UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

Metodi chimici per la rivelazione di marcatori biologici legati ad attività sportiva con point of care devices

Relatore: Prof. Camilla Ferrante

Laureando: Pietro Biasibetti

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE
    a. UTILIZZI PRINCIPALI PoCTD NELLO SPORT
    b. VANTAGGI DEI PoCTD
    c. CARATTERIZZAZIONE E CLASSIFICAZIONE DEI PoCTD

2. PROTOTIPO DI PoCTD BASATO SU MARCATORI BIOLOGICI LEGATI AD ATTIVITA' SPORTIVA
    a. µPAD PER LA RILEVAZIONE DI ADRENALINA E GLUCOSIO
        i. NANOPARTICELLE DI SOLFURO DI RAME DROGATE CON ARGENTO
        ii. ATTIVITA' SIMIL-LACCASICA E SIMIL-PEROSSIDASICA DELLE NANOPARTICELLE
        iii. PREPARAZIONE DEI µPAD
        iv. RILEVAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI CON METODO RGB
        v. UTILIZZO PRATICO DEI µPAD

3. CONCLUSIONI

4. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

Le piattaforme di test Point-of-Care Testing Devices (PoCTD) sono diventate fondamentali per l'analisi in loco in diverse aree come il monitoraggio ambientale, agricoltura, biodifesa, diagnostica medica e sportiva, ecc. [1]
Questi sono dispositivi analitici che consentono di ottenere risultati immediati a differenza di quelli eseguiti in laboratorio, che invece richiedono tempi più lunghi.
I PoCTD possono produrre sia risultati sì/no (ad esempio il test di gravidanza; Figura 1(d)) sia quantitativi (come i misuratori di glucosio nel sangue; Figura 1(g)).

a. UTILIZZI PRINCIPALI PoCTD NELLO SPORT

Possono essere molto utili anche in ambito sportivo poiché i marcatori relativi ai cambiamenti fisiologici e al metabolismo possono essere analizzati in loco per monitorare la salute, le prestazioni, il recupero di un atleta e persino per i controlli antidoping [2]. Di conseguenza sono potenzialmente in grado di aiutare gli allenatori a ottimizzare i regimi di allenamento per prevenire infortuni, monitorare l'alimentazione [3] e anche aiutare i comitati sportivi ad applicare efficaci misure di controllo antidoping durante e al di fuori delle competizioni.
Le piattaforme PoCTD possono fornire risultati rapidi anche in un contesto con risorse limitate e sono molto più facili da gestire rispetto ai test di laboratorio, riducendo così la necessità di personale qualificato per l'esecuzione dei test.

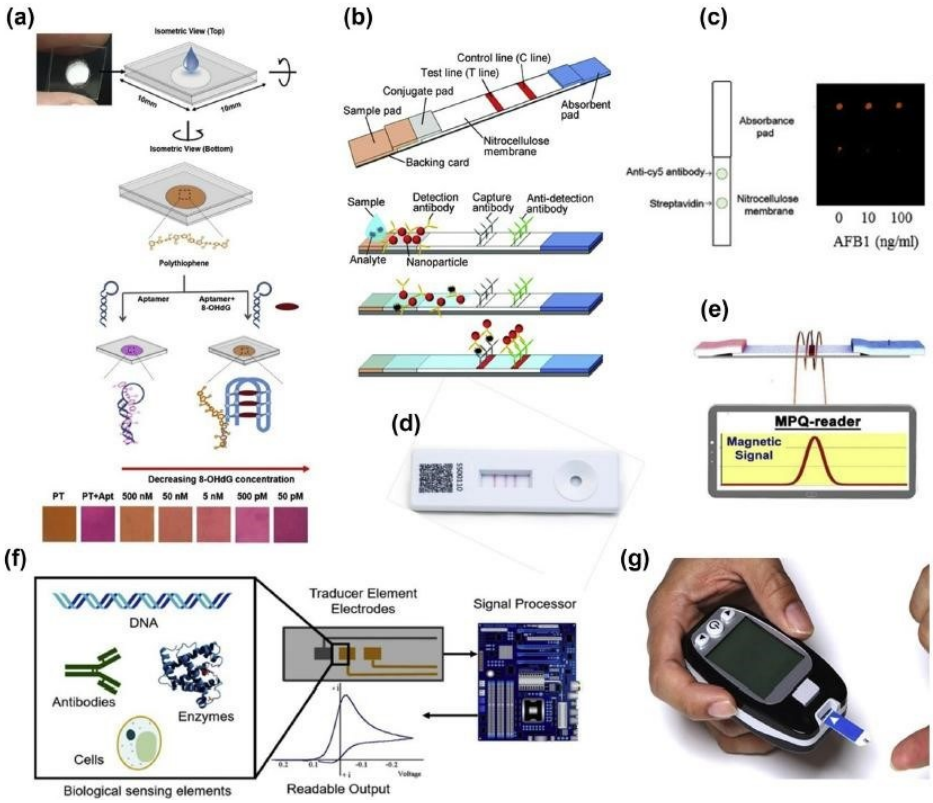

Figura 1. [1] (a) Illustrazione di un test colorimetrico senza etichetta per il rilevamento di biomarcatori dello stress ossidativo nelle urine: si utilizza una membrana di polivinilidenfluoruro (PVDF) impregnata di poli-(3-alcossi-4-metiltiofene). (b) Schema di un saggio colorimetrico a flusso laterale (LFA) che utilizza nanoparticelle come reporter. L'analita forma un complesso con nanoparticelle coniugate con anticorpi. Questi complessi vengono catturati a valle della linea di test, dove il loro accumulo produce un segnale colorato. (c) Schema e lettura di un LFA fluorescente che utilizza quantum dots di materiale semiconduttore come reporter. (d) Un test di gravidanza disponibile in commercio: uno dei test di gravidanza più comuni. (e) Lettura tipica in un LFA che rileva il campo magnetico generato da sfere magnetiche usate come reporter. (f) Schema di sensore elettrochimico: i sensori biologici sono accoppiati agli elettrodi per rilevare gli analiti, generano dei segnali elettrici leggibili in uscita. (g) Un PoCTD per la rilevazione del glucosio disponibile in commercio: esempio di sensore elettrochimico.

