UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAURE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

"SENSORI OTTICI PER IL MONITORAGGIO NON INVASIVO DELLA GLICEMIA NELLA TERAPIA DEL DIABETE DI TIPO 1"

Relatore: Prof. Andrea Facchinetti

Laureando: Alessandro Giupponi

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Data di laurea 20 settembre 2022

RINGRAZIAMENTI

Prima di procedere con la trattazione, desidero spendere alcune parole per ringraziare le persone che mi sono state accanto e che mi hanno sostenuto durante questo percorso universitario.

Vorrei innanzitutto dedicare un ringraziamento speciale ai miei genitori che mi hanno sempre sostenuto ed aiutato in questi tre anni, condividendo con me soddisfazioni e difficoltà, ma sempre pronti a incoraggiarmi ad andare avanti. Spero di avervi reso ancor più orgogliosi di me e vi sono grato per tutto ciò che avete fatto.

Ringrazio i miei familiari che mi hanno supportato e che mi hanno sempre dimostrato vicinanza, interessandosi fin dal primo giorno al mio percorso e ai miei risultati e sapendomi consigliare nei momenti di necessità.

Un grazie molto sentito va anche ai miei amici che sono sempre stati presenti, disponibili e pronti ad aiutarmi e a consigliarmi nel momento del bisogno, oltre ad avermi permesso di vivere momenti di gioia grazie ai quali ho potuto superare anche le giornate più difficili. Spero di poter essere per voi anche solo una parte di ciò che siete per me.

Ringrazio il mio relatore, il professor Andrea Facchinetti, per avermi dimostrato immensa diponibilità e pazienza e per i consigli e le indicazioni che mi ha fornito, indispensabili ai fini della realizzazione della tesi.

Infine, desidero dedicare alcune parole al ricordo dei miei nonni, Anna e Aldo, che sono sempre stati fieri ed orgogliosi di me e dei miei risultati. La felicità che dimostravano ogni volta che raccontavo del mio percorso di studi mi ha dato la forza di superare tutte le difficoltà e mi ha permesso di sentirne la vicinanza nonostante non possano essere stati accanto a me a festeggiare i miei traguardi.

SOMMARIO

Il diabete è una malattia cronica che colpisce il metabolismo del glucosio, dovuta da una mancanza di produzione di insulina da parte del pancreas (tipo 1) o un'inabilità nella sua utilizzazione (tipo 2) che comporta in generale alterati livelli di concentrazione del glucosio nel sangue. Negli ultimi anni l'incidenza del diabete a livello globale è aumentata sensibilmente. Al giorno d'oggi, secondo le stime della International Diabetes Federation, quasi mezzo miliardo di persone ne soffre, e si prevede che il numero cresca fino a 700 milioni entro il 2045.

Il controllo e la gestione del diabete, necessari data la mancanza di una cura definitiva, richiedono in molti casi un monitoraggio frequente e accurato della glicemia. I metodi tradizionali di automonitoraggio della glicemia prevedono il prelievo di gocce di sangue, risultando dolorosi e scomodi. Pertanto, negli ultimi anni si sono studiate e sviluppate tecniche di automonitoraggio minimamente invasive e non invasive, che permettono di superare tali limitazioni. Fra queste, molto promettenti sono i metodi ottici, che prevedono l'utilizzo di diverse radiazioni elettromagnetiche per stimare la concentrazione di glucosio nel sangue.

In tale elaborato verranno descritte alcune tecniche ottiche per il monitoraggio non invasivo e le loro applicazioni pratiche alla realizzazione di sensori. In particolare, di tali metodi si valuteranno i principi fisici che li caratterizzano, le loro applicazioni al monitoraggio della glicemia e i problemi più frequenti che si riscontrano nella misura.

INDICE

Capitolo 1 – Diabete e metodi di monitoraggio della glicemia 4

1.1. Fisiopatologia del diabete di tipo 1 4

1.2. Terapia e gestione dei pazienti diabetici 5

1.3. Monitoraggio della glicemia 5

1.3.1. Metodi invasivi per il monitoraggio 5

1.3.2. Metodi non invasivi per il monitoraggio 6

1.3.3. Metodi ottici per il monitoraggio 7

Capitolo 2 – Spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) e nel medio infrarosso (MIR) 9

2.1. Spettroscopia NIR: applicazione al monitoraggio 9

2.2. Spettroscopia MIR: applicazione al monitoraggio 13

2.3. Problematiche nell'applicazione pratica della spettroscopia NIR e MIR 15

2.3.1. Assorbimento da parte dell'acqua 15

2.3.2. Assorbimento da parte dei costituenti del sangue 17

2.3.3. Diffusione della luce 18

2.3.4. Variazione di temperatura nei tessuti 21

Capitolo 3 – Spettroscopia Raman 22

3.1. Principi fisici e applicazione al monitoraggio 22

3.2. Problematiche nell'applicazione pratica della spettroscopia Raman 25

3.2.1. Interferenza dell'acqua e degli emocomponenti 25

3.2.2. Segnale di fluorescenza delle proteine 27

3.2.3. Debole intensità dei segnali Raman 28

Capitolo 4 – Spettroscopia fluorescente 32

4.1. Principi fisici e applicazione al monitoraggio 32

4.2. Materiali fluorofori per il rilevamento del glucosio 35

Conclusioni 38

Bibliografia 39

CAPITOLO 1:

DIABETE E METODI DI MONITORAGGIO DELLA GLICEMIA

1.1. Fisiopatologia del diabete di tipo 1

Il diabete è una malattia cronica, caratterizzata da livelli di glucosio nel sangue che fuoriescono dal range fisiologico per un tempo eccessivo, causando iperglicemia. La glicemia del corpo umano è regolata mediante due ormoni: l'insulina, che permette di abbassare i livelli di glucosio, e il glucagone, che di contro stimola il rilascio di glucosio nel circolo. Le cause scatenanti del diabete sono un'inadeguata produzione dell'ormone insulina da parte del soggetto (diabete di tipo 1) o un'incapacità di utilizzo corretto dell'ormone stesso da parte delle cellule (diabete di tipo 2).

