



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“LENTI A CONTATTO “SMART” PER IL MONITORAGGIO NON  
INVASIVO DEL GLUCOSIO”**

**Relatore: Dott. Michele Schiavon**

**Laureanda: Erica Basso**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**21/07/2023**



## INDICE

<b>Sommario</b> .....	3
<b>1. <u>Introduzione</u></b> .....	5
<b>1.1. <u>Diabete mellito</u></b> .....	5
1.1.1. <b>Diabete di tipo 1</b> .....	6
1.1.2. <b>Diabete di tipo 2</b> .....	7
1.1.3. <b>Diagnostica e sintomatologia</b> .....	7
<b>1.2. <u>Terapia del diabete</u></b> .....	8
1.2.1. <b>Tecnologie convenzionali di monitoraggio glicemico</b> .....	9
1.2.1.1. <b><u>Self-monitoring of Blood Glucose</u></b> .....	9
1.2.1.2. <b><u>Continuous Glucose Monitoring (CGM)</u></b> .....	11
1.2.1.2.1. <i>Sensori enzimatici a base elettrochimica</i> .....	12
1.2.1.2.2. <i>Sensori non enzimatici a base ottica</i> .....	13
1.2.2. <b>Tecnologie innovative di monitoraggio glicemico</b> .....	15
<b>1.3. <u>Obiettivo della tesi</u></b> .....	17
<b>2. <u>Dispositivi Non Invasivi per il Monitoraggio Glicemico: Lenti a Contatto</u></b> <b><u>“Smart”</u></b> .....	19
2.1. <b><u>Liquido lacrimale per il monitoraggio glicemico</u></b> .....	20
2.2. <b><u>Lenti a contatto “smart” per il monitoraggio continuo del glucosio</u></b> .....	23
2.2.1. <b>Sensori elettrochimici</b> .....	25
2.2.2. <b>Sensori ottici</b> .....	27
2.2.2.1. <b><u>Sensori a fluorescenza (FRET)</u></b> .....	28
2.2.2.2. <b><u>Sensori a diffrazione (rilevamento su base fotonica)</u></b> .....	32
2.3. <b><u>Analisi comparativa delle diverse categorie di biosensori</u></b> .....	36
2.3.1. <b>Sensori elettrochimici</b> .....	36
2.3.2. <b>Sensori ottici</b> .....	37
2.3.3. <b>Risultati e prospettive future</b> .....	39
<b><u>Conclusioni</u></b> .....	41
<b>Bibliografia</b> .....	43



## Sommario

Il diabete mellito è una malattia cronica diffusa caratterizzata dalla presenza di livelli di glucosio nel sangue (glicemia) elevati e che richiede un'attenta gestione per prevenirne le complicanze micro- e macro-vascolari. L'automonitoraggio della glicemia rappresenta un importante strumento per il controllo terapeutico nei pazienti diabetici. Nonostante gli enormi sviluppi nel settore del monitoraggio della glicemia negli ultimi 20 anni, le attuali tecnologie sono basate sulla misura della glicemia a livello del sangue (invasivo) o del liquido interstiziale (minimamente invasivo).

In questo settore, il liquido lacrimale potrebbe rappresentare una possibile fonte di misura non invasiva dello stato di salute di un individuo, esprimendo diverse concentrazioni di enzimi, proteine e metaboliti, tra cui il glucosio. I biosensori per lenti a contatto rappresentano una via praticabile per mirare al monitoraggio del glucosio non invasivo grazie al loro contatto diretto con l'occhio umano. In particolare, la concentrazione di glucosio nel liquido lacrimale può essere utilizzata come surrogato per stimare i livelli di glucosio nel sangue. Recentemente sono stati dedicati ampi sforzi allo sviluppo di lenti a contatto "smart" per il rilevamento continuo del glucosio, sviluppando diversi tipi di sensori ottici ed elettrochimici per l'applicazione biomedica.

La tesi si presta, successivamente ad una breve introduzione alla malattia del diabete, alla trattazione delle tecnologie tradizionali e sperimentali applicate al monitoraggio glicemico, ponendo particolare attenzione sull'innovativa tecnologia delle lenti a contatto "smart" e i biosensori ad esse applicati.



# **1. Introduzione**

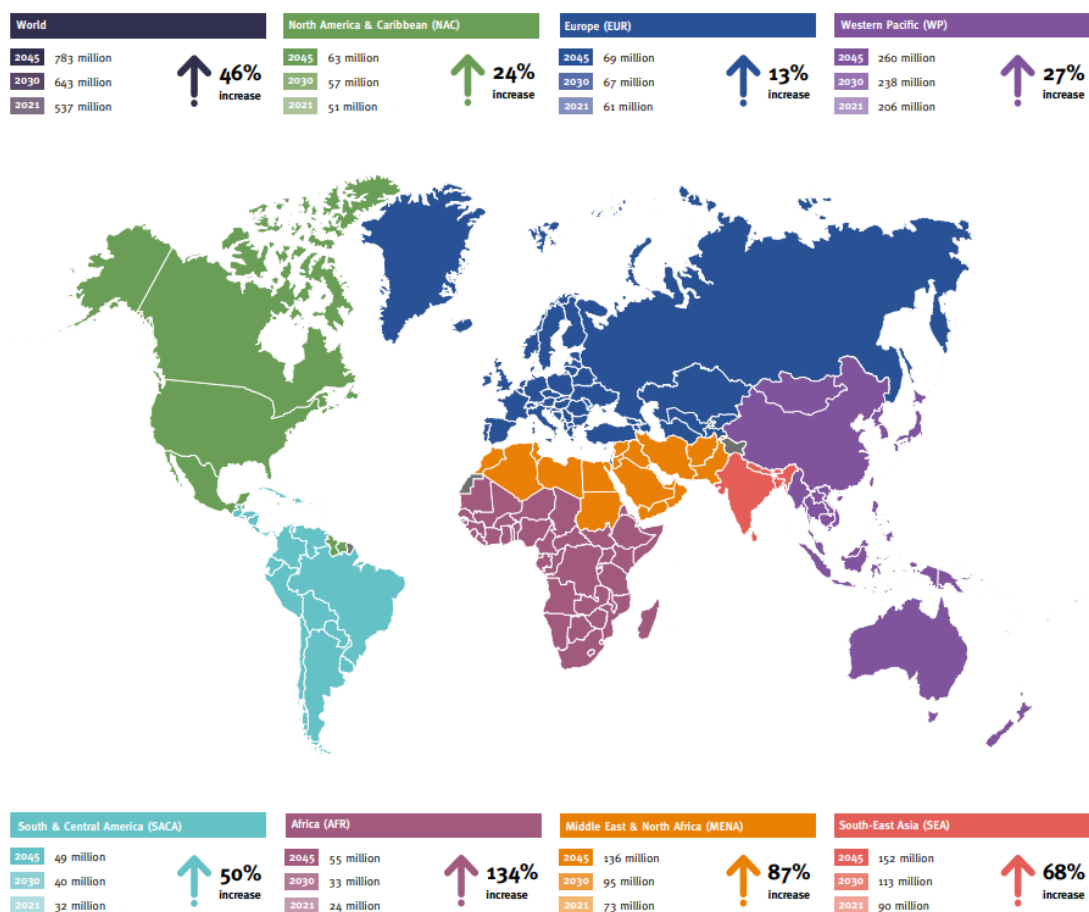
## **1.1 Diabete mellito**

Il diabete mellito, o più semplicemente diabete, è una malattia cronica che colpisce più del 10% della popolazione mondiale (circa 537 milioni di adulti nel 2021). Non solo è una patologia molto frequente, ma anche in continua crescita: si stima un aumento mondiale di casi del 46% entro il 2045, circa 783 milioni di adulti tra i 20 e i 79 anni.

Il diabete è, inoltre, tra le prime dieci cause di morte: le statistiche hanno dimostrato che nel 2021 approssimativamente 6.7 milioni di adulti siano deceduti a causa di complicazioni dovute al diabete (Figura 1). [1]

La malattia è caratterizzata dalla presenza di livelli di glucosio elevati nel sangue (iperglicemia), a causa di un'inadeguata o assente produzione di insulina o di una scarsa capacità del corpo di utilizzare efficacemente l'insulina che produce. L'ormone, prodotto dal pancreas, consente l'ingresso del glucosio nelle cellule insulino-dipendenti, in particolare quelle muscolari e adipose, e il suo conseguente utilizzo come fonte di energia. Quando questo meccanismo è danneggiato, il glucosio tende ad accumularsi nel circolo sanguigno, causando varie complicazioni e patologie come malattie cardiovascolari, del sistema nervoso periferico, insufficienza renale, retinopatia con possibile cecità.

Le più frequenti e conosciute forme di diabete mellito sono il diabete di tipo 1 e di tipo 2; tuttavia, anche se in piccola percentuale, esistono altre tipologie come il diabete monogenico (o MODY), dovuto a difetti genetici che influenzano la funzione delle cellule beta o l'azione dell'insulina, o come il diabete gestazionale che può svilupparsi dalla particolare insulina resistenza che si crea, in tutte le donne, durante la gravidanza.[2]



**Figura 1:** Numero di adulti (20-79 anni) con diabete nel mondo nel 2021 e aumento stimato per il 2045 (per regione IDF). [5]

### 1.1.1 Diabete di tipo 1

Il diabete di tipo 1 (in passato detto diabete insulino-dipendente) è causato da un processo autoimmune in cui il sistema immunitario del corpo attacca le cellule beta del pancreas, adibite alla produzione di insulina, causando la scarsità o assenza di tale ormone. La suddetta distruzione progredisce in modo subclinico per mesi o anni, finché la massa di beta-cellule non diminuisce al punto tale che la concentrazione di insulina non è più adeguata a controllare la glicemia.

Il diabete di tipo 1 è tipico dell'età infantile e adolescenziale; tuttavia, si può sviluppare anche negli adulti come diabete autoimmune latente, che spesso appare inizialmente come una forma di insulino-resistenza tipica del diabete mellito di tipo



2. La causa del diabete di tipo 1 è una combinazione di autoantigeni, suscettibilità genetica che conferisce una predisposizione e fattori ambientali:

- I geni predisponenti comprendono quelli all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità, presenti in più del 90% dei pazienti affetti da diabete di tipo 1, e quelli che regolano la produzione di insulina. I geni che conferiscono predisposizione sono più diffusi all'interno di alcune popolazioni rispetto ad altre, e ciò spiega la differenza di incidenza del diabete tra le diverse etnie.
- Gli autoantigeni contenuti nelle cellule beta, come l'acido glutammico decarbossilasi, l'insulina, la proinsulina, la proteina associata all'insulinoma e il trasportatore dello zinco ZnT8, vengono rilasciati in seguito ad un danno cellulare, per esempio dovuto ad un'infezione; si attiva così una risposta immunitaria che porta alla distruzione delle stesse cellule beta.
- Diversi virus sono stati correlati all'insorgere del diabete di tipo 1, in quanto sono in grado di distruggere le cellule beta direttamente o indirettamente, mediante l'esposizione di autoantigeni o l'attivazione di linfociti autoreattivi. [2]

### 1.1.2 Diabete di tipo 2

Nel diabete di tipo 2, l'iperglicemia si sviluppa quando la secrezione insulinica non riesce più a compensare la resistenza all'insulina sviluppata dal paziente. Si tratta della tipologia più frequente (interessa circa il 90% dei casi) e tende a svilupparsi negli adulti, diventando più frequente con l'avanzare dell'età. Il rischio di diabete di tipo 2 è determinato dall'interazione tra predisposizione genetica e diversi fattori quali l'etnia, la storia familiare, sovrappeso o obesità, dieta scorretta, mancanza di attività fisica, un precedente episodio di diabete gestazionale e fumo. L'incapacità di sopprimere la lipolisi nel tessuto adiposo compromette il trasporto del glucosio e altera l'attività della glicogeno-sintetasi muscolare. [2]

### 1.1.3 Diagnosi e sintomatologia

Nei pazienti con diabete, anni di iperglicemia non controllata possono sfociare in molteplici complicanze, principalmente vascolari come la microangiopatia (che

comprende retinopatia, nefropatia e neuropatia) o l'aterosclerosi dei grandi vasi che potrebbe portare all'infarto del miocardio o ictus. [3] Per questo è estremamente importante una diagnosi precoce, possibile tramite la valutazione di valori fondamentali quali [2]:

- Livelli di glicemia plasmatica a digiuno
- Emoglobina glicosilata
- Tolleranza al carico orale di glucosio

Tali test vanno affrontati nel caso di sintomatologia tipica del diabete quali minzione frequente, sensazione di molta sete e fame, stanchezza estrema, vista annebbiata, lentezza nella guarigione di ferite e lesioni, perdita di peso (per il diabete di tipo 1), formicolio o intorpidimento all'estremità degli arti (diabete di tipo 2). [4]

## 1.2 **Terapia del diabete**

La base della terapia per tutti i pazienti affetti da diabete mellito consiste nel monitoraggio della glicemia, seguita da diverse azioni terapeutiche a seconda del tipo, e cambiamenti nello stile di vita, come una dieta specifica, l'aumento dell'esercizio fisico e l'astensione dal fumo.