I biomarcatori sportivi sono sostanze che possono aiutare a rilevare i cambiamenti fisiologici in un atleta. Alcuni di questi sono stati identificati e stabiliti per determinare i livelli ottimali di fitness, valutare le prestazioni e il tasso di recupero.

Sono stati identificati anche dei biomarcatori per rilevare cambiamenti fisiologici nell'organismo dovuti a sostanze esogene e quindi per accertare il doping.

Sono necessari test frequenti di molti di questi biomarcatori per ottenere informazioni precise sulle condizioni di un atleta. Ad esempio, attualmente i test antidoping sono fatti in maniera casuale e rari, questo comporta che gli atleti che ne fanno uso potrebbero avere il tempo sufficiente per "mascherare" queste sostanze e/o tornare a livelli basali di alcuni componenti, ad esempio del sangue, in modo da non essere rilevati [4].

a. VANTAGGI PoCTD

I PoCTD sono semplici da usare, hanno tempi di risposta rapidi (da pochi secondi a pochi minuti) e un costo contenuto (da pochi centesimi a pochi dollari per test).
Comunque i PoCTD presentano vantaggi e svantaggi rispetto ai test di laboratorio convenzionali, riassunti in *Tabella 1*. [1]

Tabella 1
Paragone tra PoCTD e test di laboratorio convenzionali [1]

Parameters	POCT	Lab Tests
Sensitivity	●●	●●●
Instrumentation Requirement	●	●●●
Skill Requirement	●	●●●
Cost Effectiveness	●●●	●
Portability	●●●	●
Workflow/Assay Complexity	●	●●●
Turnaround Time	●	●●●
Reproducibility	●●	●●●
Throughput	●●	●●●

● basso, ●● moderato, ●●● alto. (Le caratteristiche desiderate sono evidenziate in giallo). Bisogna ricordare che le valutazioni scritte nella *Tabella 1* riflettono solo popolari PoCTD e alcune delle valutazioni comparative potrebbero cambiare a seconda dei test specifici.

La minore sensibilità, riproducibilità e resa sono punti di debolezza per questi dispositivi, ma i bassi costi, il fatto che siano dispositivi portatili e la possibilità di essere utilizzati da personale senza un particolare addestramento li rendono estremamente utili e importanti per analisi che richiedano controlli frequenti.

c. CARATTERIZZAZIONE E CLASSIFICAZIONE DEI PoCTD

L'OMS ha definito i parametri di una piattaforma PoCTD ideale nel 2003 riassumendoli nell'acronimo "ASSURED" [5]:

A: (Affordable) Conveniente – Basso costo
S: (Sensitive) Sensibile – Basso numero di falsi negativi
S: (Specific) Specifico – Basso numero di falsi positivi
U : (User friendly) Facile da usare – Non è richiesto personale qualificato **R**: (Rapid and Robust) Rapido e robusto: tempi di consegna brevi e facile gestione e stoccaggio
E: (Equipment free) Attrezzatura semplice - Non è richiesta una strumentazione complessa
D: (Delivered) Consegnato - Disponibile per gli utenti finali
In generale qualsiasi piattaforma PoCTD che rientra nei parametri ASSURED è da considerarsi una scelta ideale per la commercializzazione. Non è facile produrre PoCTD che soddisfino a tutti questi requisiti, per questo motivo esistono molti prototipi e solo pochi dispositivi hanno raggiunto al momento la commercializzazione.

Le piattaforme PoCTD possono essere classificate in base al meccanismo di rilevamento, in base al tipo di segnale emesso o in base alle loro applicazioni.
Ci sono due tipi di PoCTD: piccole piattaforme portatili e piattaforme più grandi [6]. Quelli portatili e piccoli sono più maneggevoli e hanno meccanismi di funzionamento molto più semplici, mentre i dispositivi più grandi hanno, in genere, uno sistema fluidico interno e sistemi di rilevamento degli analiti sofisticati e proprio per questo sono in genere più costosi rispetto ai primi.
I principali tipi di piattaforme PoCTD portatili, elencate in *Tabella 2*, sono classificate in base al loro meccanismo di trasduzione del segnale.

Tabella 2
POCT portatili comunemente utilizzati. [1]

Type of Signal	Analytical Principle	Reporter Used	Pros	Cons
Colorimetric	Immunosensing via biomolecule affinity	Au, Ag, Carbon, HRP etc.	Easy to read signals in field settings	Limited naked eye sensitivity for trace levels of biomarkers
	Electrochemically induced colour change of conducting polymers	Label Free		
Fluorometric	Immunosensing via biomolecule affinity	Eu beads, Quantum dots, etc.	High sensitivity, even for trace levels of biomarkers	Requires external instruments for signal readout
Magnetic Field	Immunosensing via biomolecule affinity	Magnetic beads	High sensitivity, Slow signal decay	Requires external instruments for signal readout
Electrochemical	Sensing via electrodes on substrates such as metals and semiconductors	Label Free	High sensitivity, Sensing within seconds, Easy to miniaturize	Expensive fabrication, requires instrumentation