L'ormone insulina, prodotto dalle cellule beta del pancreas, è deputato al controllo dei livelli di glicemia. Consente infatti alle cellule di assorbire glucosio dal flusso ematico, ai fini di ottenere energia per il metabolismo cellulare o immagazzinarlo per un uso futuro. Qualora questo processo risulti alterato, il glucosio si comincia ad accumulare nel circolo sanguigno, portando, nel lungo termine, a gravi complicanze per lo stato di salute dell'individuo, che possono culminare nel decesso. Pertanto, è estremamente importante il controllo dei livelli di glucosio per la gestione del diabete, che in un soggetto sano a digiuno da otto ore ci si aspetta rientrino fra i 70 e i 110 mg/dL.

Esistono diverse forme in cui il diabete può essere classificato: diabete di tipo 1 (T1D), diabete di tipo 2 (T2D), diabete gestazionale dovuto alla gravidanza e altri tipi di diabete, ad esempio indotti da farmaci o dovuti a patologie del pancreas esocrino.

Nel diabete di tipo 1, le cellule beta delle isole di Langerhans del pancreas vengono distrutte a seguito di una risposta autoimmune. Si osserva infatti che oltre il 90% delle persone affette da diabete di tipo 1 presentano nel sangue anticorpi diretti contro specifiche proteine delle cellule stesse. La mancanza di cellule beta non consente la rilevazione del glucosio nel sangue, e di conseguenza l'insulina non viene rilascia nel flusso ematico. Pertanto, viene anche meno la capacità delle cellule di assorbire glucosio, facendo salire la glicemia a livelli pericolosi.

Dal punto di vista epidemiologico, il diabete di tipo 1 colpisce circa il 10% dei soggetti affetti da diabete ed ha una forte incidenza in età inferiori ai 20 anni. Inoltre, a livello globale l'incidenza e la prevalenza del diabete di tipo 1 sono in aumento, con tassi annuali del 2-3%. È quindi comprensibile come la ricerca di tecniche sempre più efficaci per la gestione del diabete sia importante e necessaria per garantire ai soggetti affetti delle condizioni di vita migliori.

I bambini con T1D presentano comunemente, come sintomi di esordio della patologia, una rapida perdita di peso, poliuria (anormale produzione di urina) e polidipsia (stato di sete intensa). L'insorgenza è invece più variabile negli adulti, che potrebbero non presentare sintomi come quelli osservati a livello infantile. Ciononostante, è possibile diagnosticare il diabete di tipo 1 qualora si osservi una concentrazione di glucosio nel sangue a digiuno superiore a 126 mg/dL o una concentrazione casuale di glucosio nel sangue superiore a 200 mg/dL, con presenza di sintomi quali quelli sopracitati.

1.2. Terapia e gestione dei pazienti diabetici

Per i soggetti affetti da T1D è molto importante che i livelli di glicemia rimangano all'interno del range fisiologico, per evitare complicanze a lungo termine causate dall'iperglicemia. Siccome ad oggi non esiste una cura definitiva al diabete, solo un frequente e accurato monitoraggio della glicemia consente di intervenire quando necessario, per evitare gravi danni allo stato di salute del paziente. Tramite le rilevazioni è infatti possibile agire con iniezioni esogene di insulina, che consentono di favorire l'ingresso del glucosio sanguigno nelle cellule, abbassando i valori di glicemia. Per questo motivo il diabete di tipo 1 è spesso definito anche come diabete insulino-dipendente.

Il principale effetto collaterale delle iniezioni insuliniche è la possibile insorgenza di episodi ipoglicemici. Un eccesso di insulina iniettata porta la concentrazione di glucosio nel sangue sotto la soglia minima dei 70 mg/dL, causando ipoglicemia. A differenza degli eventi iperglicemici, quelli ipoglicemici causano gravi danni a breve termine e possono portare a coma o addirittura alla morte, in quanto il glucosio è fonte energetica primaria per il cervello. Da qui la necessità che la misura rilevata su cui si basa l'iniezione di insulina sia estremamente accurata, in modo da poter calcolare la giusta dose da iniettare. Questo consente di evitare sia l'insorgenza di complicanze a breve termine dovute a episodi ipoglicemici che i danni a lungo termine causati da eventi iperglicemici.

I metodi di gestione del diabete di tipo 1, grazie alla costante ricerca, continuano a migliorare nel tempo. Sebbene l'insulina rimanga il fulcro della terapia contro il T1D, si sono sviluppati nuovi analoghi dell'ormone, con esordi e durate d'azione variabili. L'insulina può essere assunta per iniezione oppure con una pompa insulinica. L'avvento di dispositivi di monitoraggio continuo del glucosio ad uso domiciliare, con l'implementazione di tecniche sempre meno invasive, ha permesso un notevole sviluppo nella terapia del diabete di tipo 1. Incorporando i dispositivi CGM in sistemi ibridi a pompa insulinica a circuito chiuso è possibile la regolazione automatica della velocità di infusione basale sulla base della misura continua ottenuta, osservando notevoli miglioramenti nella variabilità del glucosio e nel controllo glicemico. Inoltre, quest'uso combinato delle due tecnologie apre le porte allo sviluppo di un pancreas artificiale che minimizzi i comandi necessari da parte dell'utente.

1.3. Monitoraggio della glicemia

Come sopracitato, la mancanza di una cura definitiva rende necessario il monitoraggio della glicemia per la gestione del diabete di tipo 1. È estremamente importante che la misura ottenuta sia corretta, in modo da poter intervenire in modo accurato con la terapia. Questo rende il monitoraggio soggetto di costante ricerca, volta non solo a migliorare la qualità della rilevazione ma anche a rendere la pratica meno impattante sullo stato di salute dell'individuo. Sulla base di ciò è possibile classificare le tecniche di monitoraggio della glicemia come: invasive, minimamente invasive e non invasive.