Per i diabetici di tipo 1 la terapia si basa sulla somministrazione di dosi giornaliere di insulina, in base al livello di glucosio plasmatico: l'obiettivo è quello di simulare la normale secrezione dell'ormone pancreatico di un soggetto sano.

I pazienti con diabete di tipo 2, invece, ricorrono ad una terapia farmacologica quando dieta ed attività fisica non sono più sufficienti per il controllo glicemico. Vengono perciò trattati con anti-iperglicemici o, nei casi più avanzati, insulina, o una loro combinazione. [6]

Elemento chiave per tenere sotto controllo la malattia è il monitoraggio quotidiano del livello di glucosio, che necessita di rientrare in uno specifico range di valori. Nei soggetti non affetti da diabete o altre alterazioni del metabolismo del glucosio, la glicemia a digiuno è generalmente compresa tra 60 mg/dl<sup>1</sup> e 99 mg/dl, mentre dopo un pasto

---

<sup>1</sup> mg/dl significa milligrammi di glucosio in 100 millilitri di sangue

raramente supera i 140 mg/dl.

Nei pazienti affetti da diabete, senza una terapia adeguata, si registra un'alterata glicemia a digiuno che supera i 126 mg/dl e una ridotta tolleranza al glucosio, con livelli di glicemia maggiori di 200 mg/dl dopo i pasti. (Tabella 1)

Esiste un altro parametro in grado di valutare l'andamento della glicemia denominato emoglobina glicata (HbA1c) che permette di stimare la media dei valori glicemici dei tre/quattro mesi precedenti al suo dosaggio. [7]

	Prediabetes	Diabetes
A1C	5.7-6.4% (39-47 mmol/mol)	≥6.5% (48 mmol/mol)
Fasting plasma glucose	100-125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)	≥126 mg/dL (7.0 mmol/L)
Oral glucose tolerance test	140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)
Random plasma glucose		≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)

**Tabella 1:** Valori di riferimento della glicemia plasmatica in caso di “pre-diabete” (soggetti a rischio di sviluppo della malattia) e diabete. [8]

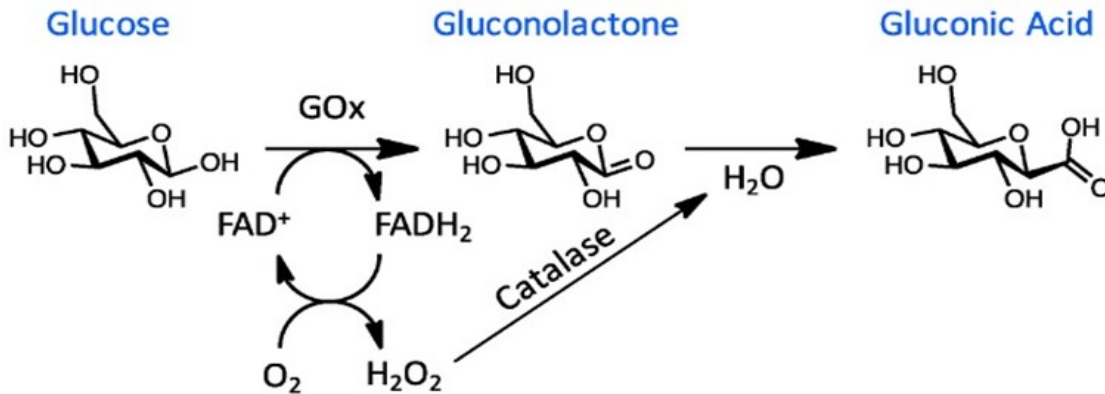
### 1.2.1 Tecnologie convenzionali per il monitoraggio del glucosio

#### 1.2.1.1 Self-Monitoring of Blood Glucose (SMBG)

Il metodo più tradizionale, e fino ad un decennio fa anche quello più utilizzato, per l'automonitoraggio glicemico si basa sul rilevamento del glucosio plasmatico capillare mediante glucometro (SMBG). [9]

La misurazione è basata su enzimi e prevede il campionamento del sangue capillare da un dito, tramite puntura con l'ausilio di una lancetta monouso, da analizzare con strisce reattive e un glucometro.

Il principio di funzionamento consiste nella quantificazione di una reazione enzimatica, l'ossidazione del glucosio, che risulta proporzionale alla concentrazione di zuccheri nel sangue. La reazione avviene ponendo il campione di sangue su una striscia contenente glucosio-ossidasi (GOD) come enzima, specifico per  $\beta$ -D-glucosio (Figura 2). Durante la reazione di ossidazione sono prodotti acido gluconico e perossido di idrogeno.



**Figura 2:** Conversione del glucosio in acido gluconico mediante glucosio ossidasi. [10]

La successiva quantificazione della reazione può essere ottenuta mediante:

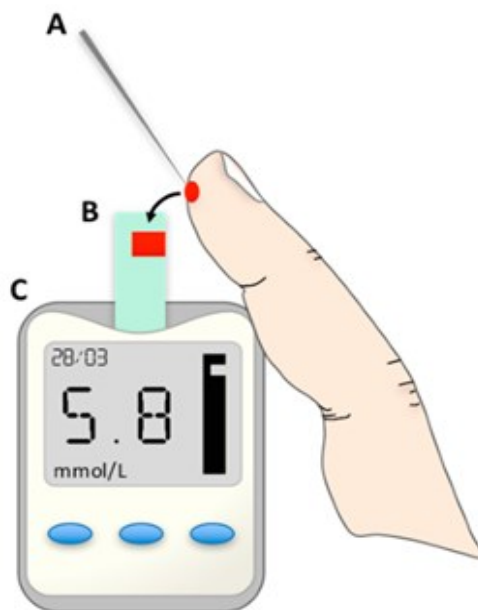
- Metodo riflettometrico: la glucosio-ossidasi catalizza una reazione cromogenica che colora la striscia reattiva; il glucometro misura la luce riflessa dalla striscia e converte il segnale in concentrazione di glucosio.
- Metodo impedenziometrico: gli elettroni prodotti dalla reazione formano una corrente che è specificatamente calibrata per riflettere la concentrazione di glucosio contenuta nel sangue. [11]

L'SMBG presenta importanti inconvenienti legati al campionamento intermittente della glicemia, generalmente 4-5 volte al giorno, fornendo solo scorci delle concentrazioni di glucosio e non misurando le fluttuazioni glicemiche durante l'arco di una giornata. Episodi di iperglicemia e ipoglicemia potrebbero non essere osservati e quindi non essere presi in considerazione nelle decisioni terapeutiche. [12]

Nonostante i notevoli progressi nell'innovazione di tali dispositivi, come la creazione di aghi più sottili e appuntiti, l'automonitoraggio tramite glucometro rimane una tecnologia invasiva e fastidiosa, che costringe i pazienti a sottoporsi quotidianamente a molteplici punture (Figura 3). Il dolore è causa di avversione da parte dei pazienti, che in alcuni casi porta alla riduzione del numero di misurazioni giornaliere. Inoltre, l'utilizzo ripetuto dell'ago può causare diversi effetti indesiderati, come lo sviluppo di una massiccia cicatrizzazione, la formazione di callosità e possibile perdita di sensibilità. [13]

La tecnologia SMBG è molto accurata e specifica, tuttavia vari fattori esterni come errori

di applicazione, condizioni ambientali estreme, valori estremi di ematocrito o interferenze farmacologiche possono potenzialmente falsificare i valori rilevati. Letture errate della glicemia possono portare a errori terapeutici, ad esempio uno scorretto dosaggio dell'insulina. Pertanto, è di fondamentale importanza istruire i pazienti affetti da diabete e coloro che li assistono sulle metodologie per rendere il test efficace e sulle sue limitazioni. [14]



**Figura 3:** SMBG: A) ago a lancetta; B) Campione di sangue su striscia reattiva; C) Glucometro che mostra la concentrazione di glucosio in mmol/L. Modificata da [10]

#### 1.2.1.2 Continuous Glucose Monitoring (CGM)

Negli ultimi due decenni, i sistemi di monitoraggio continuo del glucosio (CGM) hanno compiuto notevoli passi avanti nella misura in continuo della glicemia e sono via via sempre più utilizzati da pazienti affetti da diabete, specialmente di tipo 1.

I sensori CGM permettono il controllo glicemico con maggiore frequenza rispetto i tradizionali SMBG, identificando le tendenze glicemiche al fine di ottimizzare i piani di trattamento.

Tali dispositivi sono costituiti da un sensore enzimatico monouso che misura la concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale (di solito a intervalli di 1-5 min) e da

un trasmettitore che invia i valori misurati (di solito a intervalli di 5-15 min) ad un ricevitore dedicato e/o ad altri dispositivi mobili (per esempio smartphone e smart-watch) tramite comunicazione wireless. [12]

Il liquido interstiziale è il fluido extracellulare che circonda le cellule dei tessuti. Ha un potenziale significativo per la diagnostica medica in quanto possiede una composizione di biomarcatori clinicamente importanti simile al sangue.

Di conseguenza questo fluido fisiologico offre la possibilità di rilevamento attraverso tecnologie meno invasive rispetto al tradizionale pungidito associato alla misurazione con glucometro. [15]

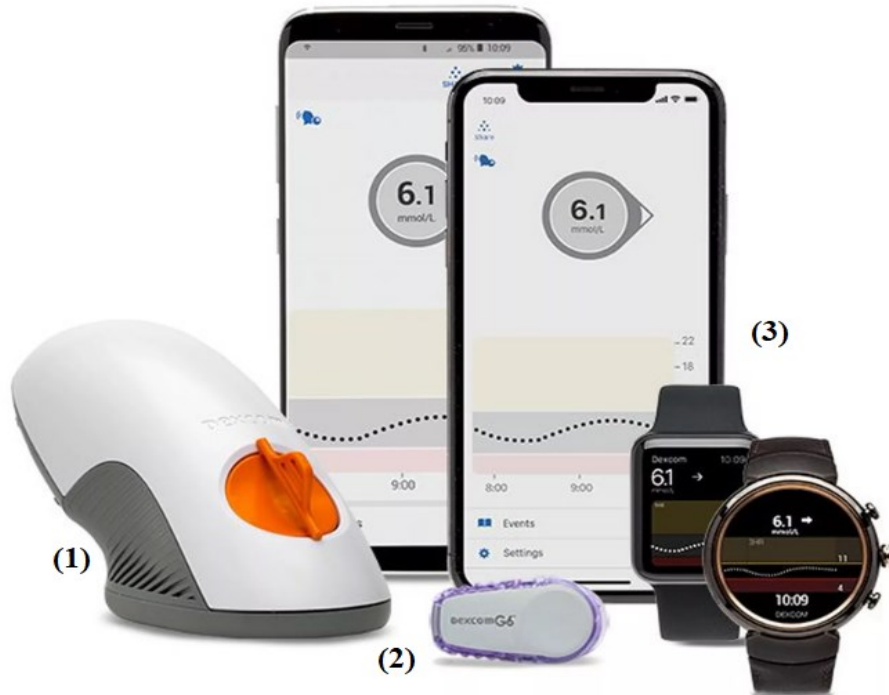
#### 1.2.1.2.1 *Sensori enzimatici a base elettrochimica*

Come per il SMBG, anche nella maggior parte dei sistemi CGM commercializzati, la trasduzione si basa sulla misurazione di un segnale elettrochimico, generato dalla reazione enzimatica tra glucosio e glucosio-ossidasi.

Il rilevamento basato sulla glucosio-ossidasi offre un'eccellente selettività per il glucosio rispetto ad altri composti endogeni ai fluidi biologici ed è una tecnologia consolidata in uso da diversi decenni.

I limiti prestazionali, spesso associati ai sensori di glucosio a base enzimatica ed elettrochimica, includono:

- Sensibilità all'incrostazione della superficie dell'elettrodo da parte di proteine, con conseguente perdita di funzionalità;
- Perdita temporanea di sensibilità al glucosio, in seguito a carenza di ossigeno per compressione fisica nel sito di impianto (che si verifica tipicamente durante il sonno);
- In alcuni sensori, interferenze chimiche da composti elettroattivi comunemente usati, come l'acido ascorbico (vitamina C) e il paracetamolo. [16]



**Figura 4:** Esempio di dispositivo CGM a base elettrochimica, Dexcom G6:  
 1. Applicatore automatico per l'inserimento del sensore sottocutaneo  
 2. Sensore e trasmettitore  
 3. Dispositivi mobile per la visualizzazione dei valori glicemici [17]

#### 1.2.1.2.2 Sensori non enzimatici a base ottica

Queste complicazioni hanno promosso lo sviluppo anche di sensori non enzimatici a base ottica, ossia che non richiedono enzimi per il riconoscimento del glucosio: attualmente, il sistema CGM di Senseonics<sup>2</sup> è l'unico sistema di questo tipo disponibile in commercio negli Stati Uniti e in Europa.