I sensori colorimetrici forniscono segnali di colore più o meno intensi in base alla concentrazione di analita. Di solito distinguibili ad occhio nudo ma nei casi di basse concentrazioni sono richiesti lettori

di intensità. I sensori colorimetrici possono essere etichettati in base al "reporter", che genera il colore, di cui sono composti come nanoparticelle (oro, argento, ecc.), perle (lattice) ed enzimi (perossidasi di rafano o HRP). Possono essere anche non etichettati, quando il colore è generato dal meccanismo di rilevamento stesso. Ad esempio Ammanath et al., utilizzando polimeri conduttori (Figura 1(a)), hanno sviluppato una membrana di fluoruro di polivinilidene (PVDF) impregnata di poli-(3- alcossi-4-metiltiofene) per il rilevamento colorimetrico senza etichetta di biomarcatori dello stress ossidativo.

I test a flusso laterale (LFA) e astine di livello sono molto utilizzati nella scienza dello sport. Questi sensori sono strisce prefabbricate costituite da membrane di trasporto polimeriche (ad es. cellulosa) che sono modificate e assemblate per la cattura selettiva di molecole di analita in siti/zone specifici per il rilevamento (Figura 1(b)). Gli analiti, una volta che sono introdotti nel sensore, fluiscono in modo omogeneo per azione capillare. Gli analiti target vengono catturati nelle zone di test utilizzando molecole specificamente sintetizzate per il riconoscimento, come ad esempio anticorpi, che si legano selettivamente alle molecole di analiti di interesse.

I sensori fluorimetrici sono simili a quelli colorimetrici, infatti generano segnali ottici grazie all'uso di reporter di fluorescenza come nanoparticelle di europio, di materiale semiconduttore, o simili, legate alle molecole di biomarcatore (Figura 1(c)).

Tra i reporter più utilizzati ci sono le nanoparticelle magnetiche. Questo tipo di sensori sono in grado di generare campi magnetici nelle zone di test che successivamente vengono trasdotti utilizzando lettori magnetici (Figura 1(e)). Questi, rispetto ai lettori fluorimetrici, hanno il vantaggio di essere molto sensibili e il loro segnale rimane stabile per un periodo di tempo più lungo perché presentano un segnale con un lungo ciclo di decadimento.

Le piattaforme PoCTD colorimetriche, fluorimetriche o basate su campi magnetici però impiegano molto tempo per fornire un risultato (da 5 a 30 minuti).

La piattaforma con maggiore sensibilità e velocità di risposta per i PoCTD è quella dei sensori elettrochimici. Questi sono costituiti da elettrodi accoppiati a molecole di riconoscimento per il rilevamento sensibile degli analiti target (Figura 1(f)). Questi sensori, tramite trasduzione elettrica, generano segnali quando gli analiti si legano alle molecole di riconoscimento. I trasduttori sono substrati costituiti da elettrodi di metalli (oro, platino, ecc.), semiconduttori (ossido di indio-stagno, ossido di iridio, ecc.) o carbonio (grafite, pasta di carbonio, carbonio vetroso, ecc.). I sensori generano due tipi di segnali, in base al tipo di trasduttore utilizzato: variazione di corrente o variazione di potenziale. I trasduttori amperometrici applicano una tensione costante e rilevano la variazione di corrente al legarsi dell'analita. I trasduttori potenziometrici utilizzano elettrodi ionoselettivi (ISE) che producono una variazione di tensione al legarsi dell'analita. Il meccanismo cambia in base agli

elementi di riconoscimento utilizzati per il rilevamento, ad esempio enzimi attivi (glicolato ossidasi, glucosio ossidasi, ecc.), anticorpi, aptameri di acidi nucleici e compositi. Il vantaggio è che questi sensori sono molto sensibili, altamente specifici, facili da miniaturizzare e hanno un tempo di risposta molto rapido (danno un risultato entro pochi secondi dall'introduzione del campione sulla piattaforma). Lo svantaggio è che sono più complicati da fabbricare e quindi hanno un costo più elevato. I ricercatori stanno riuscendo a migliorare la sensibilità e la specificità dei metodi elencati in *Tabella 2* grazie a strategie avanzate di miglioramento del segnale ed incorporazione di un circuito microfluidico nel dispositivo.

2. PROTOTIPO DI PoCTD BASATO SUMARCATORI BIOLOGICI LEGATI AD ATTIVITA' SPORTIVA:

L'allenamento intenso degli atleti porta a diversi cambiamenti fisiologici. Il monitoraggio di questi cambiamenti fisiologici può essere fatto verificando i livelli dei diversi biomarcatori [3,7].
Per rilevare i biomarcatori sportivi di rilevanza fisiologica ci sono diversi metodi che sono riassunti in *Tabella 3*.