1.3.1. Metodi invasivi per il monitoraggio

Sfortunatamente, il monitoraggio della glicemia è spesso poco piacevole. I dispositivi convenzionali di automonitoraggio (in inglese, self-monitoring blood glucose SMBG) si basano su un metodo elettrochimico invasivo per il rilevamento della concentrazione di glucosio, che richiede il prelievo di una piccola quantità di sangue mediante una puntura al dito. Questi metodi garantiscono un'elevata precisione della misura ma rendono il monitoraggio un processo doloroso, scomodo e che comporta un certo rischio di infezione, soprattutto se il paziente richiede un controllo frequente e più volte al giorno. Come

dimostrano i dati, questo disincentiva il paziente a effettuare le misurazioni previste dalle linee guida sanitarie, con gravi complicazioni del diabete a causa della mancata iniezione per tempo dell'insulina. Inoltre, le tecniche di automonitoraggio della glicemia convenzionali si basano sull'utilizzo di strisce di carta per il raccoglimento del sangue. Sia l'ago che la carta di prova sono usa e getta. Pertanto, misurazioni molto frequenti possono comportare una spesa economica non indifferente per famiglie nei paesi o nelle regioni sottosviluppate.

Figura 1.1: esempio di dispositivo invasivo di automonitoraggio

Tutti questi motivi hanno spinto la ricerca verso la produzione di sensori minimamente invasivi e non invasivi, che siano più economici e meno impattanti sullo stato di salute dell'individuo.

1.3.2. Metodi non invasivi per il monitoraggio

Le tecnologie di monitoraggio non invasivo della glicemia si presuppongono di rilevare la concentrazione di glucosio nel sangue senza causare danni ai tessuti umani. Esistono molte tecniche che sono state sviluppate nel corso degli anni, e possono essere suddivise in metodi ottici, metodi elettrochimici e metodi a microonde.

Oltre che nel sangue, si possono osservare notevoli quantità di glucosio anche in altri biofluidi, come la saliva, le lacrime, il sudore o l'urina. Le concentrazioni di glucosio qui presenti sono correlate con il livello di glicemia, rendendo spesso possibile lo sviluppo di tecniche di monitoraggio non invasive, soprattutto per quanto riguarda i metodi elettrochimici. Quest'ultimi misurano la concentrazione di glucosio nei fluidi corporei e ottengono indirettamente il valore della glicemia.

Nonostante siano tecniche molto promettenti, sono pochi i dispositivi commerciali che si basano su metodi non invasivi. Infatti, ci sono ancora moltissime sfide che devono essere affrontate e superate per poter garantire una misura non invasiva sensibile e affidabile come quella ottenibile con i dispositivi convenzionali.

Un esempio notevole di riuscita applicazione è rappresentato dai sensori per il monitoraggio in continua del glucosio (in inglese, continous glucose monitoring CGM), dispositivi minimamente invasivi, o addirittura non invasivi, capaci di rilevare i valori della glicemia quasi in continua per molti giorni consecutivi. Con questi strumenti è possibile monitorare tutte le fluttuazioni della concentrazione di glucosio nell'intervallo di tempo in cui sono impiegati e, quindi, ottenere informazioni relative alla posizione temporale e alla frequenza degli eventi ipoglicemici e iperglicemici. Pertanto, i dispositivi CGM hanno permesso di rivoluzionare il monitoraggio della glicemia, migliorando la qualità di vita del paziente e riducendo il rischio di complicanze. Ciononostante, questo tipo di tecnologia viene utilizzato

solamente da una piccola percentuale (circa il 10%) dei soggetti affetti da diabete di tipo 1. Fra i principali svantaggi che ne limitano l'applicabilità vi sono gli elevati costi e la minor sensibilità e affidabilità rispetto ai dispositivi convenzionali.

I dispositivi CGM sono costituiti da tre parti: un ricevitore wireless, un trasmettitore e un sensore. Il ricevitore ha il compito di visualizzare, tramite un monitor di cui è dotato, la misurazione compiuta dal sensore, mentre il trasmettitore permette il passaggio delle informazioni rilevate fra le due componenti tramite onde a radiofrequenza. Il sensore, invece, può variare in base alla tecnica utilizzata per la realizzazione dello strumento. Nonostante siano stati studiati diversi metodi fra quelli sopracitati, la maggior parte dei dispositivi attualmente in commercio si basano su un metodo elettrochimico. In tal caso, il sensore è dato da un ago minimamente invasivo inserito nel tessuto sottocutaneo, che si estende abbastanza in profondità da entrare in contatto con il liquido interstiziale (abbreviato spesso in ISF). In questo modo, grazie all'enzima glucosio ossidasi (comunemente abbreviato in GOx), è possibile catalizzare la reazione di ossidazione del glucosio qui presente, ottenendo un segnale di corrente elettrica misurabile. Quest'ultimo risulta proporzionale alla concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale, permettendo così di risalire ai livelli di glicemia a seguito di un'opportuna elaborazione. Infatti, bisogna considerare il ritardo di qualche minuto presente nei dati, dovuto al passaggio del metabolita dal flusso ematico al fluido in analisi.

Figura 1.2: esempio di dispositivo di monitoraggio continuo del glucosio

1.3.3. Metodi ottici per il monitoraggio

Fra le diverse classi di tecniche non invasive per il monitoraggio del glucosio, i metodi ottici si distinguono per la miglior qualità della misura. Le diverse tecnologie ottiche che possono essere adottate hanno infatti una grande selettività per il rilevamento del glucosio e il tessuto mirato è meno sottoposto ad irritazione.

L'obiettivo dei metodi ottici è stimare indirettamente il livello di glucosio nel sangue attraverso la risposta specifica di onde elettromagnetiche, con diversa lunghezza d'onda, alla concentrazione di glucosio nell'organismo. Pertanto, si basano sulle proprietà ottiche intrinseche del glucosio oppure sulle proprietà ottiche dei diversi tessuti attraversati, influenzate dalla quantità di glucosio contenuta.