La concentrazione di glucosio viene misurata mediante fluorescenza da un polimero legante il glucosio abiotico<sup>3</sup> che ricopre la superficie di un sensore che è completamente impiantato nel tessuto sottocutaneo dermico. La fluorescenza viene misurata da un sistema ottico contenuto all'interno del sensore impiantato comprendente un diodo a emissione di luce, che funge da sorgente di eccitazione per il polimero fluorescente, e fotodiodi filtrati spettralmente che misurano l'intensità della fluorescenza dipendente dal

<sup>2</sup> Compagnia statunitense che dal 1996 sviluppa tecnologie biomediche.

<sup>3</sup> Cioè non a base di enzimi.

glucosio.

Essendo il sensore completamente impiantato, esso necessita di un'antenna interna che riceve alimentazione in modalità wireless e comunica con un trasmettitore indossato esternamente.

Dal momento che il segnale fluorescente emana dall'intera massa del componente polimerico, non solo in superficie come con i sensori elettrochimici, non è soggetto allo stesso grado di incrostazione.

Sebbene le sostanze precedentemente citate come il paracetamolo e l'acido ascorbico, abbiano dimostrato di non avere alcun effetto interferente per questo tipo di sensori, altre sostanze come la tetraciclina e il mannitolo limitano le prestazioni.

Tuttavia, il sensore a base fluorescente viene completamente inserito nel tessuto interstiziale da un operatore sanitario in una procedura ambulatoriale.

Poiché il sensore non sporge attraverso la pelle, il sito di inserimento è in grado di richiudersi completamente e consentire la risoluzione della risposta infiammatoria acuta che può limitare la durata del sensore. [16]



**Figura 5:** Eversense di Senseonics per il monitoraggio continuo del glucosio:

1. Sensore sottocutaneo

2. Trasmettitore smart

3. Dispositivi mobili che ricevono i dati dal trasmettitore in modalità wireless [18]



### 1.2.2 Tecnologie innovative nel monitoraggio del glucosio

L'attuale gestione del monitoraggio della glicemia si basa su tecniche con chiare limitazioni, che rendono fondamentale la ricerca e lo sviluppo di nuove tecnologie.

La disponibilità di dispositivi per il monitoraggio continuo minimamente invasivi (CGM) degli ultimi anni, ha apportato alcuni miglioramenti alla vita dei pazienti diabetici; tuttavia, l'accuratezza vicina ma ancora inferiore rispetto al più invasivo SMBG, le problematiche correlate all'inserzione (1.2.1.2.1), e il costo eccessivo portano ad una continua ricerca di miglioramento e sviluppo di nuove tecnologie.

Idealmente, queste tecnologie dovrebbero essere non invasive, indolori, compatte, leggere, portatili e facili da usare nella quotidianità e allo stesso tempo, dovrebbero fornire stime ragionevolmente accurate della concentrazione di glucosio che siano sufficienti per decisioni terapeutiche nutrizionali e farmacologiche. [19]

Le principali difficoltà nello sviluppo di sensori di glucosio non invasivi sono associate alla natura indiretta della misurazione e all'inevitabilità del processo di calibrazione, che possono portare a ridotta accuratezza, bassa usabilità e limitata applicabilità nell'uso domestico.

Le problematiche che devono essere affrontate da questo tipo di tecnologie riguardano:

- Scarsa specificità e sensibilità al glucosio: la natura indiretta degli approcci non invasivi causa un ridotto SNR<sup>4</sup> poiché fattori fisiologici ed elementi esterni possono influire sulla validità dei parametri misurati;
- Ritardo fisiologico: è stata dimostrata l'esistenza di un ritardo fisiologico tra la glicemia nel sangue e quella tissutale, che dipende dal sito di misurazione e da caratteristiche individuali dell'utente;
- Calibrazione del dispositivo: per la maggior parte dei sensori non invasivi in via di sviluppo il processo di calibrazione è lungo e complesso, caratterizzato da diverse misurazioni invasive/non invasive accoppiate che riduce l'usabilità e aumenta il disagio per il paziente;

---

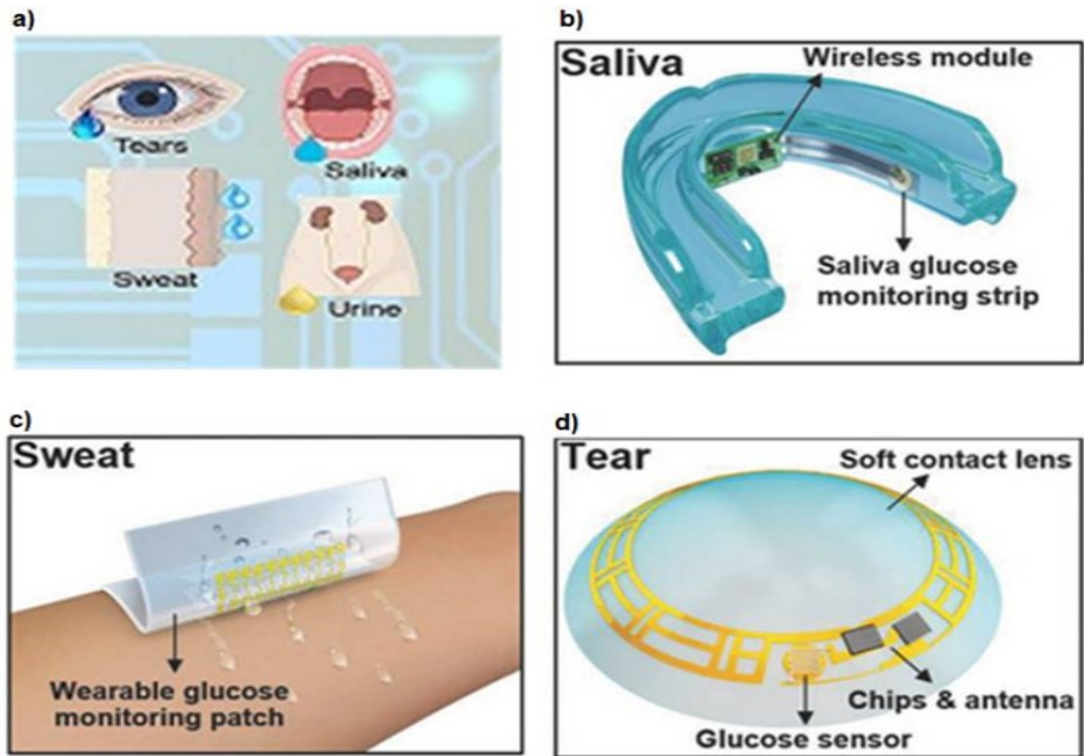
<sup>4</sup> Rapporto segnale/rumore.

- Idoneità per la varietà di utenti: gran parte delle tecnologie non invasive per stimare indirettamente il glucosio soffrono di interferenze legate alle caratteristiche anatomiche dell'individuo. In particolare, nelle tecniche ottiche la trasmissione della luce a ciascuna lunghezza d'onda è una funzione dello spessore, del colore e della struttura di pelle, ossa e sangue;
- Applicabilità per uso domestico: è necessario che i dispositivi di monitoraggio siano semplici nell'utilizzo e portabili al fine di garantirne l'uso frequente e corretto dei vari utenti. [20]

I numerosi principi e tecniche che sono stati perseguiti nella ricerca accademica, così come nell'industria, si classificano in quattro categorie principali, differenziati in base ai loro principi di rilevamento di glucosio:

- Metodi ottici: sfruttano le proprietà di riflessione, assorbimento e diffusione della luce quando attraversa mezzi biologici;
- Metodi termici: monitorano la generazione di calore metabolico propria della molecola di glucosio, rilevandone gli indici fisiologici;
- Metodi elettromagnetici: sfruttano le proprietà dielettriche del glucosio utilizzando piccole quantità di radiazione elettromagnetica, corrente e ultrasuoni;
- Nanotecnologie: vengono utilizzati nanomateriali, in particolare ossidi metallici e nanoparticelle di ferrite, che svolgono un ruolo catalitico nella rilevazione del glucosio, tramite l'analisi di fluidi fisiologici. [21, 22]

Sebbene il sangue rimanga il fluido corporeo più studiato per misurazioni glicemiche, altri fluidi biologici più accessibili come fluido interstiziale, fluido oculare, sudore, saliva o urina sono stati studiati come mezzi di campionamento alternativi per il monitoraggio continuo non invasivo (Figura 6). [10]



**Figura 6:** (a) Principali fluidi fisiologici, diversi dal sangue, per il monitoraggio non invasivo del glucosio. Biosensori in via di sviluppo basati su (b) saliva, (c) sudore, (d) liquido lacrimale. [19]

### 1.3 Obiettivo della tesi

Questa tesi mira ad analizzare una promettente nanotecnologia per il monitoraggio non invasivo della glicemia: la lente a contatto dotata di biosensore per il glucosio, in grado di monitorare in modo continuo i valori fisiologici del liquido lacrimale.

Nel capitolo successivo verrà esaminata la tecnologia nello specifico, ponendo particolare attenzione alle diverse categorie di sensori integrabili per la misurazione dei valori glicemici. Verranno analizzate quindi le varie tecniche di funzionamento, i vantaggi che le caratterizzano e le prospettive future.



## **2. Dispositivi Non Invasivi per il Monitoraggio Glicemico: Lenti a Contatto “Smart”**

Come esposto dal paragrafo 1.2.1, i dispositivi diagnostici convenzionali per il monitoraggio glicemico necessitano di accedere a fluidi biologici come sangue o liquido interstiziale, il cui prelievo viene considerato invasivo o minimamente invasivo rispettivamente, doloroso, scomodo e accompagnato dal rischio di infezioni. Gran parte di tali tecnologie richiedono, inoltre, un dispendio economico oneroso e una formazione tecnica per il corretto utilizzo.

È necessario, perciò, lo sviluppo di nuove tecnologie che siano in grado di ovviare alle limitazioni che caratterizzano i dispositivi tradizionali.

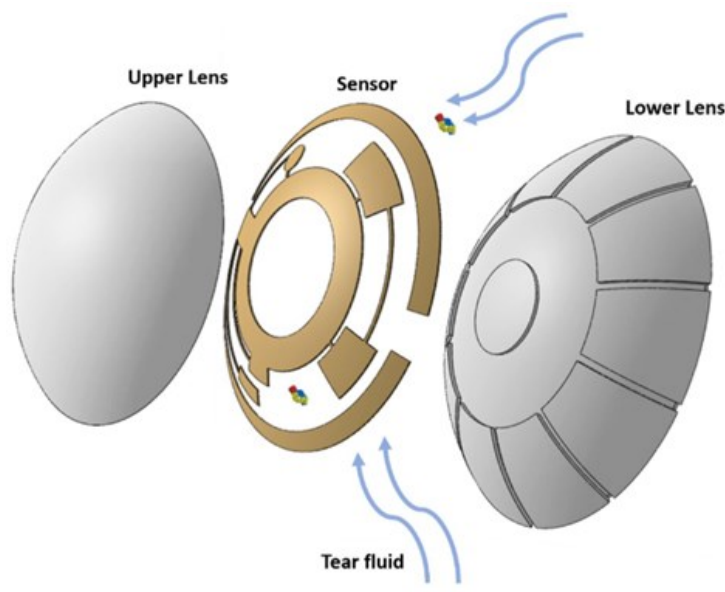
Le lenti a contatto combinano molteplici caratteristiche che le rendono ideali come dispositivi medici per applicazioni di bio-rilevamento:

1. Sono già largamente utilizzate e la loro efficienza è stata ampiamente collaudata: nel 2022 in media il 6.6% della popolazione europea ha utilizzato quotidianamente lenti a contatto; [23]
2. Offrono un contatto diretto con gli occhi e i tessuti umani, anche per lunghi periodi: forniscono quindi un'intima relazione con il liquido lacrimale, fonte di informazioni fisiologiche che rispecchiano lo stato di salute di un individuo, esprimendo diverse concentrazioni di metaboliti, enzimi e proteine;
3. Sono dispositivi di piccole dimensioni, leggeri, portatili, non invasivi ed economici;
4. L'utilizzo delle lenti a contatto è semplice e non richiede una particolare formazione;
5. Possiedono la capacità di incorporare diverse categorie di sensori per il bio-rilevamento.