Tabella 3
Riassunto di piattaforme POCT per alcuni biomarcatori sportivi importanti. [1]

Target Marker	Type of Platform	Achieved LOD	Matrix
Performance Markers			
Cortisol	Electrochemical	0.1 ng/mL	Sweat and Saliva
	Antibody based LFA	0.5 ng/mL	Saliva
	Aptamer based LFA	1 ng/mL	Sweat
Testosterone	Immunoassay	20 pg/mL	Serum and Urine
	FastPack®	23 ng/dl	Serum and Plasma
GH	Electrochemical	25 pg/mL	Serum
sTr	Immunoassay	0.015 mg/L	Blood
	Antibody based LFA		Serum
Ferritin	Photonic Crystal based Optical Sensor	26 ng/mL	Serum
	Cotton thread based LFA	10 ng/mL	Buffer
Progesterone	Quantum dot based affinity assay	53 nM	Artificial Urine
Lactate	Paper based assay using affinity-binding enzymes	0.5 mM	Buffer
	Paper based assay using affinity-binding enzymes	0.1 mmol/L	Sweat
	Lactate Pro	0.5 mmol/L	Blood
	Lactate Scout+	0.5 mmol/L	
	Lactate Plus	0.3 mmol/L	
Injury, Inflammation and Recovery Markers			
S-100B	Immunoassay	0.25 ng/mL	Serum
	Electrochemical	0.1 pg/mL	Buffer
NfL	Electrochemical	3 pg/mL	Blood Plasma
Tau Protein	Electrochemical	0.03 pM	Blood
CRP	Antibody based LFA	0.3 ng/mL	Serum
	Antibody based LFA	0.69 ng/mL	Serum
IL-6	Antibody based LFA	0.9 pg/mL	Buffer
Nutrition Markers			
Glucose	Electrochemical		Blood
		0–200 μM	Sweat
		5 μmol/L	Saliva
		1 μM	Tears
Albumin	Antibody based LFA	2.5 mg/mL	Serum
Vitamin B12	Antibody based LFA	369 pmol/L	Blood

Per chi fa attività sportiva a livello agonistico è importante poter monitorare in maniera continua i livelli di biomarcatori che possono influenzare le prestazioni dell'atleta e possono portare a una diminuzione della capacità performativa come anche a possibili patologie acute che possono gravemente influenzare la salute dell'atleta. Queste analisi dirette e continue permettono di agire in maniera mirata sulla dieta e i periodi di attività/riposo, personalizzando la preparazione in modo consono per ogni singolo atleta. [1]

Tra i biomarcatori più importanti per il corpo umano ci sono l'adrenalina e il glucosio che svolgono la funzione di mantenimento di equilibrio metabolico. Livelli anomali di questi sono associati a diverse patologie. Per questo motivo è particolarmente importante progettare dispositivi PoCTD che appunto siano in grado di analizzare rapidamente ed in loco questi due biomarcatori, a differenza dei test di laboratorio che invece richiedono molto più tempo. [8]

L'adrenalina è un ormone e neurotrasmettitore essenziale che aiuta il corpo a reagire allo stress e a regolare il metabolismo. Per questo motivo valori anomali di questo ormone possono portare a concentrazioni alterate di glucosio nel sangue e di conseguenza a diabete, infarto del miocardio e sindrome metabolica. Precedentemente l'analisi di questi biomarcatori veniva fatta tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni, spettrofotometria a fluorescenza, elettrochimica, spettrometria di massa, ecc. Questi metodi però impiegano molto tempo nella preparazione e rilevazione e di conseguenza non hanno un buon rapporto costo-efficienza [9].

a. µPAD PER LA RILEVAZIONE DI ADRENALINA E GLUCOSIO

Per ovviare ai problemi di tempi e costi sono stati sviluppati dispositivi analitici microfluidici colorimetrici basati su carta (µPAD) che sono innovativi grazie alla loro visualizzazione, miniaturizzazione, semplicità di funzionamento, portabilità e flessibilità [10].

Nello specifico per il rilevamento simultaneo e accurato di adrenalina e glucosio sono stati progettati µPAD ripiegati in 3D tramite stampa a cera (*Figura 2(b)*). Questi µPAD sono formati da tre fogli che si ripiegano uno sull'altro e permettono di integrare lo strato di ingresso del campionamento (foglio a 6 bracci dove viene inserito il campione da analizzare), lo strato tampone (foglio a 6 cerchi piccoli imbevuto con soluzione tampone) e lo strato test (foglio a 6 cerchi larghi imbevuti con le soluzioni di rilevamento). Questo dispositivo consente alla soluzione dell'analita di fluire in modo verticale dalle zone tampone alle zone di rilevamento.