I metodi ottici comprendono tutte le tecniche sviluppate per lavorare nelle bande infrarossa e visibile dello spettro elettromagnetico, poiché sfruttano riflessione, assorbimento e diffusione della luce quando attraversa i diversi mezzi biologici, ai fini di stimare la concentrazione di glucosio. Questo permette di affermare che le tecniche ottiche lavorino

esclusivamente con radiazioni non ionizzanti, garantendo di evitare effetti dannosi all'organismo. Inoltre, basandosi su fenomeni fisici come quelli sopracitati, i metodi ottici non richiedono di entrare in contatto con qualsiasi fluido biologico, evitando così di dover danneggiare i tessuti per l'estrazione. Pertanto, è possibile affermare che i metodi ottici sono a tutti gli effetti tecniche di monitoraggio non invasive.

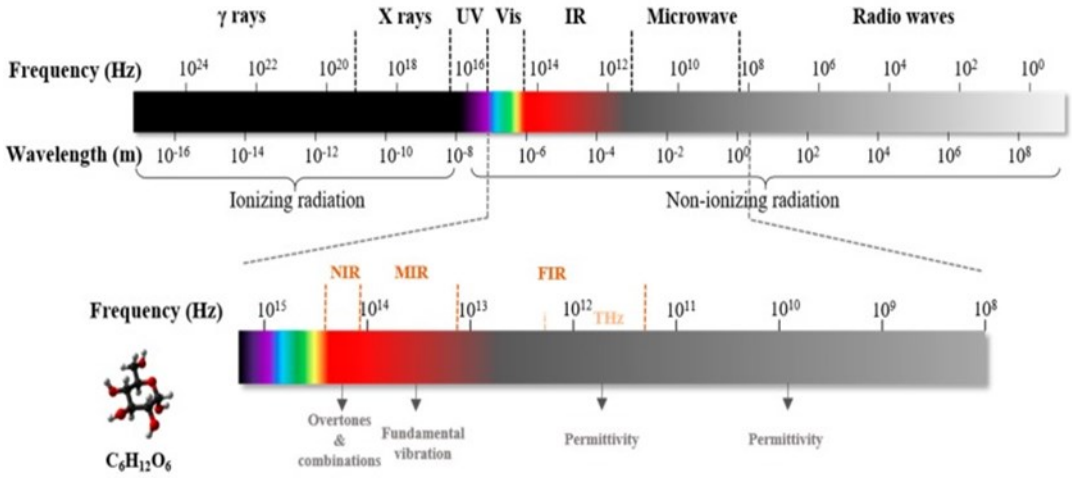

Figura 1.3: diagramma dello spettro elettromagnetico e la sua rilevanza per il glucosio

Infine, i sensori ottici per le misure di concentrazione del glucosio sono tipicamente composti di una sorgente per la radiazione luminosa utilizzata, un rilevatore e un trasduttore ottico. In base alla banda dello spettro elettromagnetico utilizzata, alcune delle tecniche ottiche possono essere implementate in riflessione o trasmissione. Questo influenza la disposizione del rilevatore rispetto alla sorgente e al campione in esame. Qualora si sfrutti una configurazione a riflessione si troverà dallo stesso lato della sorgente rispetto al campione, altrimenti si posizionerà dal lato opposto. Il trasduttore ottico ha invece il compito di convertire la radiazione luminosa rilevata in un segnale elettrico, sulla base del quale è poi possibile risalire alla misura di interesse. Eventualmente possono essere presenti anche lenti o filtri, il cui scopo è il miglioramento della qualità della misura

CAPITOLO 2:

SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIR) E NEL MEDIO INFRAROSSO (MIR)

Le tecniche di spettroscopia nel vicino infrarosso (detta anche spettroscopia NIR, dall'inglese near-infrared) e nel medio infrarosso (spesso identificata come spettroscopia MIR, dall'inglese mid-infrared) si basano sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche, appartenenti a opportune bande dello spettro, da parte dei tessuti umani.

Il fenomeno di assorbimento è fortemente influenzato dalla lunghezza d'onda della luce incidente. Infatti, la luce ultravioletta può essere facilmente assorbita dalle proteine e dal DNA, la luce infrarossa dall'acqua mentre la radiazione nella banda visibile dall'emoglobina. Pertanto, nessuna di queste lunghezze d'onda può arrivare in profondità nei tessuti con elevata intensità, non consentendo di ottenere informazioni utili dai dati sperimentali. Tuttavia, utilizzando radiazioni nel vicino infrarosso e nel medio infrarosso, si osservano degli spettri di rilevamento ideali per il monitoraggio della glicemia.

2.1. Spettroscopia NIR: applicazione al monitoraggio

La spettroscopia NIR è una tecnica di misurazione utilizzata per ottenere dati quantitativi su un campione di tessuto biologico e sui suoi costituenti, in base agli spettri di assorbimento rilevati. Si basa sull'utilizzo di radiazioni luminose appartenenti all'intervallo di lunghezza d'onda fra i 750 nm e i 2500 nm, in cui la luce può penetrare nella pelle fino ad oltre 0,5 mm con basso contenuto energetico (quindi meno pericolosa). Infatti, sebbene il glucosio non presenti un forte assorbimento nella banda NIR rispetto ad altre regioni dello spettro, anche l'acqua non assorbe molta radiazione. Di conseguenza, fino al 95% della luce può passare attraverso lo strato corneo e l'epidermide, raggiungendo le regioni sottostanti a maggior concentrazione ematica. Per questo motivo le misure ottenute sono più selettive per i livelli di glucosio nel sangue e la spettroscopia NIR può essere implementata sia in configurazione di riflessione che di trasmissione.