Tali proprietà rendono le lenti a contatto un'ottima base per lo sviluppo di dispositivi medici per la diagnostica, in grado di analizzare non solo i valori glicemici, ma anche vari parametri utili alla terapia di diverse patologie:

- Con l'integrazione di sensori capacitivi, le lenti potrebbero essere applicate per il monitoraggio della pressione intraoculare (IOP), fattore indicativo primario nella diagnosi e nell'ausilio al trattamento del glaucoma; [24]
- Le lenti a contatto potrebbero essere utilizzate anche come dispositivi medici per il monitoraggio della temperatura corneale per il trattamento di condizioni oculari, quali il glaucoma, la stenosi dell'arteria carotidea, la malattia dell'occhio secco (DED), la retinopatia diabetica e la neurite vascolare. [25]

La ricerca per lo sviluppo delle lenti a contatto “smart” per il monitoraggio continuo e non invasivo del glucosio si basa sull'integrazione di biosensori (Figura 7) in grado di analizzare il liquido lacrimale che circonda l'occhio umano, come surrogato del sangue, rendendo la tecnologia minimamente invasiva.



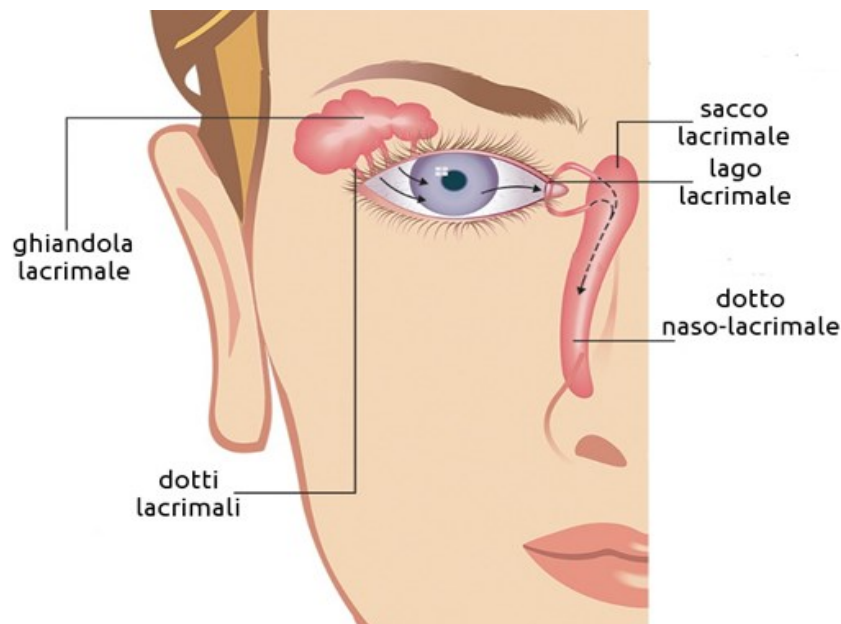
**Figura 7:** *Illustrazione concettuale di un biosensore per lenti a contatto* [26]

### 2.1 Liquido lacrimale per il monitoraggio glicemico

Il liquido lacrimale forma una sottile pellicola trilaminare trasparente, con spessore dai 2 ai 5,5 $\mu$ m che ricopre la superficie corneo-congiuntivale, denominata film lacrimale, essenziale per il corretto funzionamento e la salute della superficie oculare.

La complessa composizione del liquido lacrimale gli consente di svolgere contemporaneamente varie funzioni altamente specifiche, quali la creazione di una superficie rifrattiva liscia per il passaggio della luce, la difesa dell'occhio da lesioni o infezioni e la lubrificazione e l'idratazione della superficie oculare.

Le lacrime sono continuamente prodotte, eliminate e rinnovate; vengono secrete dalle ghiandole lacrimali situate nell'angolo superiore delle rispettive orbite, si riversano nel sacco congiuntivale e si raccolgono presso l'angolo mediale dell'occhio, dove, penetrando nei condotti lacrimali e nel dotto naso-lacrimale, sboccano nel meato nasale inferiore (Figura 8). [27, 28, 29]



**Figura 8:** *Descrizione semplificata dell'apparato lacrimale umano* [30]

Oltre al film lacrimale, l'occhio umano produce altri tipi di liquidi quali le lacrime riflesse e le lacrime psichiche. Le prime, secrete attraverso i canali del recettore transitorio nel nervo oftalmico, fungono da meccanismo di difesa per rimuovere agenti irritanti che potrebbero essere entrati in contatto con la superficie oculare. Questo tipo di lacrima viene secreto quando l'occhio è irritato da stimoli esterni come particelle o vapore, è esposto a un'intensa fonte di luce o quando stimoli caldi o piccanti entrano in contatto con la lingua.

La produzione di liquido lacrimale può essere indotta anche da fattori psichici come rabbia, dolore fisico o emotivo; in confronto alle lacrime basali o riflesse, quelle psichiche contengono concentrazioni più elevate di ormoni. Pertanto, la composizione del liquido lacrimale è soggetta a variazioni in base al metodo di raccolta del campione che deve, perciò, evitare stimolazione lacrimale e irritazione oculare.

Inoltre, metodi di campionamento che richiedono un volume di campione elevato possono produrre errati intervalli di concentrazione, a cui è necessario prestare attenzione. [31]

Lacrime e sangue sono separati dalla barriera emato-lacrimale, formata dalle cellule acinose e duttali della ghiandola lacrimale e dall'epitelio congiuntivale e corneale in corrispondenza della superficie dell'occhio; ciò comporta un'importante differenza compositiva tra i due fluidi. [32]

Tuttavia, il sangue che rifornisce il cervello passa attraverso questa barriera, provocando la fuoriuscita di biomarcatori nel liquido lacrimale, come glucosio, lattato, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> e urea; si crea pertanto una correlazione lineare tra glicemia ematica e glicemia lacrimale, che offre la possibilità di un monitoraggio del glucosio alternativo al tradizionale prelievo di sangue o liquido interstiziale (Tabella 2). [33]

Analyte	Tear Con. (mM)	Blood Con. (mM)	Diagnostic disease
Glucose	0.01-0.05	3.3-6.5	Diabetes
Lactate	2.0-5.0	0.36-0.75	Cancer, sepsis, ischemia, and liver disease.
Urea	3.0-6.0	3.3-6.5	Renal function
Dopamine	0.37	475 × 10 <sup>-9</sup>	Glaucoma
Total protein	7 g/L	7 g/L	Dry eye syndrome
Pyruvate	0.05-0.35	0.1-0.2	Genetic disorders of mitochondrial energy metabolism
Ascorbate	0.22-1.31	0.04-0.06	Diabetes
Na <sup>+</sup>	120-165	130-145	Hypo/hypertremia
Cortisol	1-40 ng/ml	100-200 mcg/ml	Stress levels and brain injuries
Cl <sup>-</sup>	118-135	95-125	Hyper/hypochloremia
Ca <sup>2+</sup>	0.4-1.1	2.0-2.6	Hyper/hypocalcemia
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20-26	24-30	Respiratory quotient indicator
Mg <sup>2+</sup>	0.5-0.9	0.7-1.1	Hyper/hypomagnesemia
K <sup>+</sup>	20-42	3.5-5.0	Hyper/hypokalemia and an indicator for ocular disease

**Tabella 2:** Confronto tra biomarcatori lacrimali e sanguigni e loro applicazioni [34]



La relazione tra la concentrazione di diversi analiti nel liquido lacrimale e nel sangue è complessa a causa di diverse complicazioni:

- La combinazione tra i bassi volumi di campione e le basse concentrazioni dei biomarcatori (dell'ordine dei  $\mu\text{M}$ ) richiede un'elevata sensibilità per l'analisi;
- È stato dimostrato che l'uso delle lenti a contatto e l'utilizzo della soluzione per la sterilizzazione può alterare il profilo proteico del film lacrimale, anche se in modo proporzionale;
- La composizione del liquido lacrimale può essere influenzata dall'assunzione di farmaci da parte del paziente;

Nonostante tali difficoltà, l'analisi della relazione tra concentrazione di biomarcatori del liquido lacrimale e nel sangue è stata utilizzata sperimentalmente con successo nella diagnosi e nel monitoraggio di diverse malattie. [31]

## 2.2 Lenti a contatto “smart” per il monitoraggio continuo del glucosio

La tecnologia delle lenti a contatto “smart” o “intelligenti” si basa sull'applicazione di sensori specifici per il glucosio a lenti a contatto morbide, spesso già di uso comune per i pazienti diabetici, che ne necessitano l'utilizzo a causa dello sviluppo di patologie legate alla vista.

I materiali più utilizzati nella composizione delle lenti morbide commercializzate sono poli-HEMA, poliacrilammide (PA), polietilene tereftalato (PET), alcol polivinilico (PVA) e polidimetilsilossano (PDMS).

Nella progettazione delle lenti a contatto, devono essere considerati diversi parametri, tra cui:

- il raggio di curvatura base<sup>5</sup> (BCR) che dev'essere compreso tra 8 e 10 mm per adattarsi alla conformazione della cornea e facilitare la permeabilità dell'ossigeno;
- lo spessore centrale<sup>6</sup> (CT) della lente influenza la quantità di ossigeno che permea la stessa; la maggior parte delle lenti a contatto commerciali sono

---

<sup>5</sup> Il BCR è uguale alla curvatura della superficie posteriore della lente a contatto, solitamente equivalente alla curvatura della superficie anteriore della cornea.

<sup>6</sup> CT è lo spessore tra le superfici interna ed esterna attraverso l'asse centrale della lente a contatto.

prodotte con un CT di circa 0,1 mm;

- la potenza ottica della lente a contatto che è il principale fattore responsabile della correzione della vista e misura il grado con cui la lente fa convergere la luce.

Proprietà fondamentali della lente sono la trasparenza del materiale di cui è costituita e l'alto indice di rifrazione, che consentono alla luce incidente di passare attraverso la lente per essere focalizzata negli occhi e permettere una vista efficiente.

I continui movimenti oculari e l'uso ripetuto delle lenti ne causa l'usura, che può portare a deformazioni o fratture irreversibili con un conseguente deterioramento delle prestazioni ottiche; pertanto, le proprietà meccaniche della lente a contatto, come il modulo di Young<sup>7</sup> e la resistenza alla trazione, devono essere ottimizzate.

Tutte le specifiche standard devono essere prese in considerazione anche nella struttura delle lenti a contatto "smart", per assicurarne la portabilità e l'efficienza.

Per la corretta progettazione di lenti a contatto intelligenti è necessario, inoltre, integrare biosensori con caratteristiche precise:

- I materiali utilizzati necessitano di biocompatibilità e non devono causare irritazione agli occhi, che altera le concentrazioni di metaboliti e proteine all'interno del liquido lacrimale (Paragrafo 2.1);
- Devono fornire una risposta stabile, sensibile, specifica ed affidabile dell'analita. La sensibilità dei sensori può deteriorarsi nel tempo quando un meccanismo di rilevamento presenta isteresi a causa del degrado dei materiali. Ciò può avvenire attraverso la denaturazione delle proteine, il foto-sbiancamento<sup>8</sup> dei coloranti organici nel rilevamento della fluorescenza o la lisciviazione<sup>9</sup> dei componenti del sensore. Una tecnica comune impiegata per evitare la lisciviazione consiste nell'incapsulare il materiale di rilevamento prima di incorporarlo nella matrice polimerica. Tuttavia, questa tecnica comporta una riduzione della velocità di diffusione;

---

<sup>7</sup> Grandezza, caratteristica di un materiale, che esprime il rapporto tra la tensione applicata e la deformazione che ne deriva.

<sup>8</sup> Perdita delle proprietà di fluorescenza.

<sup>9</sup> Processo per cui si osserva la separazione di uno o più componenti solubili da una massa solida.