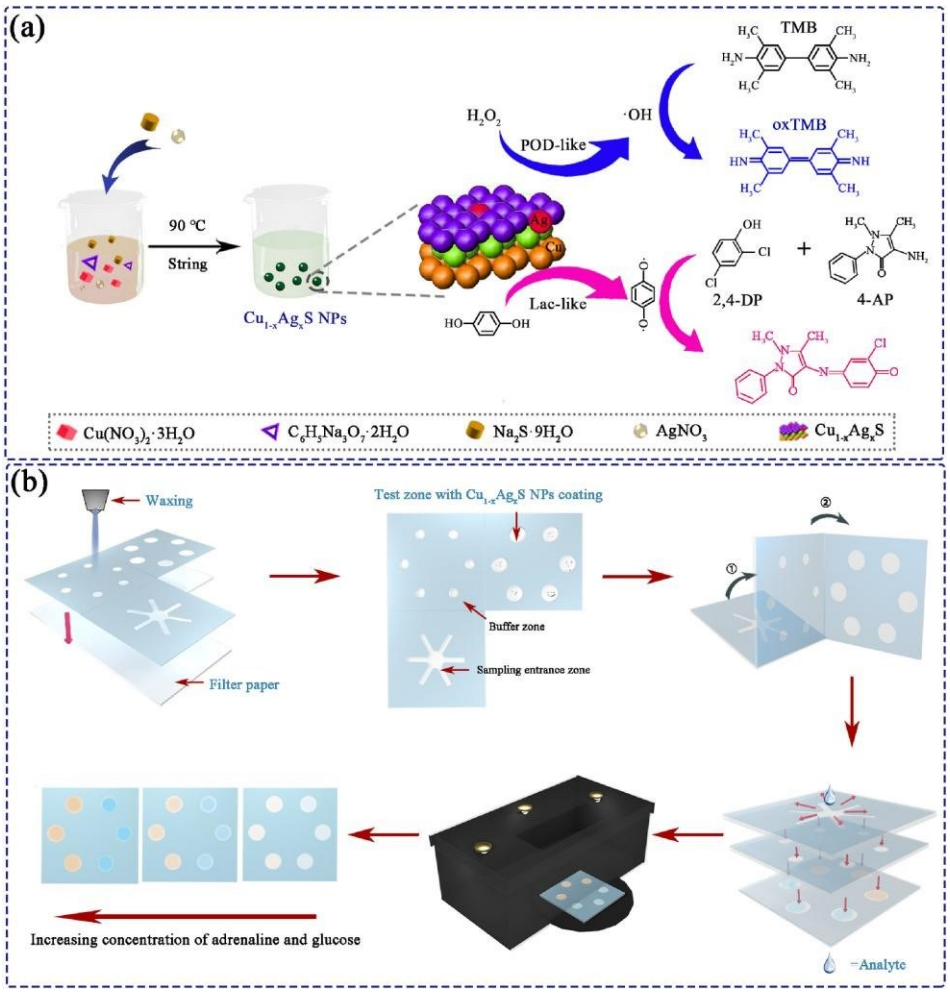

Figura 2. [8] a) Processo di analisi colorimetrica del Cu1-xAgxS NPs. b) Il µPAD per il rilevamento colorimetrico assistito dallo smartphone.

i. NANOPARTICELLE DI SOLFURO DI RAME DROGATE CON ARGENTO

Nelle soluzioni che rilevano gli analiti si utilizzano nanoparticelle di solfuro di rame drogate con argento ($Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs) come sonde di riferimento mutilfunzionale. La particolarità di queste nanoparticelle ($Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs) è che sono anche nanozimi, cioè particelle artificiali in grado di imitare l'attività di enzimi naturali [11]. Questo tipo di nanoparticelle mostra attività simile alla laccasi e alla perossidasi a causa dei siti attivi di Cu e questo permette potenzialmente di analizzare contemporaneamente adrenalina e glucosio.

La laccasi è un enzima ossidasi contenente un centro multirame e può catalizzare la conversione di composti fenolici nei corrispondenti chinoni. L'adrenalina è un composto fenolico e per questo motivo, grazie all'ossidazione mediata dalla laccasi, può essere rilevata attraverso l'analisi

colorimetrica dell'adrenocromo (rosso-arancio). Allo stesso modo l'enzima perossidasi può ottenere la rilevazione colorimetrica del glucosio in presenza di glucosio ossidasi (GOx) attraverso la reazione colorimetrica 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) indotta dal perossido di idrogeno (H_2O_2).
Le nanoparticelle di solfuro di rame vengono drogate con Ag ($Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs) per migliorare l'effetto catalitico delle NP di CuS (che altrimenti sarebbe ostacolato dalla bassa mobilità dei portatori) e per indurre la formazione di difetti sulla superficie delle nanoparticelle di CuS (e questo porta all'esposizione di più siti attivi e al miglioramento della mobilità dei portatori).
Questi μPAD ripiegati in 3D che impiegano nanoparticelle di solfuro di rame drogate con Ag ($Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs) sono quindi in grado di rilevare, tramite segnali di colore rosso-arancio e blu, rispettivamente l'adrenalina e il glucosio. L'intensità del colore di questi segnali viene analizzata utilizzando un'apposita applicazione per smartphone, che legge i segnali RGB e, utilizzando un'equazione lineare, li collega alla concentrazione di adrenalina o glucosio.

Le $Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs sono state preparate in questo modo [12]:

- $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (24,16 mg), $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (20 mg) e $AgNO_3$ (x = 0, 0,005, 0,01 e 0,05) sono dispersi in 90 mL di acqua deionizzata (DI) e agitati per 5 minuti.
- Successivamente, una soluzione DI di $Na_2S \cdot 9H_2O$ (10 mL, 2 mg/mL) è stata aggiunta alla miscela, seguita da 5 minuti di agitazione.
- Successivamente, la soluzione è stata riscaldata in un bagno d'acqua a 90 °C per 15 minuti.
- La soluzione di nanoparticelle di $Cu_{1-x}Ag_xS$ ottenuta è stata poi raffreddata in acqua ghiacciata e filtrata tramite dialisi per la purificazione

Figura 3. [8] Diagramma schematico della reazione colorimetrica di tipo laccasi.

Figura 4. [8] La reazione colorimetrica tra TMB e H_2O_2 catalizzata dalle nanoparticelle di $Cu_{1-x}Ag_xS$.

ii. ATTIVITA' SIMIL-LACCASICA E SIMIL-PEROSSIDASICA DELLE NANOPARTICELLE

Queste nanoparticelle sono nanozimi con attività simil-laccasica e simil-perossidasica [8]:

- L'attività simil-laccasica è stata confermata osservando l'ossidazione del composto fenolico 2,4-DP, il cui prodotto reagisce poi col substrato colorimetrico 4-AP, generando, in presenza di ossigeno, un prodotto di colore rosso con un picco di assorbimento a 510 nm (*Figura 3*). L'attività simil-laccasica viene valutata monitorando l'intensità di colore e l'assorbimento a 510 nm, dopo 15 minuti di incubazione in Tampone Tris-HCl (pH 10) contenente 2,4-DP, 4AP e $Cu_{1-x}Ag_xS$ NPs. L'analisi cinetica è stata condotta variando la concentrazione di 2,4-DP (0,2–20 mM), calcolando i parametri V_{max} e K_m secondo l'equazione di Michaelis-Menten (*Formula 1*). I valori di V_{max} e K_m sono rispettivamente $2{,}58 \times 10^{-3}$ mM/min e 0,10 mM.
- Per l'attività simil-perossidasica, le NPs (80 µg/mL) sono state testate in tampone NaAc-HAc (pH 5) con TMB (0,8 mM) e H_2O_2
  (11 mM). Dopo 20 minuti, è stato misurato l'assorbimento a 652 nm. Successivamente, sono state analizzate diverse concentrazioni di TMB (0,1–2,0 mM) e H_2O_2 (5–75 mM) per valutare la cinetica allo stato stazionario. I nanozimi similperossidasi possono convertire il perossido di idrogeno (H_2O_2) in radicali idrossilici (•OH). Successivamente, il TMB (incolore), usato come substrato colorimetrico, viene ossidato dai •OH a TMB ossidato (oxTMB) di colore blu, con un picco di assorbimento a 652 nm (*Figura 4*).

$$V_0 = V_{max}\frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Formula 1. Equazione Michaelis-Menten: K_M = costante di Michaelis-Menten (concentrazione di substrato necessaria, affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima); V_0 = velocità di formazione del prodotto; [S] = concentrazione del substrato; V_{max} = velocità massima.

iii. PREPARAZIONE DEI µPAD

Il modello di µPAD è stato progettato con AutoCAD e stampato con una stampante a cera su carta Whatman. La cera è stata fatta diffondere nella carta ponendo la carta stampata su una piastra riscaldante in modo da formare una barriera idrofobica che non permette al liquido di diffondersi nelle zone impregnate di cera. Il µPAD è stato poi diviso in zone di rilevamento colorimetrico dell'adrenalina e del glucosio. In quella dell'adrenalina sono state depositate $Cu_{0.99}Ag_{0.01}S$ NPs (280 µg/mL) e tampone Tris-HCl (pH = 10). L'adrenalina si trasforma in adrenocromo di colore rosso. In quella del glucosio è stata depositata una miscela di tampone NaAc-HAc (pH = 5) contenente TMB (0,8 mM), $Cu_{0.99}Ag_{0.01}S$ NPs (80 µg/mL) e GOx (1 mg/mL). Infine, il µPAD è stato lasciato asciugare [8].

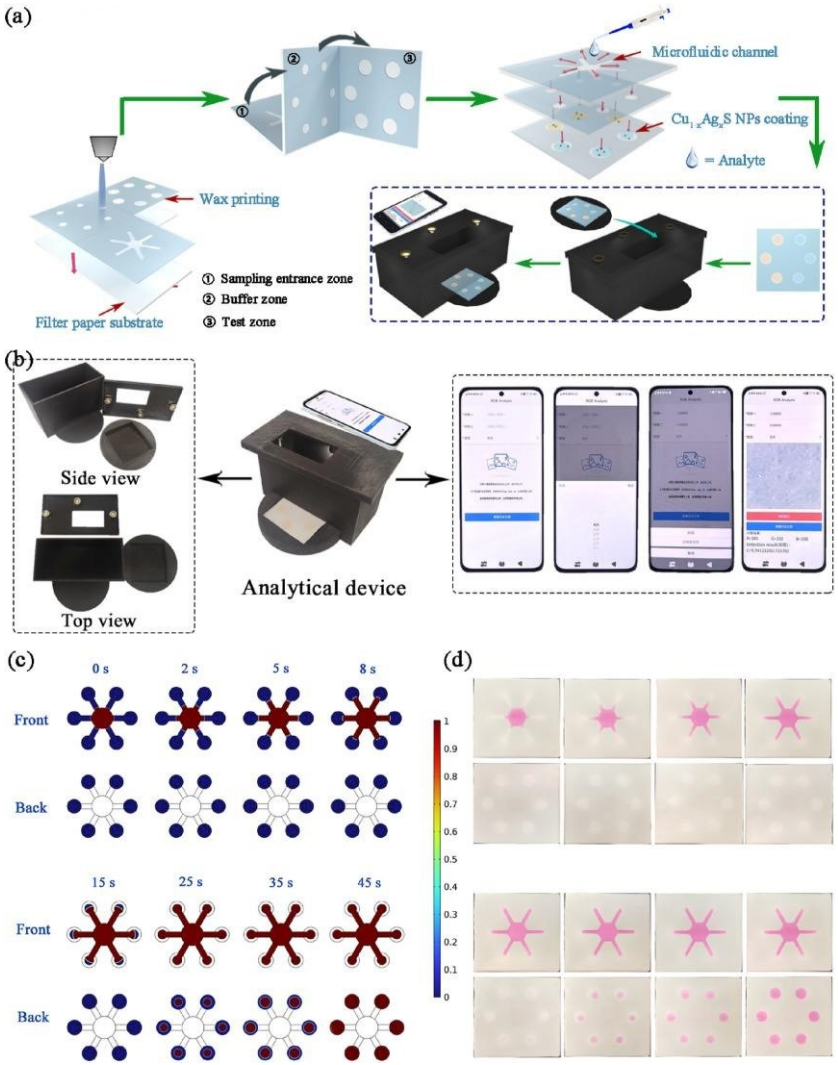

Figura 5. [8] a) Diagramma schematico del processo di analisi assistito dallo smartphone; b) Immagine del dispositivo analitico e dell'applicazione per smartphone; c)
Simulazione delle distribuzioni della soluzione nel µPAD piegato in 3D nel tempo; d) Immagini fotografiche della raccolta di campioni microfluidici.