La spettroscopia nel vicino infrarosso appartiene al campo della spettroscopia vibrazionale molecolare. Infatti, l'interazione del bersaglio con la radiazione elettromagnetica prodotta, ad un'opportuna lunghezza d'onda, permette di sondare i gradi di libertà vibrazionali, ovvero interni, delle molecole costituenti, e ricavare così informazioni quantitative e qualitative sul tessuto colpito. Tali gradi di libertà (comunemente abbreviati in DOF, dall'inglese degree of freedom) corrispondono a variazioni oscillanti nelle lunghezze e negli angoli dei legami interni alle molecole, o in altre parole a vibrazioni di allungamento e deformazione. Affinché si possano osservare delle oscillazioni molecolari è necessario che la radiazione elettromagnetica incidente abbia una lunghezza d'onda opportuna, corrispondente alla frequenza fondamentale della vibrazione. In tal caso si verifica un fenomeno di assorbimento da parte della molecola, che passa da uno stato vibrazionale iniziale ad uno stato vibrazionale eccitato, causando la comparsa di una banda di assorbimento nello spettro registrato. Pertanto, note le frequenze fondamentali delle oscillazioni, è possibile discriminare le molecole costituenti e le loro concentrazioni sulla base dello spettro d'assorbimento.

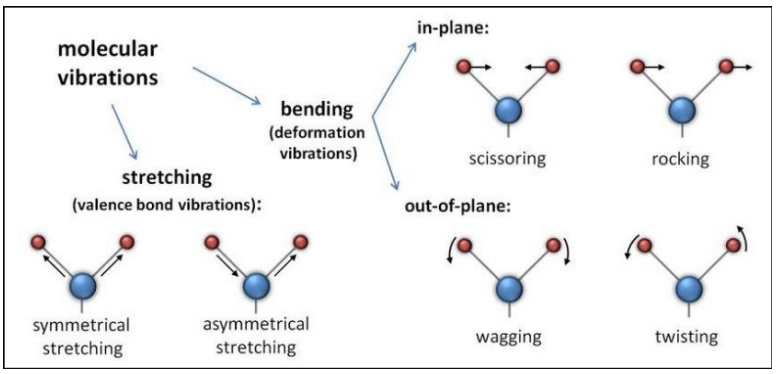

Figura 2.1: schema dei modi vibrazionali di una molecola

L'applicazione al monitoraggio della glicemia si basa sulla presenza di legami specifici, quali C-H, O-H e C=O, nella molecola di glucosio. Questi aumentano l'assorbimento della luce nel vicino infrarosso da parte del sangue, che presenta dei picchi a lunghezze d'onda specifiche, secondo quando discusso precedentemente. Matematicamente, la legge di Lambert-Beer viene utilizzata per descrivere il fenomeno di assorbimento, e consente il calcolo dell'assorbanza, da cui è possibile risalire alla concentrazione di glucosio. La legge afferma che:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\varepsilon(\lambda)\cdot c\cdot x}$$

dove $I(x)$ è l'intensità luminosa a profondità x all'interno del mezzo di assorbimento, I_0 è l'intensità luminosa iniziale, x è la profondità di assorbimento all'interno del mezzo, $\varepsilon(\lambda)$ è il coefficiente di attenuazione molare, che dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente e dalla struttura della molecola assorbente, e c è la concentrazione della molecola assorbente. Talvolta viene riassunto il prodotto di ε e c in un unico termine, dato dal coefficiente di assorbimento μ.

Tale legge mostra l'intensità della luce riflessa o trasmessa in funzione dello spessore di campione attraversato, della concentrazione della molecola assorbente e del suo coefficiente di attenuazione, nelle ipotesi che l'effetto della diffusione sia trascurabile rispetto all'assorbimento. Di maggior interesse al fine pratico è l'assorbanza, definita come:

$$A = log\left(\frac{I_0}{I(x)}\right) = \varepsilon(\lambda)\cdot c\cdot x$$

Si può osservare come note l'intensità iniziale e finale della radiazione sia molto rapido calcolare l'assorbanza. Quest'ultima è inoltre direttamente proporzionale alla concentrazione della molecola assorbente di interesse. Pertanto, risulta essere la grandezza fondamentale nel monitoraggio della glicemia, in quanto consente di ricavare facilmente la concentrazione di glucosio nel bersaglio colpito dalla radiazione. Nell'applicazione pratica, come si vedrà meglio nel seguito, l'assorbanza risulta affetta da interferenze dovute all'assorbimento dell'acqua e di altre molecole assorbenti presenti nel flusso ematico. Quindi, la misura diretta della concentrazione dall'assorbanza sarà meno immediata e richiederà di alcune accortezze, volte a eliminare il contributo indesiderato. Infatti, molecole diverse presentano un picco di assorbanza all'interno di uno specifico intervallo di lunghezza d'onda, a causa della dipendenza del coefficiente di attenuazione molare dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata. Questo fattore gioca un ruolo fondamentale nelle tecniche di elaborazione utilizzate per la rimozione dei contributi dovuti a molecole diverse dal glucosio.

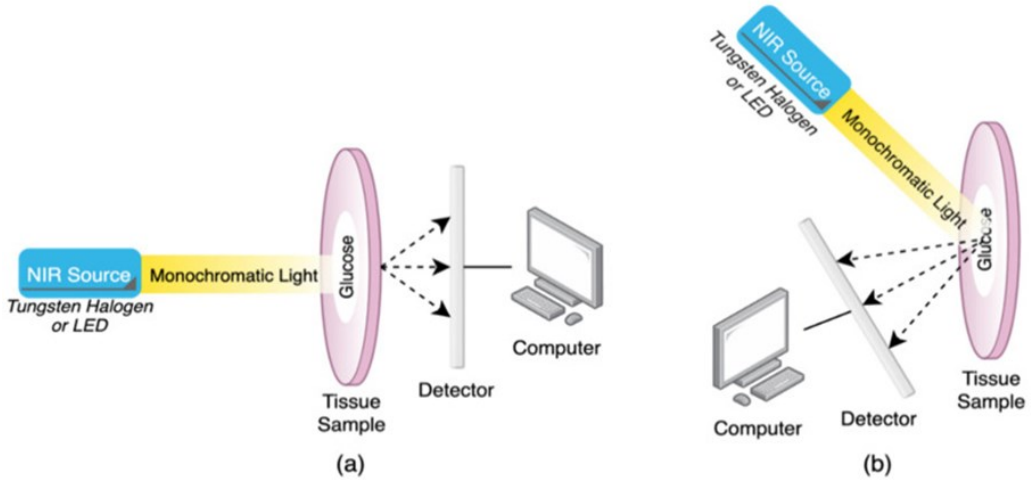

Figura 2.2: rappresentazione schematica (a) della configurazione a trasmissione e (b) a riflessione per la spettroscopia NIR