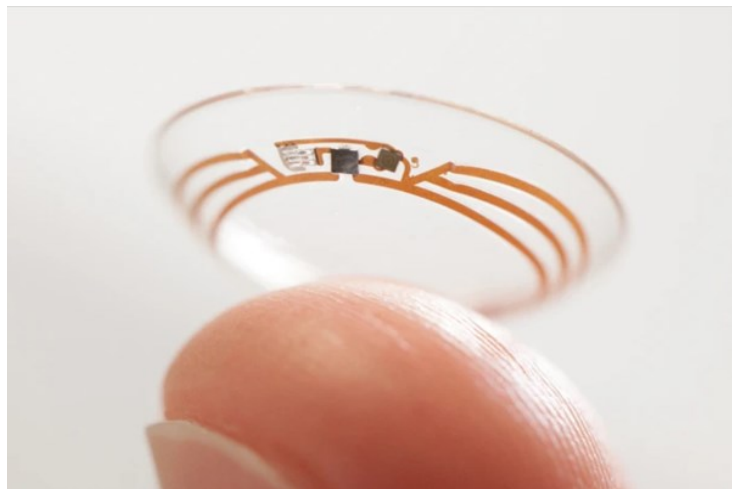
- Il tempo tra il rilevamento e la lettura dei dati dev'essere breve, in modo da garantire che l'utente riceva un avviso tempestivo dell'insorgenza di ipoglicemia o iperglicemia. Il tempo di risposta è determinato principalmente dalle caratteristiche dei materiali di rilevamento e della matrice polimerica circostante;
- Il sistema elettronico del biosensore dev'essere in grado di adattarsi alle caratteristiche di flessibilità, elasticità e trasparenza ottica delle lenti a contatto per garantire un'efficace funzionalità. [31, 35]

Le numerose ricerche per lo sviluppo di lenti contatto “smart” per il monitoraggio continuo e non invasivo del glucosio dal 2003 ad oggi, vengono classificate in base al tipo di sensore utilizzato che può essere di tipo elettrochimico o ottico, come per la tecnologia a fluorescenza o a diffrazione.

### 2.2.1 Sensori elettrochimici

L'analisi elettrochimica è tra le tecnologie di monitoraggio glicemico più studiate, in quanto considerata semplice e quantitativa.

I recenti progressi negli elettrodi trasparenti, nella tecnologia di comunicazione wireless e nei biosensori hanno accelerato il progresso delle lenti a contatto “intelligenti” basati sulla tecnologia elettrochimica, tanto da interessare colossi aziendali e farmaceutici, come Google e Novartis che nel 2014 hanno intrapreso una collaborazione per lo sviluppo di tali dispositivi medici (Figura 9). [36]



**Figura 9:** Prototipo delle lenti a contatto “smart” sviluppate da Google. [36]

Varie tecniche di fabbricazione, in particolare quelle utilizzate nell'industria dei semiconduttori, sono comunemente impiegate per costruire biosensori elettrochimici. Nel caso del rilevamento del glucosio, i sensori utilizzano un'azione enzimatica che consente il verificarsi di reazioni altamente selettive per il rilevamento elettrochimico. Generalmente, la glucosio ossidasi (GOD) converte il glucosio in gluconolattone e perossido di idrogeno, che si dissocia ulteriormente in ossigeno, ioni idrogeno ed elettroni. Il sistema a tre elettrodi del sensore utilizza gli elettroni prodotti per quantificare la concentrazione di glucosio nel fluido, applicando il metodo amperometrico (viene, cioè, monitorata la corrente che scorre tra gli elettrodi). La selettività e la sensibilità della reazione dipendono fortemente dalle caratteristiche dell'elettrodo di lavoro; pertanto, è necessario porre attenzione ai materiali di base utilizzati nell'ingegnerizzazione della sua struttura. [37]

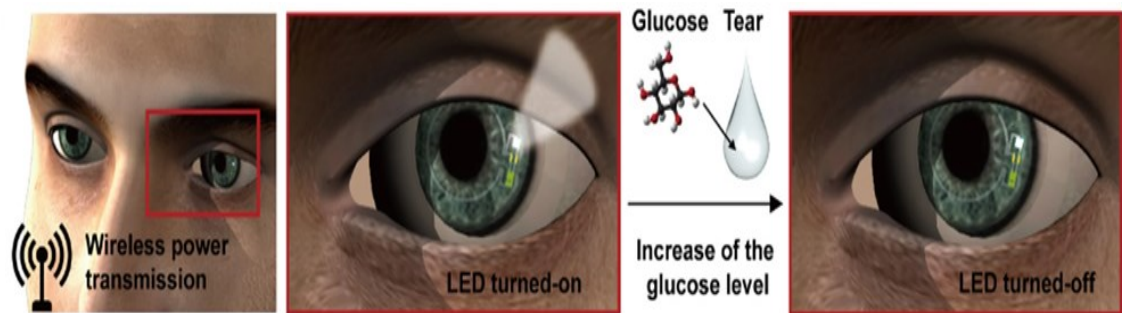
Ad esempio, sono state sviluppate lenti a contatto in PET (polietilene tereftalato) per il rilevamento continuo del glucosio basate su un sensore a tre elettrodi in titanio, palladio, e platino. L'immobilizzazione della glucosio ossidasi è stata ottenuta attraverso un film depositato di ossido di titanio che fungeva anche da strato di passivazione per la superficie della lente a contatto. Le potenziali interferenze di urea, acido ascorbico e lattato sono state ridotte al minimo utilizzando la pellicola Nafion.

Il sensore ha mostrato un tempo di risposta rapido di 20 s e un rilevamento minimo inferiore a 0,01 mM. [38]

Più recentemente, un sensore di glucosio elettrochimico wireless con pixel di visualizzazione è stato incorporato in una lente a contatto morbida (Elastofilcon A) utilizzando nanostrutture trasparenti ed estensibili. Per proteggere questi dispositivi elettronici dalle deformazioni meccaniche della lente morbida, sono state progettate strutture ibride regolabili in base allo stress del substrato (con isole rinforzate meccanicamente e giunti elastici).

Per la prima volta, è stato introdotto un display nelle lenti a contatto intelligenti per eliminare la necessità di apparecchiature per misurazione aggiuntive e ingombranti, utilizzate per il rilevamento del segnale (Figura 10).

Le prestazioni della lente sono state comprovate, grazie ai test in vivo, per la concentrazione di glucosio nell'intervallo 0.1-0.9 mM. [39]



**Figura 10:** *Schema di funzionamento della lente a contatto con tecnologia wireless e display. L'energia elettrica viene trasmessa in modalità wireless all'obiettivo attraverso l'antenna. Questa potenza attiva il pixel LED e il sensore di glucosio. Dopo aver rilevato il livello di glucosio nel liquido lacrimale al di sopra della soglia, il pixel si spegne.* [39]

Dal 2017 sono stati introdotti sensori per lenti a contatto multifunzionali in grado di monitorare altri parametri fisiologici contemporaneamente alla variazione di glucosio. In particolare, biosensori altamente trasparenti ed estensibili sono stati integrati con lenti a contatto morbide per il rilevamento wireless del glucosio e della pressione intraoculare, simultaneamente, con l'esclusione d'interferenza tra i due parametri.

La svolta in questo studio è stata l'introduzione della struttura ibrida di nanomateriali 1D e 2D che ha aggiunto affidabilità, robustezza, flessibilità e trasparenza. [48]

Un altro sensore elettrochimico multifunzionale è stato sviluppato per il monitoraggio simultaneo del glucosio e della temperatura corneale utilizzando semiconduttori ultrasottili, elettrodi di interconnessione elastici, strati di passivazione in poliimmide (PI) e un substrato per lenti in polidimetilsilossano (PDMS). [49]

### 2.2.2 Sensori ottici

In generale, il funzionamento dei sensori ottici si basa sulla misurazione di una quantità fisica di luce e la sua successiva conversione in un segnale elettronico misurabile. Un sensore ottico è composto da una o più sorgenti luminose, un rilevatore e un trasduttore ottico che si occupa della suddetta conversione.

Nello specifico l'obiettivo dei metodi ottici applicati al monitoraggio glicemico è quello di misurare la risposta specifica delle onde elettromagnetiche, di diversa lunghezza d'onda, alla concentrazione di glucosio nell'organismo, per stimarne indirettamente il

livello nel sangue. Pertanto, si basano sulle proprietà ottiche intrinseche della molecola di glucosio oppure sulle proprietà ottiche dei diversi tessuti attraversati, influenzate dalla quantità di glucosio contenuta.

Quando la luce entra nel corpo, interagisce con gli atomi all'interno del tessuto e viene assorbita, trasmessa o diffusa; il tipo di interazione dipende dalla lunghezza d'onda della luce incidente, dalla struttura del tessuto e dalle proprietà ottiche del tessuto (come l'indice di rifrazione relativo, il coefficiente di assorbimento e il coefficiente di diffusione).

I metodi ottici comprendono tutte le tecniche sviluppate per lavorare nelle bande infrarossa e visibile dello spettro elettromagnetico; questo permette di affermare che le tecniche ottiche lavorano esclusivamente con radiazioni non ionizzanti, evitando effetti dannosi all'organismo. Inoltre, i metodi ottici non richiedono di entrare in contatto con qualsiasi fluido biologico, evitando così di dover danneggiare i tessuti per l'estrazione. Grazie a ciò, è possibile affermare che i metodi ottici sono a tutti gli effetti tecniche di monitoraggio non invasive. [42, 43]

#### 2.2.2.1 Sensori a fluorescenza (FRET)

Il fenomeno della fluorescenza si verifica quando una luce incidente, di una lunghezza d'onda compresa tra 200 e 800 nm, viene assorbita da una molecola o una struttura con proprietà fluorescenti, promuovendo un elettrone ad un livello energetico più elevato. Gli elettroni eccitati ritornano al loro stato fondamentale emettendo parte della luce assorbita in precedenza sottoforma di fluorescenza. L'energia residua viene invece dissipata sottoforma di calore o vibrazioni; per questo, la luce emessa ha un'energia inferiore rispetto a quella assorbita.

Le molecole fluorescenti o fluorofori<sup>10</sup> in stato di eccitazione possono rilassarsi, non solo tramite ri-emissione di calore o vibrazioni, ma anche trasferendo parte di energia ad un fluoroforo adiacente.

---

<sup>10</sup> Un fluoroforo è una molecola che assorbe energia di una lunghezza d'onda specifica e riemette energia a una lunghezza d'onda diversa.

Il processo di trasferimento energetico da una molecola donatrice ad una allo stato fondamentale è noto come Förster Resonance Energy Transfer (FRET).

La quantità di energia ceduta dipende dal grado di sovrapposizione spettrale tra il fluoroforo donatore e quello accettore e dall'interspazio tra gli stessi.

Il trasferimento di energia di risonanza di Förster è considerato un processo di soppressione della fluorescenza, in quanto la molecola accettore trattiene energia da un fluoroforo eccitato adiacente, limitandone la quantità di luce emessa.

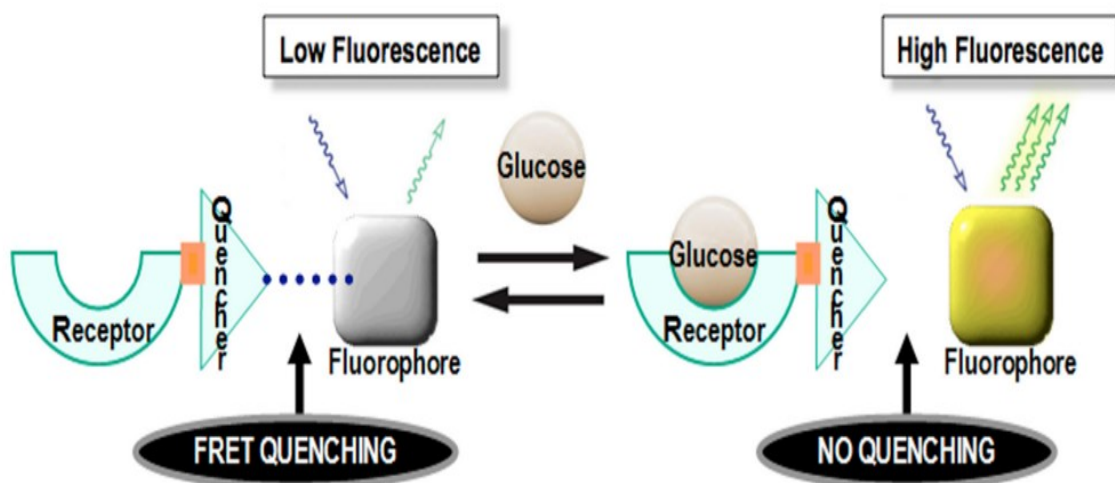
I sensori basati sulla fluorescenza sono sintetizzati da uno specifico recettore dell'analita (in questo caso del glucosio), un fluoroforo donatore e un fluoroforo accettore, che si trovano tutti nelle vicinanze l'uno dell'altro.

Quando si verifica il legame del glucosio al recettore, quest'ultimo subisce un cambiamento strutturale chimico, allontanando i fluorofori, da cui consegue una diminuzione del numero di elettroni trasferiti al fluoroforo accettore.

Il FRET, quindi, diminuisce, determinando un aumento della luce fluorescente emessa. Viceversa, in assenza di glucosio, i due fluorofori sviluppano maggiori interazioni steriche ed elettroniche tra di essi, che si traducono in un aumento del trasferimento di elettroni e una minore fluorescenza.

La concentrazione di glucosio può essere calcolata misurando l'aumento o la diminuzione della fluorescenza del fluoroforo donatore associato alla molecola del recettore del glucosio (Figura 11).