Come mostrato in Figura 5, questo tipo di µPAD è diviso in zona di ingresso del campionamento, zona tampone e zona di test. Quando viene inserita la soluzione campione essa cade nella zona di ingresso, fluisce verso la zona tampone spinta dalle forze capillari e poi viene permeata verticalmente nella zona di test per le reazioni colorimetriche. Successivamente il campione viene incubato per 15 minuti e le immagini a colori dei µPAD sono acquisite utilizzando uno smartphone. Poi le concentrazioni di adrenalina e glucosio possono essere calcolate mediante l'analisi dei segnali di colore basata sull'equazione lineare adattata all'APP (*Figura 5(b)*). [8]

Per valutare le prestazioni del dispositivo µPAD è importante anche il tempo di raccolta del campione richiesto dal modulo microfluidico. Ad esempio, nella *Figura 5(c)* (frutto di una simulazione numerica di fluidodinamica) viene dimostrato che la soluzione campione può riempire interamente i µPAD entro 45 secondi a una portata di 1.78 µL s^{-1}. Questo viene poi confermato sperimentalmente come si vede in *Figura 5(d)*. [8]

iv. RILEVAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI CON METODO RGB

Per determinare la concentrazione di adrenalina e glucosio nel µPAD si utilizza una lettura RGB. Si tratta di un modello di colori di tipo additivo: ogni colore viene riprodotto come somma di componenti dei tre colori. I segnali RGB sono i livelli di rosso (Red), verde (Green) e blu (Blue) di cui è composta un'immagine colorata e possono essere utilizzati per determinare la concentrazione di sostanza che impone una certa colorazione rispetto al colore di base della carta. Per questo motivo si usa il rapporto R/B o B/R. [8]

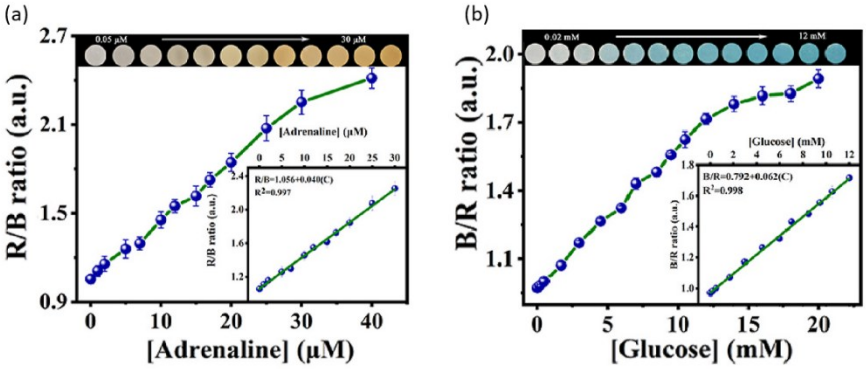

Figura 6. [8] a) Relazione lineare relativa ai valori R/B e alle concentrazioni di adrenalina (0,05–30 µM). b) Relazione lineare relativa ai valori B/R e alle concentrazioni di glucosio (0,02–12 mM).

Ad esempio, per l'adrenalina, che viene ossidata formando adrenocromo di colore arancio-rosso, la reazione può essere quantificata misurando i valori RGB, in particolare il rapporto R/B, che aumenta

linearmente con la concentrazione di adrenalina nel range 0,05–30 μM con limite di rilevazione (LOD) di 10,2 nM (*Figura 6 (a)*). Il colore delle zone di test cambia da incolore a rosso-arancio e il valore R/B dei segnali di colore aumenta gradualmente con l'aumentare della concentrazione di adrenalina. Anche per il glucosio il colore è quantificato via RGB (rapporto B/R) con risposta lineare da 0,02 a 12 mM e LOD di 11,5 μM (*Figura 6 (b)*). Il colore delle zone di rilevamento del glucosio cambia gradualmente da incolore a blu con l'aumentare della concentrazione di glucosio. [8]
Il μPAD basato su $Cu_{0.99}Ag_{0.01}S$ mostra inoltre alta selettività e resistenza alle interferenze verso altri zuccheri, amminoacidi, ioni e composti comuni nel siero umano. I test dimostrano che solo adrenalina e glucosio generano segnali rilevanti. [8]

v. UTILIZZO PRATICO DEI μPAD

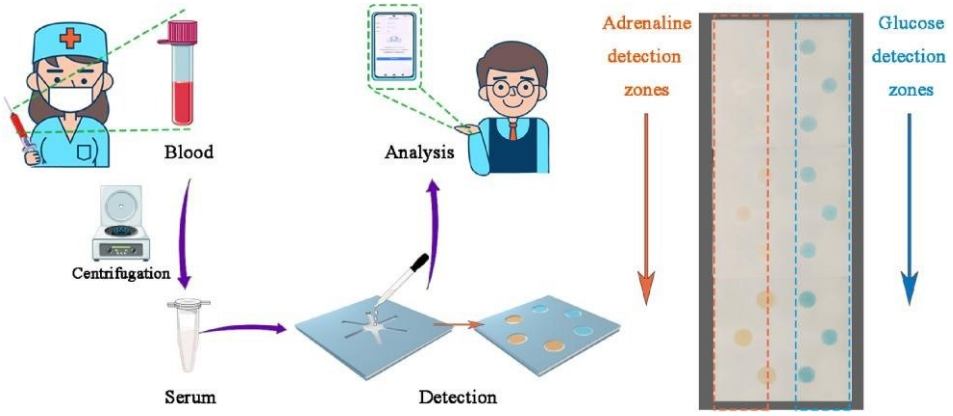

Figura 7. [8] Schema di funzionamento del μPAD basato su smartphone per il rilevamento del siero.