Come sopracitato, grazie alla elevata profondità di penetrazione della radiazione luminosa, la spettroscopia NIR può essere implementata sia in riflessione che in trasmissione. La scelta della specifica configurazione dipende dal bersaglio. Se il campione è denso e spesso è preferibile la configurazione di riflessione, mentre con campioni sottili o con campioni acquosi è preferibile la configurazione di trasmissione. Pertanto, nell'applicazione pratica la modalità di trasmissione è consentita solo per un numero limitato di siti anatomici, come la punta delle dita o i lobi delle orecchie. Al contrario, la configurazione a riflessione può essere applicata ad una più ampia gamma di parti del corpo, consentendo misurazioni della glicemia in diverse regioni. Dal punto di vista della strumentazione, le due configurazioni si differenziano unicamente dal posizionamento del rilevatore rispetto al campione e alla sorgente luminosa. In riflessione il rilevatore si trova dallo stesso lato della sorgente rispetto al campione, siccome deve registrare la radiazione riflessa, mentre in trasmissione si trova al lato opposto, in quanto è di interesse la misura della radiazione trasmessa.

Per migliorare la sensibilità della misura ottenuta con i sensori basati sulla spettroscopia NIR è necessario prestare attenzione alla lunghezza d'onda della radiazione luminosa utilizzata. Infatti, la frequenza dalla radiazione elettromagnetica deve essere scelta in un intervallo che permetta di massimizzare l'assorbimento da parte del glucosio. Inoltre, per quanto discusso precedentemente, la lunghezza d'onda della radiazione luminosa utilizzata gioca un ruolo fondamentale per l'eliminazione dei contributi indesiderati sulla misura. Pertanto, l'identificazione di una opportuna lunghezza d'onda per i sensori basati sulla spettroscopia NIR che permetta di ottenere un'ottima misura è oggetto di ricerca intensiva. In particolare, la ricerca si è interrogata circa l'idoneità per le applicazioni pratiche delle bande di assorbimento in LW-NIR e SW-NIR. Con il termine LW-NIR, dall'inglese long weight near-infrared, ci si riferisce a radiazioni appartenenti alla banda NIR ma con lunghezza d'onda lunga, mentre con il termine SW-NIR, dall'inglese short weight near-infrared, si indicano le radiazioni facenti parte della banda NIR ma con lunghezza d'onda corta. Tipicamente, la regione LW-NIR, caratterizzata da una lunghezza d'onda fra i 1300 nm e i 2500 nm, è utilizzata per il monitoraggio della glicemia in quanto consente di ottenere delle bande di assorbimento più nitide. Questo è dovuto al fatto che nell'intervallo LW-NIR sono contenute le frequenze fondamentali dei primi toni delle vibrazioni di C-H e O-H, legami presenti nella molecola di glucosio. Tuttavia, l'indice di assorbimento delle bande long weight near-infrared è molto elevato e, quindi, si ottengono solo profondità di penetrazione ridotte. Tale limitazione non è presente per la banda SW-NIR ove si osserva un basso assorbimento da parte dell'acqua, a discapito però di una minor nitidezza delle bande che rende più complesso l'utilizzo della misura per ricavare

informazioni utili sui livelli di glucosio. Ciononostante, negli ultimi anni diversi lavori di ricerca hanno dimostrato che la correlazione fra gli spettri SW-NIR e il contenuto di glucosio nel sangue è sufficiente per costruire dei modelli di calibrazione basati sulla regressione parziale dei minimi quadrati, consentendo un maggior utilizzo della rilevazione.

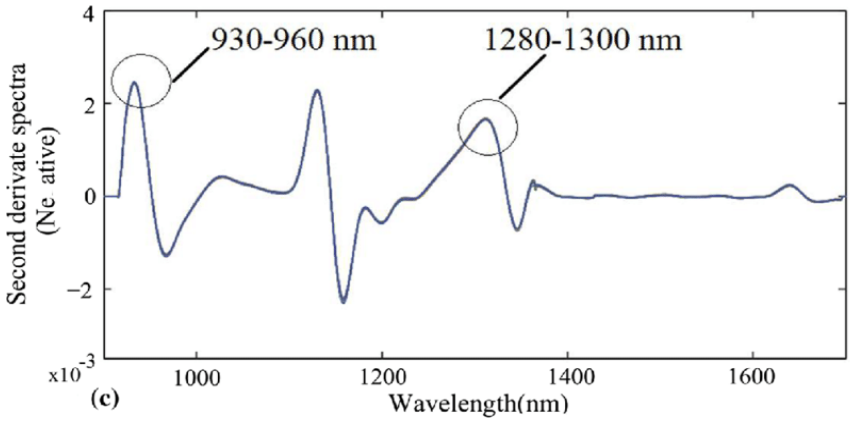

Figura 2.3: spettro di assorbimento del glucosio fra i 900 e i 1700 nm

In conclusione, sebbene la spettroscopia NIR per il monitoraggio della glicemia sia una tecnica abbastanza matura, continua ad essere argomento di studio. Infatti, grazie ai notevoli vantaggi presenti, tale metodo ottico è di particolare interesse per lo sviluppo di sensori non invasivi di automonitoraggio. Tra gli aspetti più interessanti si ricordano:

- La trasparenza all'acqua nella banda NIR, che consente un'elevata profondità di penetrazione della radiazione luminosa
- Componenti e materiali disponibili sul mercato a prezzi accessibili, che portano allo sviluppo di sensori economici
- La diretta proporzionalità fra l'assorbanza (facilmente misurabile sulla base del segnale rilevato) e la concentrazione del glucosio
- La preparazione minima del bersaglio, che consente un più facile utilizzo domestico e un minor costo per la misurazione

Ciononostante, la spettroscopia NIR presenta anche una serie di svantaggi che ne impediscono l'applicazione pratica. Di conseguenza, la ricerca sta prestando molta attenzione allo sviluppo di tecniche alternative, basate sempre su radiazioni nella banda NIR, che permettano di superare questi limiti. Tra i difetti che maggiormente impediscono l'applicazione pratica della spettroscopia NIR si ricordano:

- L'alto grado di scattering nel tessuto
- L'interferenza di proteine e acidi nel flusso ematico che presentano caratteristiche di assorbimento simili al glucosio
- La bassa sensibilità della tecnica, che richiederebbe di alte concentrazioni di glucosio per un accurato rilevamento

Quindi, nonostante esistano sensori ottici per il glucosio basati sulla spettroscopia NIR che sono stati immessi con successo nel mercato, le tecnologie utilizzate devono essere ulteriormente migliorate e modificate. In particolare, si cerca di aumentare la sensibilità e la selettività della misura, migliorare la correlazione tra i risultati delle rilevazioni e i valori effettivi e implementare degli opportuni algoritmi per elaborare i dati ottenuti e per estrapolare informazioni utili e accurate dalle misure.

2.2. Spettroscopia MIR: applicazione al monitoraggio

Al pari della spettroscopia NIR, la spettroscopia MIR è una tecnica di misura che viene utilizzata per acquisire informazioni quantitative su un campione di tessuto biologico e sui suoi costituenti, sulla base degli spettri di assorbimento rilevati. A differenza però della tecnica precedente, utilizza radiazioni elettromagnetiche appartenenti ad una banda di lunghezze d'onda compresa fra i 2500 nm e i 10000 nm. Di conseguenza, sono meno frequenti i fenomeni di scattering della luce e si osserva un maggior assorbimento nel tessuto, garantendo così picchi acuti e distinti negli spettri di assorbimento del glucosio e di altre molecole assorbenti. Pertanto, a differenza della spettroscopia NIR, caratterizzata da picchi deboli e ampi, è più facile discriminare il contributo della molecola di interesse da quello di altri composti assorbenti, che danno luogo a effetti di interferenza. Di contro però, l'utilizzo di una radiazione elettromagnetica a lunghezza d'onda maggiore riduce la profondità di penetrazione. Infatti, la radiazione utilizzata nella spettroscopia MIR può penetrare nella pelle solo fino ad un massimo di 100 μm, a causa del forte assorbimento da parte dell'acqua e di altri composti biologici incontrati. Ciò limita l'applicazione della tecnica di monitoraggio in sola configurazione di riflessione, poiché non sarebbe possibile ottenere alcuna misurazione della radiazione in configurazione di trasmissione. Ciononostante, l'implementazione pratica della tecnica di spettroscopia MIR in modalità riflettente per l'acquisizione delle misure coincide con quella della spettroscopia NIR, caratterizzata da un rilevatore posto dallo stesso lato della sorgente rispetto al campione, per poter monitorare la radiazione riflessa.

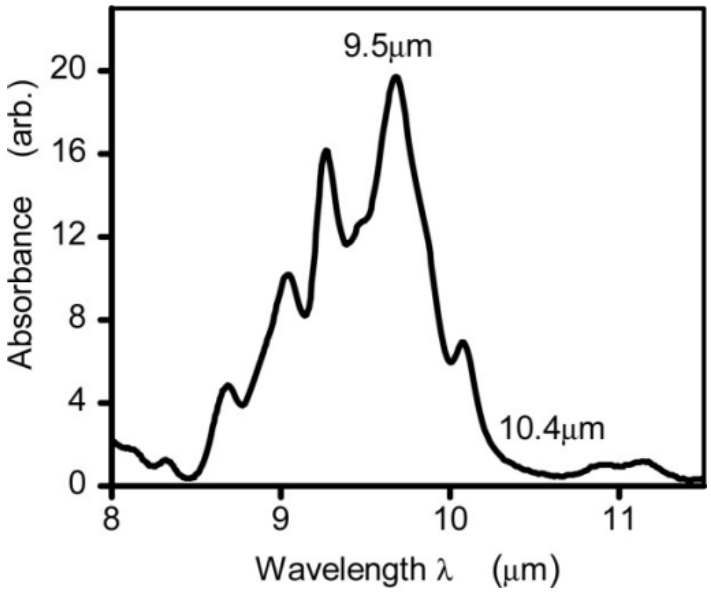

Figura 2.4: spettro di assorbimento del glucosio nell'intervallo tra gli 8000 e gli 11500 nm

La spettroscopia MIR viene anche detta spettroscopia delle impronte digitali, poiché la regione dello spettro utilizzata copre la cosiddetta "regione delle impronte digitali" del glucosio. Infatti, come la spettroscopia NIR, è una tecnica di spettroscopia vibrazionale che si basa sulle variazioni oscillanti di lunghezza e angoli di legame del glucosio, a seguito dell'assorbimento della radiazione. Le lunghezze d'onda a cui si osservano le vibrazioni nei legami della molecola ricadono però in una regione specifica dello spettro, detta per l'appunto regione delle impronte digitali. In tale regione si osservano i picchi di assorbimento dovuti a tutti i diversi tipi di oscillazioni di flessione nei legami del glucosio. Per queste lunghezze d'onda risulta più difficile distinguere le singole vibrazioni, poiché tutte molto vicine, però ogni diverso composto produce un diverso modello di assorbimento, rendendo la tecnica ideale per l'identificazione molecolare. Pertanto, a differenza della spettroscopia NIR, con la spettroscopia MIR si ottiene una tecnica maggiormente sensibile e

selettiva, data la presenza di picchi di assorbimento diversi e più acuti nella regione delle impronte digitali del glucosio.