I sensori di glucosio che utilizzano la tecnica di fluorescenza con fluorofori possono essere classificati in base al tipo di recettore glicemico utilizzato, come enzimi, derivati dell'acido boronico o proteine leganti il glucosio (GBP), incluse la concanavalina A e la proteina legante glucosio/galattosio. [44]



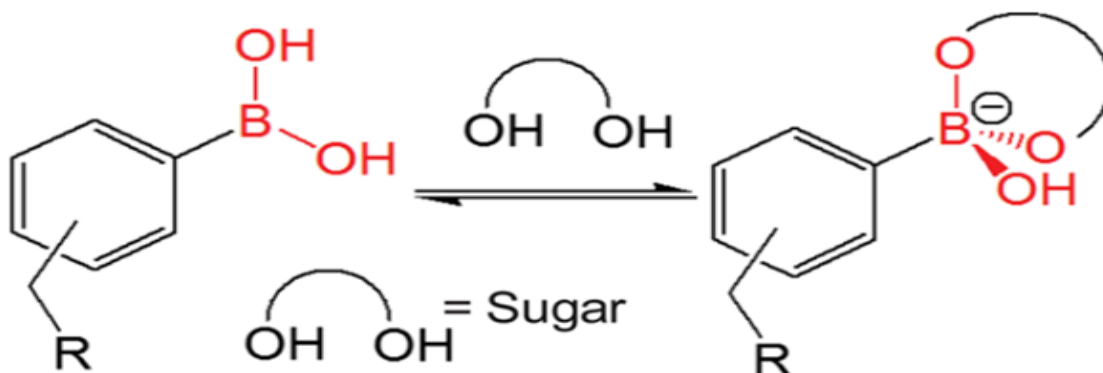
**Figura 11:** *Parte sinistra: il fluoroforo recettore mostra una bassa fluorescenza a causa dell'interazione (quenching) con un accettore (noto come quencher). Parte destra: una molecola di glucosio si lega in modo reversibile al recettore, il FRET viene quindi interrotto per la ridotta condivisione di elettroni tra i due gruppi interagenti causando la fluorescenza nel fluoroforo. [44]*

La prima lente a contatto integrata con sensore fluorescente per il monitoraggio lacrimale del glucosio è stata ideata nel 2003, e successivamente perfezionata, da un gruppo di ricercatori dell'Università del Maryland (USA). La tecnologia si basa sull'utilizzo di fluorofori contenenti acido boronico<sup>11</sup> (Figura 12), di cui è nota l'elevata affinità per i composti contenenti dioli come il glucosio, compatibili con il basso pH del liquido lacrimale, applicati a lenti a contatto monouso.

Tale progettazione permette una risposta efficiente alle concentrazioni di glucosio nell'intervallo lacrimale, tra 0,05mM e 0,5mM, con sensibilità alla variazione del 20%, che consentirebbe di identificare i fenomeni di iperglicemia caratterizzati da una variazione decisamente maggiore. [45, 46]

<sup>11</sup> Gli acidi boronici sono acidi deboli composti da un atomo di boro carente di elettroni e da due gruppi ossidrilici.





**Figura 12:** Schema semplificato del legame chimico tra l'acido boronico e uno zucchero [47]

Il problema maggiore nell'utilizzo di acidi boronici come recettori di glucosio è rappresentato dalla loro affinità con diversi zuccheri, che causano interferenze nella misurazione della glicemia.

Tuttavia, tale studio ha spianato la strada alla ricerca di sonde fluorescenti che utilizzano diversi agenti per il monitoraggio del glucosio lacrimale, grazie alla loro versatilità, sensibilità e selettività.

Recentemente, infatti, sono state sviluppate lenti a contatto "intelligenti" morbide e trasparenti ad elevata sensibilità, preparate immobilizzando una sonda sensibile al glucosio fluorescente e un colorante fluorescente di riferimento nella rete di idrogel delle lenti, per ottenere un'analisi raziometrica con evidenti cambiamenti di colore di facile quantificazione e alta precisione.

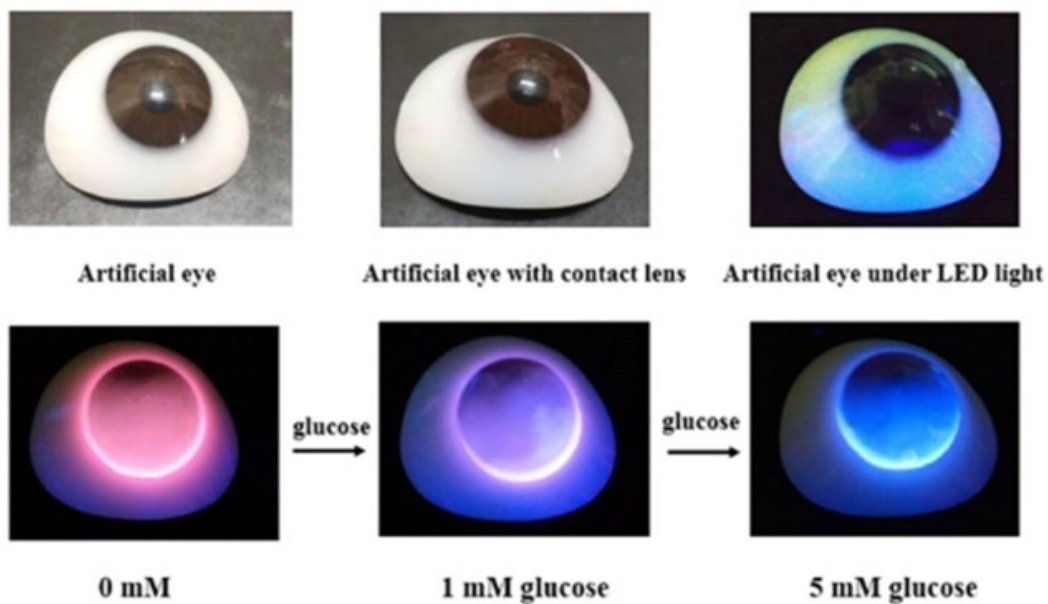
Le immagini fluorescenti potrebbero essere raccolte da uno smartphone, con l'illuminazione di una luce LED UV portatile, e trasformate in segnali RGB<sup>12</sup> per valutare i livelli di glucosio.

La sperimentazione animale è promettente: le lenti a contatto sono rimaste stabili nonostante i ripetuti movimenti oculari e della palpebra e non si sono osservati segni di lesioni o infiammazione, anche nel lungo periodo, il che indica che le lenti a contatto intelligenti possono essere indossate e utilizzate in sicurezza.

<sup>12</sup> RGB sta per "Red Green Blue" e indica il segnale video a colori.

Alla luce visibile, non emettevano luce, mantenendo quindi inalterata la visione dell'animale, mentre sotto irraggiamento con luce LED, le lenti a contatto mostravano un'emissione rosa (Figura 13).

È stata inoltre dimostrata l'affidabilità della variazione di colore dipendente dai livelli glicemici, grazie all'applicazione di lacrime artificiali contenenti glucosio. [48]



**Figura 13:** Foto di lenti a contatto con sensore a fluorescenza, applicate ad occhi artificiali, sotto l'azione di luce bianca e luce UV. Si può osservare come, in presenza di lacrime artificiali con diverse concentrazioni di glucosio, il colore passi dal rosa al blu con l'aumento di tale concentrazione. [48]

#### 2.2.2.2 Sensori a diffrazione (rilevamento su base fotonica)

Il cristallo fotonico (PC) è formato da strutture ordinate periodicamente e può essere classificato in unidimensionale, bidimensionale e tridimensionale in base al suo orientamento ottico. Quando una struttura PC è illuminata da luce bianca, tale luce verrà diffratta secondo la legge di Bragg:

$$m\lambda = 2nd \sin \theta$$

dove  $m$  è l'ordine di diffrazione,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce incidente,  $n$  è l'indice di rifrazione medio del sistema,  $d$  è la spaziatura del piano di diffrazione e  $\theta$  è l'angolo

compreso tra la direzione di propagazione della luce incidente e il piano di diffrazione. Qualsiasi meccanismo stimolante, come la reattività al glucosio, che modifica la spaziatura ( $d$ ) o l'indice di rifrazione medio ( $n$ ), genererà una variazione della lunghezza d'onda, provocando un cambiamento di colore della luce diffratta.

Gran parte dei sensori di glucosio fotonici sono basati su derivati dell'acido fenilboronico (PBA) che vengono utilizzati come agenti di riconoscimento del metabolita. I derivati PBA formano legami covalenti reversibili con molecole di diolo e acidi  $\alpha$ -idrossilici, come glucosio e lattato.

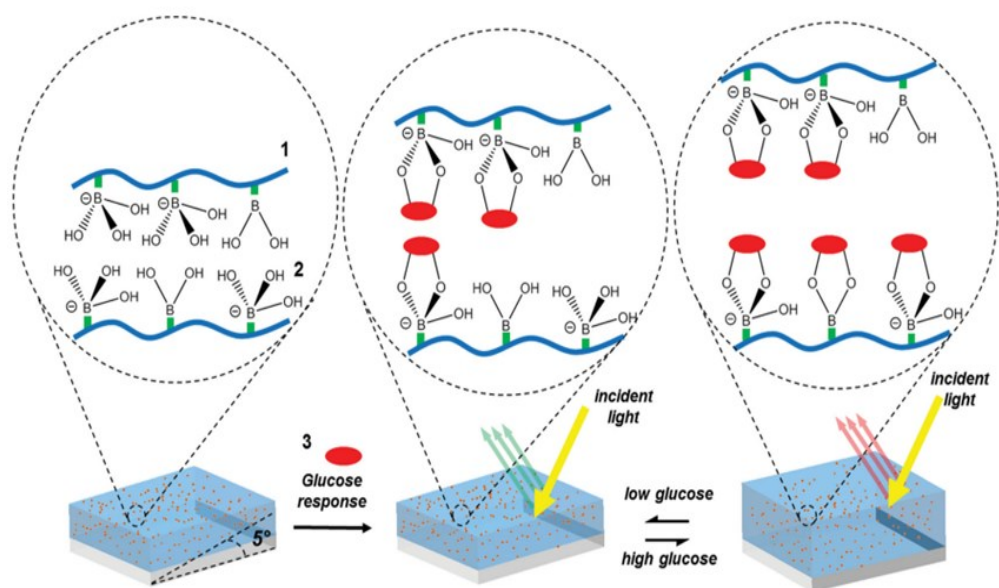
Gli studi hanno dimostrato che il PC unidimensionale (o reticolo olografico) può essere fabbricato in molte matrici di idrogel naturali e sintetiche e può essere funzionalizzato con i recettori appropriati per rilevare una varietà di analiti. [26, 49]

Nello specifico, per biosensori integrati a lenti a contatto, nel 2004, è stata studiata una matrice di idrogel costituita da acrilammide e acido 3- (acrilammido)fenilboronico (3-APB). Il film di idrogel è stato fotopolimerizzato e incorporato con bromuro d'argento insieme a un colorante per creare un film polimerico.

La pellicola olografica così ricavata è stata quindi incorporata in una lente a contatto dopo il trattamento con la formulazione per lenti in PVA.

Il risultato è stato una lente a contatto con reticoli di diffrazione olografici in grado di diffrangere la luce.