Nell'utilizzo pratico si utilizza il siero umano, attraverso la centrifugazione di un campione di sangue, che viene aggiunto nella zona di campionamento del μPAD (*Figura 7*).
È stato fatto un test pratico inserendo nel dispositivo qui proposto un campione di siero diluito 3 volte (80 μL), contenente concentrazioni correlate di adrenalina e glucosio. Dopo 15 minuti, il μPAD è stato spostato nel lightbox fotografico per scattare la foto e utilizzare l'APP per smartphone per analizzare i risultati. [8]

Campioni	Adrenalina aggiunta (μM)	Glucosio aggiunto (mM)	Totale trovato		RSD (%) (n = 3)	
			Adrenalina (μM)	Glucosio (mM)	Adrenalina	Glucosio
1	0,5	3.0	0,56	4.3	3.7	1.5
2	5.0	4.5	5.34	5.6	4.6	2.2
3	10.0	7.0	10.18	8.3	4.2	1.9

Tabella 4. [8] Rilevazione di adrenalina e glucosio nei campioni di siero.

Come si può notare dalla *Tabella 4* i risultati mostrano buoni valori di RSD (Relative Standard Deviation) (*Formula 2*) il che dimostra che le misurazioni con il µPAD sono ripetibili e precise, con variazioni minime tra i test ripetuti. Questo è un buon segno per l'affidabilità di questo metodo per il monitoraggio dell'adrenalina e del glucosio del siero umano [8].

$$RSD(\%) = \left(\frac{Deviazione\ standard}{Media}\right) \cdot 100$$

Formula 2. RSD indica quanto siano coerenti i risultati analitici. Più è basso il valore di RSD, maggiore è la precisione.

3. CONCLUSIONI

I dispositivi PoCTD sono quindi strumenti che potranno rivestire un ruolo importante per il monitoraggio fisiologico degli atleti. Questo perché sono in grado di fornire valori precisi e rapidi di biomarcatori, come ad esempio l'adrenalina e il glucosio, e possono essere utilizzati sul campo riducendo notevolmente i tempi di attesa e le risorse necessarie rispetto ai test di laboratorio.

Esistono diversi metodi chimici nei PoCTD per la rivelazione di marcatori biologici tra cui sensori colorimetrici, fluorimetrici, elettrochimici e nanoparticelle magnetiche. Tra i più promettenti però spiccano i μPAD (microfluidic Paper-based Analytical Devices) che offrono vantaggi significativi in termini di costi, accessibilità e sono in grado rilevare più biomarcatori in un'unica analisi.
In questa tesi è riportato l'esempio di un prototipo di μPAD con nanoparticelle di solfuro di rame drogate con argento che, grazie alla loro attività simil-laccasica e simil-perossidasica, sono in grado di rilevare simultaneamente la concentrazione di adrenalina e glucosio (con l'ausilio di una app per smartphone che si basa su una lettura col metodo RGB).

Grazie a questi metodi il monitoraggio sportivo può essere nettamente migliorato perché i PoCTD, e in particolare i μPAD, offrono risultati precisi e tempestivi di determinati biomarcatori. La loro corretta interpretazione può favorire una più corretta e specifica programmazione di allenamenti, alimentazione e recuperi con lo scopo di migliorare le performance dell'atleta.

4. BIBLIOGRAFIA

[1] A. Sharma, A.I.Y. Tok, P. Alagappan et al. Trends in Analytical Chemistry 142 (2021) 116327

[2] K.P. Barnes, C.R. Rainbow, Update on banned substances 2013, Sports Health 5 (5) (2013) 442e447.

[3] E.C. Lee, et al., Biomarkers in sports and exercise: tracking health, performance, and recovery in athletes, J. Strength Condit Res. 31 (10) (2017) 2920.

[4] W. Pitsch, "The science of doping" revisited: fallacies of the current antidoping regime, Eur. J. Sport Sci. 9 (2) (2009) 87e95.

[5] R. Peeling, D. Mabey, Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world, Clin. Microbiol. Infect. 16 (8) (2010) 1062e1069

[6] A. St John, C.P. Price, Existing and emerging technologies for point-of-care testing, Clin. Biochem. Rev. 35 (3) (2014) 155.

[7] C.R. Pedlar, J. Newell, N.A. Lewis, Blood biomarker profiling and monitoring for high-performance physiology and nutrition: current perspectives, limitations and recommendations, Sports Med. 49 (2) (2019) 185e198.

[8] H. Wang et al. Analytica Chimica Acta 1336 (2025) 343489.

[9] C.B. Yang, X.Y. Gan, Y.P. Zeng, Z.R. Xu, L.Q. Xu, C.X. Hu, et al., Advanced design and applications of digital microfluidics in biomedical fields: an update of recent progress, Biosens. Bioelectron. 242 (2023) 115723.

[10] [a]P.T. Nguyen, J. Lee, A. Cho, M.S. Kim, D. Choi, J.W. Han, et al., Rational development of co-doped mesoporous ceria with high peroxidase-mimicking activity at neutral pH for paper-based colorimetric detection of multiple biomarkers, Adv. Funct. Mater. 32 (2022) 2112428.

[11] D. Li, D.N. Dai, G.G. Xiong, S.Q. Lan, C. Zhang, Metal-based nanozymes with multienzyme-like activities as therapeutic candidates: application, mechanisms, and optimization strategy, Small 19 (2022).

[12] M. Zhou, R. Zhang, M.A. Huang, W. Lu, S.L. Song, M.P. Melancon, et al., Achelator- free multifunctional [^{64}Cu]CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/ CT imaging and photothermal ablation therapy, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 15351.