay J. Bandodkar, Wenzhao Jia, Alexandra G. Martinez, Julian Ramírez, Patrick Mercierb and Joseph Wang. "Non-invasive mouthguard biosensor for continuous salivary monitoring of metabolites". 2014. DOI <https://doi.org/10.1039/C3AN02359A>

- [37] Gao, W., Emaminejad, S., Nyein, H. et al. “Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis”. *Nature* 529, 509–514 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature16521>
- [38] Han-Byeol Lee, Montri Meesepong, Tran Quang Trung, Bo-Yeong Kim, Nae-Eung Lee, “A wearable lab-on-a-patch platform with stretchable nanostructured biosensor for non-invasive immunodetection of biomarker in sweat”, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112133>
- [39] Bhide, A., Muthukumar, S., Saini, A. et al. Simultaneous lancet-free monitoring of alcohol and glucose from low-volumes of perspired human sweat. *Sci Rep* 8, 6507 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24543-4>
- [40] Marc Parrilla, Maria Cuartero, Gaston A. Crespo, “Wearable potentiometric ion sensors”, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.024>
- [41] Ramsden, J.J. (1997), “Optical biosensors”. *J. Mol. Recognit.*, 10: 109-120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199705/06\)10:3<109:AID-JMR361>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199705/06)10:3<109:AID-JMR361>3.0.CO;2-D)
- [42] Tatiana Duque Martins, Antonio Carlos Chaves Ribeiro, Henrique Santiago de Camargo, Paulo Alves da Costa Filho, Hannah Paula Mesquita Cavalcante and Diogo Lopes Dias. “New Insights on Optical Biosensors: Techniques, Construction and Application” 2013. DOI: 10.5772/52330
- [43] Kassal, Petar, Horak, Ema, Sigurnjak, Marija, Steinberg, Matthew D. and Steinberg, Ivana Murković. "Wireless and mobile optical chemical sensors and biosensors" *Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 37, no. 4, 2018, pp. 20170024. <https://doi.org/10.1515/revac-2017-0024>
- [44] AHYEON KOH, DAESHIK KANG, YEGUANG XUE, SEUNGMIN LEE, RAFAL M. PIELAK, JEONGHYUN KIM, TAEHWAN HWANG, SEUNGHWAN MIN, ANTHONY BANKS, [...], AND JOHN A. ROGERS “A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat”. 23 Nov 2016. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2593

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a coloro che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi di laurea.

Ringrazio la mia Professoressa e Relatrice Sarah Tonello, sempre gentile e disponibile nel darmi le giuste indicazioni in ogni fase.

Ringrazio i miei genitori e mio fratello che da sempre mi sostengono nelle mie scelte. Non finirò mai di ringraziarvi per avermi permesso di arrivare fin qui.

Ringrazio Carmine e Marina che sono stati per me un aiuto fondamentale nella stesura di questo elaborato.

Infine, un ringraziamento particolare va a Eleonora, la persona che è stata sempre presente a supportarmi e che mi ha dato la spinta giusta per andare avanti nei momenti di difficoltà.