Quando il glucosio entra a contatto con l'idrogel, si lega ai gruppi cis-diolo del 3-APB, causando un'espansione reversibile della matrice e l'alterazione della spaziatura interparticellare, con una conseguente variazione di colore (Figura 14). [50]



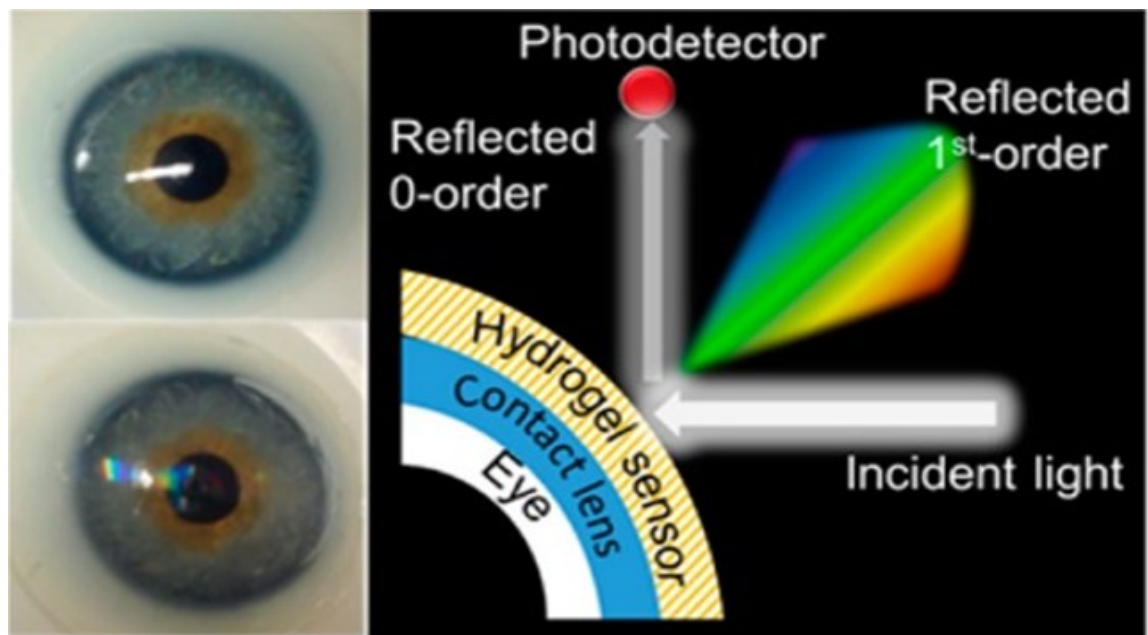
**Figura 14:** Caratterizzazione ottica e principio di funzionamento del sensore olografico. Sensore composto da idrogel (1) funzionalizzato con acido 3-(acrilamido)fenilboronico (3-APB) (2) per rilevare il glucosio bersaglio (3). Il rigonfiamento reversibile del nanosensore fotonico modula la spaziatura di distribuzione delle nanoparticelle e il contrasto dell'indice di rifrazione, spostando sistematicamente la luce diffratta da lunghezze d'onda più corte a più lunghe man mano che l'idrogel si espande nella direzione normale al substrato sottostante. [31]

Questo studio preliminare ha dimostrato che il biosensore a diffrazione era in grado di tracciare efficacemente i livelli di glucosio nel sangue attraverso l'analisi del liquido lacrimale.

Tuttavia, negli anni, sono state necessarie ulteriori ricerche per caratterizzare completamente il biosensore; la preoccupazione maggiore nell'uso di derivati dell'acido boronico con liquido lacrimale, è di minimizzare l'interazione con altri carboidrati o acidi ossidrilici, come il lattato che, con una concentrazione paragonabile al glucosio, può provocare interferenze con le misurazioni. [26, 50]

Recentemente, le strutture olografiche sono state utilizzate all'interno delle lenti a contatto per produrre un sistema di monitoraggio del glucosio a basso costo e riutilizzabile, semplificando il processo di fabbricazione e facilitando la lettura dei dati tramite l'utilizzo di uno smartphone.

Una microstruttura fotonica con una periodicità di  $1.6 \mu\text{m}$  è stata stampata su un film di idrogel selettivo per il glucosio, funzionalizzato con acido fenilboronico, ed è stata infine fissata ad una lente a contatto commerciale. È stato dimostrato che il sensore fabbricato ha un tempo di risposta di 3 s e un periodo di saturazione di 4 min, con un'elevata sensibilità per concentrazioni di glucosio fino a 50 mM (Figura 15). [51]



**Figura 15:** In alto a sinistra: immagine di una lente a contatto commerciale. In basso a sinistra: lente a contatto integrata con sensore fotonico di glucosio su un modello di occhio artificiale. A destra: schema del fenomeno di diffrazione della luce su biosensore. [51]

L'integrazione del sensore olografico con lenti a contatto offre una soluzione unica per il rilevamento dei biomarcatori: la versatilità della funzionalizzazione per la misurazione di analiti specifici, come ioni o proteine, può essere determinante nello sviluppo di biosensori per lenti a contatto.

Inoltre, l'uso di reticoli di diffrazione comporta la possibilità di modellare una varietà di materiali e lunghezze d'onda diffratte, dettando l'angolo di diffrazione. Oltre al PC unidimensionale, anche i PC bidimensionali (2D) e tridimensionali (3D) sono stati ampiamente sviluppati per scopi di biorilevamento, come nel caso degli array di cristalli colloidali (CCA), cioè PC 3D costituiti da particelle di dimensioni nanometriche ad alta carica, impilate in modo ordinato e immobilizzate all'interno di matrici

polimeriche. La costruzione prevede l'autoassemblaggio di tali particelle sfruttando l'evaporazione delle soluzioni colloidali. [26]

## **2.3 Analisi comparativa delle diverse categorie di biosensori**

### **2.3.1 Sensori elettrochimici**

I sensori a base elettrochimica offrono un'elevata sensibilità e la lettura rapida dei dati, proprietà che li rendono adatti all'integrazione a lenti a contatto per la diagnostica. Per la loro progettazione, vengono utilizzati materiali a basso costo, che favoriscono la possibilità di commercializzazione dei dispositivi. [26]

La tecnologia a base enzimatica permette la progettazione di sensori bioelettrici multifunzionali, in grado di monitorare diversi parametri fisiologici contemporaneamente.

Inoltre, la strategia di fabbricazione consente di incorporare altri componenti funzionanti, come array di elettrodi per elettroretinogrammi<sup>13</sup>, antenne per comunicazioni wireless e batterie o supercondensatori a film sottile. [34]

Tuttavia, i sensori elettrochimici si basano sull'uso enzimi, che sono instabili per natura e subiscono il degrado in breve tempo, limitando così l'utilizzabilità del sensore per lunghi periodi. Inoltre, le condizioni operative come l'ossigeno ambientale, il pH, la temperatura e l'umidità influiscono sulle prestazioni del sensore.

La sterilizzazione della lente a contatto, secondo le normative sanitarie, può portare alla denaturazione degli enzimi, a causa dell'interazione del perossido di idrogeno con componenti lacrimali, come l'acido ascorbico, che interferisce con la risposta del sensore.

Anche la microfabbricazione del sensore elettrochimico su substrati polimerici è una sfida a causa della necessità di una potenza applicata per guidare la reazione chimica e delle limitazioni delle proprietà termiche e meccaniche del materiale polimerico.

Gran parte dei sensori a base enzimatica sono realizzati con materiali elettronici opachi, antenne metalliche, interconnessioni e chip di circuiti integrati che possono bloccare la

---

<sup>13</sup> Esame oculistico eseguito per valutare la sensibilità della retina; consiste nella registrazione in un tracciato delle variazioni di potenziale elettrico della retina.

visione dell'utente e ridurre la permeabilità all'ossigeno. [34, 52]

### Sensori elettrochimici

VANTAGGI	SVANTAGGI
Elevata sensibilità e rapida lettura dati	Limitato tempo di utilizzo
Alta specificità	Prestazioni limitate dalle condizioni ambientali
Basso costo	Efficacia del sensore danneggiata dalla sterilizzazione
Possibile multifunzionalità del sensore	Complessa progettazione
Possibile integrazione di diversi componenti	Necessità di fonte energetica integrata alla lente
	Visone dell'utente non ottimale

**Tabella 3:** *Tabella riassuntiva di vantaggi (colonna a sinistra) e svantaggi (colonna a destra) dell'applicazione dei sensori elettrochimici alle lenti a contatto "smart".*

#### 2.3.2 Sensori ottici

I biosensori a base ottica, a diffrazione o a fluorescenza, risolvono alcune delle problematiche che si riscontrano nell'applicazione dei sensori elettrochimici: in primo luogo sono realizzati con materiali morbidi e trasparenti, ottimi per l'integrazione alle lenti a contatto "smart" che devono preservare una visione efficiente. Inoltre, la trasmissione del segnale ottico non ha bisogno di contatto, favorendo così la semplicità dell'utilizzo da parte del paziente, che può avvalersi di dispositivi mobili per il monitoraggio glicemico.

La tecnologia della gran parte dei sensori ottici si basa sull'uso di acido boronico che si lega specificatamente al glucosio, senza l'ausilio di enzimi, eliminando così gli inconvenienti legati al loro utilizzo, descritti nel paragrafo 2.3.1. [44, 52]

Tuttavia, la specificità dei sensori a base di acido boronico, non è equiparabile a quella dei sensori a base enzimatica, in quanto il lattato e altri saccaridi possono essere specie interferenti, a causa delle rispettive concentrazioni paragonabili a quelle del glucosio.

In particolare, una delle problematiche principali dei sistemi di rilevamento basati sulla fluorescenza è la scelta del fluoroforo specifico da utilizzare, il quale è necessario garantisca una stabilità fotochimica per lunghi periodi di tempo per il monitoraggio continuo; i fluorofori mostrano, infatti, una bassa stabilità chimica dovuta alla fotodegradazione delle specie ottiche.

Inoltre, gli agenti di riconoscimento molecolare basati sulla fluorescenza sono influenzati dalla concentrazione di ossigeno e dalla temperatura dell'ambiente.

Alcuni recettori di fluorescenza richiedono la presenza di solventi per funzionare, che possono essere difficili da integrare in una lente indossabile.

I sensori a diffrazione, invece, non richiedono coloranti o fluorofori per funzionare, eliminando il problema del fotosbiancamento. [26, 34]

I biosensori ottici necessitano dell'ausilio di una sorgente luminosa per attivarne il funzionamento, che dev'essere continuamente portata con sé dall'utente.

Sebbene i materiali utilizzati nella progettazione di sensori ottici possiedano caratteristiche di trasparenza ed elasticità perfettamente adattabili all'applicazione su lenti a contatto, il loro costo non è attualmente competitivo con i più economici sensori elettrochimici. [44]

### Sensori ottici

VANTAGGI	SVANTAGGI
Preservazione della vista ottimale	Bassa specificità
Utilizzo di dispositivi mobili facili da utilizzare	Prestazioni limitate dalle condizioni ambientali
Semplice progettazione	Fenomeno di fotosbiancamento (nel caso di sensori a fluorescenza)
Alta portabilità	Insufficiente stabilità chimica (nel caso di sensori a fluorescenza)
	Necessità di fonte di luce portatile

**Tabella 4:** Tabella riassuntiva di vantaggi (colonna a sinistra) e svantaggi (colonna a destra) dell'applicazione dei sensori ottici alle lenti a contatto "smart".



### 2.3.3 Confronto e sviluppi futuri

Oltre ad una sufficiente selettività, sensibilità e riproducibilità, i sensori per lenti a contatto devono anche essere dispositivi pratici per garantire la compliance del paziente. I materiali di rilevamento sintetici, come i derivati dell'acido boronico, richiedono miglioramenti nella selettività, mentre i materiali di rilevamento biologico, come gli enzimi, richiedono modifiche per ridurre al minimo l'usura. A questo proposito, si prevede lo sviluppo di nuovi materiali come il grafene, i punti quantici, cristalli liquidi e strutture fotoniche bioispirate.

Oltre ai progressi nelle attuali tecniche di fabbricazione, si pronostica lo studio di alternative come l'impilamento strato per strato, gli opali inversi, i copolimeri a blocchi, i nanocompositi e l'incorporazione della stampa 3D.

Il tempo di lettura dovrebbe essere ridotto al minimo, o almeno nell'ordine del minuto o poco più, al fine di poter essere utilizzato nel monitoraggio della glicemia in pazienti diabetici. I tentativi di diminuire questo ritardo hanno finora incluso lo sviluppo di materiali per mitigare i processi dipendenti dal tempo, come la diffusione e l'utilizzo di algoritmi matematici di compensazione.

Un fattore fondamentale per l'accettazione da parte del consumatore è l'usabilità, che in questo contesto comprende estetica, facilità e comodità di accensione/lettura, durata di conservazione, usura e pulizia. È ampiamente accettato che le lenti a contatto siano esteticamente più gradevoli rispetto alle tecnologie indossabili alternative grazie alla loro natura minimalista.

Vari studi hanno tentato di porre rimedio al problema della fornitura di energia ai sensori elettrochimici delle lenti a contatto tramite radiofrequenza wireless, induzione, energia solare o integrando celle a biocarburante che utilizzano componenti del liquido lacrimale per generare chimicamente energia.

Finora l'alimentazione dei sensori delle lenti a contatto in modalità wireless è stata ottenuta solo utilizzando radiazioni elettromagnetiche ad alta frequenza, che possono avere effetti negativi sulla salute. Pertanto, la prospettiva di utilizzare l'accoppiamento induttivo per alimentare il sensore sembrerebbe allettante. Tuttavia, la miniaturizzazione dei componenti è necessaria prima che possano essere integrati ad una lente a contatto.

Le celle a biocarburante sono una fonte di alimentazione alternativa e conveniente in quanto alimentano il sensore in situ, eliminando la necessità di un dispositivo di alimentazione esterno.

La connettività Bluetooth, che è una tecnologia ben consolidata, è un altro metodo promettente, attraverso il quale possono essere trasmessi i dati in modalità wireless a dispositivi di uso comune come smartphone, tablet e laptop. Tuttavia, i problemi di sicurezza e salute sono potenziali problematiche di questa tecnologia. Le vulnerabilità di sicurezza dei sistemi Bluetooth sono state esaminate e la manipolazione della lettura per il consumatore potrebbe rivelarsi dannosa; sebbene il Bluetooth abbia un debole raggio di trasmissione, rimane una controversia aperta sia nella scienza che nel pubblico sulle implicazioni del Bluetooth sulla salute umana.

Una tecnologia di rilevamento efficace dovrebbe essere combinata con una comprensione dello sviluppo clinico e delle normative, nonché della commercializzazione delle lenti a contatto per sviluppare un prodotto di successo. Il mercato delle lenti a contatto ha già stabilito norme e standard, esperienza che può essere sfruttata e applicata ai biosensori per lenti a contatto. Collaborazioni come quella citata precedentemente tra Novartis e Google, permettono di accelerarne l'ingresso nel mercato come prodotti di consumo. [26, 31]

## **Conclusioni**

Lo sviluppo della tecnologia dei sensori per lenti a contatto ha guadagnato terreno nell'ultimo decennio, in gran parte grazie ai progressi nella miniaturizzazione dei circuiti elettrici e all'identificazione di biomarcatori rilevanti nel liquido lacrimale. Questa applicazione di sensori presenta numerosi vantaggi, tra cui il monitoraggio continuo e non invasivo del glucosio. Inoltre, le lenti a contatto intelligenti attraggono i pazienti grazie alla familiarità del prodotto e alla facilità d'uso. Tuttavia, sono ancora in corso grandi miglioramenti per tali dispositivi, come specificità, sensibilità, biocompatibilità, integrazione con circuiti di lettura e riproducibilità per ottenere praticità. Una volta risolti questi problemi, è possibile che l'uso di biosensori per lenti a contatto possa portare ad un migliore trattamento medico personalizzato.



## Bibliografia

1. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>, pp. 2, 32, 55.
2. Brutsaert E. F., *Diabete mellito*, in “Manuale MSD”, New York Medical College, settembre 2022.
3. Brutsaert E. F., *Complicazioni del diabete mellito*, in “Manuale MSD”, New York Medical College, settembre 2022.
4. American Diabeter Association, *Diabetes Syntom*, <https://diabetes.org/diabetes/type-1/symptoms>].
5. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>, pp. 4.
6. Brutsaert E. F., *Trattamento farmacologico del diabete mellito*, in “Manuale MSD”, New York Medical College, settembre 2022.
7. Dr. Montesi L. *Glicemia: quali sono i valori normali*, in *diabete.com*, 25 Novembre 2021, <https://www.diabete.com/valori-di-riferimento-della-glicemia/>.
8. American Diabetes Association, *Standards of Medical Care in Diabetes—2020 Abridged for Primary Care Providers*, in “Diabetes Care”, 2020, available online: <https://doi.org/10.2337/cd20-as01>.
9. Benjamin E. M., *Self-Monitoring of Blood Glucose: The Basics*, “Clin Diabetes”, 1 January 2002; 20 (1): 45–47, online: <https://doi.org/10.2337/diaclin.20.1.45>.
10. Bruen D., Delaney C., Diamond D., Florea L., *Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments* in “Sensors 17”, no. 8, 2017, online: <https://doi.org/10.3390/s17081866>.
11. Lippi G., Montagnana M., *Automonitoraggio glicemico nei pazienti diabetici*, in “Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio”, 30 luglio 2013.
12. Battelino T., Dovic K., *Evolution of Diabetes Technology*, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, Volume 49, Issue 1, 2020, pp 1-18, <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.10.009>.

13. Heinemann L., *Finger pricking and pain: a never-ending story*, in “Journal of Diabetes Science and Technology, settembre 2008, online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769798/>.
14. Erbach M., Freckmann G., Heinemann L., Hinzmann R., Kulzer B., Schnell O., Ziegler R., *Interferences and Limitations in Blood Glucose Self-Testing: An Overview of the Current Knowledge*, in “Journal of Diabetes Science and Technology, vol. 10, 2016.
15. Coffey J. W., Corrie S. R., Islam J., Markey K. A., Kendall M. A. F., *Blood, sweat, and tears: developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis*, in “Analyst”, 7 luglio 2015.
16. DeHannis A., Mortellaro M., *CGM Sensor Technology*, in “*Glucose Monitoring Devices*”, section 2, chapter 6, 2020, pp. 111-134.
17. Dexcom.com
18. Ascensia.it
19. Laha S., Jadhav R., Rajput A., *A Concise and Systematic Review on Non-Invasive Glucose Monitoring for Potential Diabetes Management*, in “Biosensors”, novembre 2022.
20. Avner G., Karnit B., Keren H., Tamar L., Yulia M., *Non-Invasive Glucose Monitoring: A Review of Challenges and Recent Advances*, Current Trends in Biomedical Engineering and Biosciences, vol.6, issue 5, luglio 2017.
21. Abbosh A., Mobashsher A.T., Villena Gonzales W., *The Progress of Glucose Monitoring-A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors*, in “Sensors”, febbraio 2019.
22. Chen C., Flewitt A.J., Li Z.H., Qian S.H., Zhao X.L., Zhu Z.G., *Current and Emerging Technology for Continuous Glucose Monitoring*, in “Sensors”, vol.17, gennaio 2017.
23. EuromContact, EuromContact market data 2022 : *the number of contact lense*

- wearers continues to grow in Europe*, Bruxel, 25 aprile 2023, online: <https://euromcontact.org/publications/annual-statistics-reports/>.
24. Guo-Zhen Chen, Ion-Seng Chan, David C.C. Lam, *Capacitive contact lens sensor for continuous non-invasive intraocular pressure monitoring*, in “Sensors and Actuators A: Physical”, Volume 203, 2013, pag. 112-118.
  25. Moreddu R., Elsherif M., Butt H., Vigolo D., Yetisen A.K., *Contact lenses for continuous corneal temperature monitoring*, in “RSC Advances”, Vol. 9, Issue 20, 2019.
  26. Tseng R., Chen C.C., Hsu S.M., Chuang H.S., *Contact-lens biosensors*, in “Sensors”, 18, Agosto 2018, online: <https://www.mdpi.com/1424-8220/18/8/2651>
  27. Brigitta Bozzella, *Analisi del film lacrimale di un portatore di LAC mediante spettroscopia Raman*, Laurea triennale in Ottica e Optometria, Università degli studi di Napoli Federico II, 2019, pag.7-13.
  28. Filik J., Stone N., *Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy*, in “Analytica Chimica Acta”, Volume 616, Issue 2, 2008, pag. 177-184.
  29. Bertelli E., Borsello T., Campanella C., Conconi M.T., Di Liddo R., Rumio C., Sommariva M., *Principi di Anatomia Microscopica con cenni di Istologia e Anatomia Macroscopica*, 2018, Napoli, pag. 286-295.
  30. <https://www.attivazionibiologiche.info/dizionario/ghiandole-lacrimali.html>
  31. Farandos N. M., Yetisten A.K., Monteiro M.J., Lowe C.R., Hyun Yun S., *Contact Lens Sensors in Ocular Diagnostics*, in “Advanced Healthcare Materials”, Vol. a, Issue 6, 2014, pag. 792-810.
  32. Van Delft J., Meijer F., Van Best J., Van Haeringen N., *Permeability of blood-tear barrier to fluorescein and albumin after application of platelet-activating factor to the eye of the guinea*, in “Mediators of Inflammation”, 6, 1997, pag.381-383.
  33. Andoralov V., Shleev S., Arnebrant T., *Flexible micro(bio)sensors for quantitative analysis of bioanalytes in a nanovolume of human lachrymal liquid*, in “Analytical and Bioanalytical Chemistry”, 2013, pag.3871–3879.

34. Elsherif M., Moreddu R., Alam F., Salih A. E., Ahmed I., Butt H., *Wearable Smart Contact Lenses for Continual Glucose Monitoring: A Review*, review article in *Frontiers*, 04 aprile 2022.
35. Kim J., Kim M., Lee M.S., Kim K., Ji S., Kim Y.T., Park J., Na K., Bae K.H., Kyun Kim H., Bien F., Young Lee C., Park J.U., *Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics*, in “Nature Communications”, Aprile 2017.
36. Senior M., *Novartis signs up for Google smart lens*, in: “Nature Biotechnology” 32, 2014, online: <https://www.nature.com/articles/nbt0914-856>.
37. Lee H., Hong Y.J., Baik S., Hyeon T., Kim D.H., *Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device*, in “Advanced Healthcare Materials”, vol. 7, issue 8, 2018, online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201701150>.
38. Yao H., Shum A.J., Cowan M., Lähdesmäki I., Parviz B.A., *A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level*, in “Biosensor and Bioelectronics”, vol.26, issue 7, 2011.
39. Park J., Kim J., Kim S.Y., Cheong W.H., Jang J., Park Y.G., *Soft, smart contact lenses with integrations of wireless circuits, glucose sensors, and displays*, in “Science Advances”, vol.4, issue 1, 2018, online: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aap9841>.
40. Kim J., Kim M., Lee M.S., Ji S., Kim Y.T., Park J., Na K., Bae K.H., Kim H.K., Bien F., Lee C.Y., Park J.U., *Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics*, in “Nature Communications”, vol. 8, articolo 14997, 2017, online: <https://www.nature.com/articles/ncomms14997>.
41. Guo S., Wu K., Li C., Wang H., Sun Z., Xi D., *Integrated contact lens sensor system based on multifunctional ultrathin MoS2 transistors*, in “Matter”, vol. 4, issue 3, 2021, online: [https://www.cell.com/matter/fulltext/S2590-2385\(20\)306718-?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2590238520306718%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/matter/fulltext/S2590-2385(20)306718-?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2590238520306718%3Fshowall%3Dtrue)



42. Shokrehodaie M., Quinones S., *Review of Non-invasive Glucose Sensing Techniques: Optical, Electrical and Breath Acetone*, in “Sensors”, 2020.
43. Giupponi Alessandro, *Sensori ottici per il monitoraggio non invasivo della glicemia nella terapia del diabete di tipo 1*, Università degli studi di Padova, Corso di laurea in Ingegneria biomedica, 2022
44. Klonoff D.C., Overview of Fluorescence Glucose Sensing: *A technology with a bright future*, in “Journal of Diabetes Science and Technology”, Vol.6, Issue 6, novembre 2012, available online:  
<https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/193229681200600602>
45. Badugu R., Lakowicz J.R., Geddes C.D., *A glucose sensing contact lens: a non-invasive technique for continuous physiological glucose monitoring*, in “Journal of Fluorescence”, Vol.13, n°5, settembre 2003.
46. Badugu R., Lakowicz J.R., Geddes C.D., *Ophthalmic glucose sensing: a novel monosaccharide sensing disposable and colorless contact lens*, in “Analyst”, Issue 6, 2004.
47. Badugu R., Reece E.A., Lakowicz J.R., *Lenti a contatto in silicone idrogel sensibile al glucosio verso il monitoraggio del glucosio lacrimale*, in “Journal of Biomedical Optics”, Vol. 23, Issue 5, maggio 2018, online:  
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.5.057005>.
48. Mengyu Deng, Guangjie Song, Ke Zhong, Zhanchen Wang, Xi Xia, Yanqing Tian, *Wearable fluorescent contact lenses for monitoring glucose via a smartphone*, in “Sensors and Actuators B: Chemical”, Vol. 352, part 2, 2022, online:  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131067>.
49. Kabilan S., Marshall A.J., Sartain F.K., Lee M.C., Hussain A., Yang X., Blyth J., Karangu N., James K., Zeng J., Smith D., Domschke A., Lowe C.R., *Holographic glucose sensors*, in “Biosensors and Bioelectronics”, Vol. 20, Issue 8, 2005, pag. 1602-1610, online:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304003185?via%3Dihub>

50. Domschke A., Kabilan S., Anand R., Caines M., Fetter D., Griffith P., James K., Karangu N., Smith D., Vargas M., *Holographic sensors in contact lenses for minimally-invasive glucose measurements*, in “Proceedings of the IEEE Sensors”, Vienna, Austria, 2004, pag. 1320–1323.
51. Elsherif M., Hassan M.U., Yetisen A.K., Butt H., *Wearable Contact Lens Biosensors for Continuous Glucose Monitoring Using Smartphones*, in “ACS Nano”, Vol.12, Issue 6, 2018, pag. 5067-6344, online: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b00829#>
52. Deng M., Song G., Zhong K., Wang Z., Xia X., Tian Y., *Wearable fluorescent contact lenses for monitoring glucose via a smartphone*, in “Sensors and Actuators B: Chemical”, vol. 352, parte 2, 2022 online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540052101635X?via%3Dihub>.