Come per la spettroscopia NIR, dal punto di vista matematico, l'assorbimento è descritto efficacemente dalla legge di Lambert-Beer sopra riportata. Anche in questo caso, di particolare interesse sarà in calcolo dell'assorbanza a partire dalle misure di intensità. Infatti, quest'ultima risulta direttamente proporzionale alla concentrazione della molecola di glucosio. A differenza però della tecnica precedente, l'utilizzo dello spettro MIR riduce i fenomeni di dispersione, che invalidano il modello descritto dalla legge di Lambert-Beer, e i contributi all'assorbimento da parte di altre molecole assorbenti nel flusso ematico, che sono più facilmente distinguibili dal glucosio. Di contro vi è però un maggior assorbimento da parte dell'acqua, che richiede di opportune tecniche di elaborazione per essere rimosso e rendere ottima la misura.

Una considerevole conseguenza dell'effetto dell'acqua è la bassa profondità di penetrazione ottenibile, che rappresenta il principale svantaggio della tecnica di spettroscopia MIR. A causa di ciò, è possibile unicamente raggiungere il liquido interstiziale sottocutaneo, comunemente abbreviato in ISF, dall'inglese subcutaneous interstitial fluid. Ciononostante, è stato dimostrato che i livelli di glucosio nel liquido interstiziale dell'epidermide hanno una forte correlazione con i livelli di glicemia, malgrado il ritardo di diversi minuti. Questo ha permesso di poter comunque utilizzare la spettroscopia MIR come tecnica di monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue, a dispetto della bassa profondità di penetrazione. Inoltre, l'elevato assorbimento da parte dell'acqua rende necessario l'utilizzo di potenti sorgenti della radiazione MIR e tecnologie complementari, in modo da poter comunque arrivare in profondità con un'intensità utile alla misura. Questo genera dei problemi di ingombro e di costo della strumentazione necessaria, limitando notevolmente lo sviluppo di sensori per l'automonitoraggio della glicemia basati sulla spettroscopia MIR.

In conclusione, la spettroscopia MIR è una tecnica di spettroscopia vibrazionale che si basa sugli stessi principi di configurazione e assorbimento della spettroscopia NIR, ma utilizza radiazioni appartenenti ad una diversa banda di lunghezza d'onda. Fra i vantaggi che si possono ottenere da questa tecnica si ricorda:

- La bassa dispersione della radiazione luminosa da parte dei tessuti
- Le bande di assorbimento più specifiche e meglio delineate per le diverse molecole, che rendono questo metodo ideale per l'identificazione molecolare
- Il più forte assorbimento della radiazione MIR rispetto alla radiazione NIR da parte del glucosio, che produce picchi di assorbimento più acuti, aumentando così la sensibilità della tecnica
- La maggior precisione della misura della concentrazione di glucosio, che può assorbire specifiche lunghezze d'onda nella banda MIR

Nonostante i notevoli vantaggi introdotti dall'utilizzo di radiazioni di lunghezza d'onda nella banda MIR, che permettono di superare alcune limitazioni della spettroscopia NIR, vi è da tenere in considerazione anche una serie di difetti che presenta questa tecnica. Fra gli svantaggi introdotti dalla spettroscopia MIR, si ricorda:

- La profondità di penetrazione di pochi micrometri, che consente la sola configurazione a riflessione
- Il forte assorbimento della radiazione da parte dell'acqua, che richiederà di opportune tecniche di elaborazione per consentire l'utilizzo ottimale della misura
- I costi elevati dell'attrezzatura necessaria

Pertanto, nonostante si abbia a che fare con una tecnica con sensibilità e selettività buone per la misura della glicemia, la bassa profondità di penetrazione e i costi elevati costituiscono dei problemi rilevanti allo sviluppo di sensori basati sulla spettroscopia MIR. Per questo motivo, negli ultimi anni si sta effettuando un lavoro di ricerca intensiva per rendere possibile l'utilizzo di tale tecnica, che permetterebbe di superare le principali limitazioni della spettroscopia NIR. In particolare, si stanno sperimentando nell'applicazione in vivo diversi tipi di sorgenti della radiazione incidente e di rilevatori, che sfruttino specifiche tecnologie innovative per ottimizzare la misura e che siano economici e poco ingombranti.

2.3. Problematiche nell'applicazione pratica della spettroscopia NIR e MIR

Come riportato nella precedente discussione delle due tecniche spettroscopiche, esistono una serie di problematiche che complicano l'applicazione in vivo della spettroscopia NIR e della spettroscopia MIR. In particolare, fra i principali problemi da affrontare per poter sviluppare dei sensori di automonitoraggio basati su tali metodi, si ricordano:

- L'assorbimento da parte dell'acqua, che è la molecola più abbondante nei fluidi biologici del corpo umano
- L'assorbimento da parte di altri costituenti del sangue, che influenzano l'assorbimento complessivo della radiazione descritto dalla legge di Lambert-Beer
- La diffusione della radiazione da parte dei tessuti, che invalida il modello di assorbimento descritto dalla legge di Lambert-Beer
- Le variazioni di temperatura nei tessuti, che influenzano le misurazioni di assorbimento ottico

Nel seguito tali problematiche verranno discusse una per una, affrontando anche le eventuali soluzioni che fino ad oggi sono state sviluppate o sono in fase di sviluppo.

2.3.1. Assorbimento da parte dell'acqua

La molecola più abbondante nel sangue è l'acqua, mentre il glucosio compone unicamente lo 0,07-0,1% del plasma. Pertanto, nello studio dell'assorbimento subito dalla radiazione incidente è necessario tenere in considerazione anche del suo effetto. In tal caso però conviene fare una distinzione per le due tecniche spettroscopiche. Infatti, nel caso della spettroscopia NIR, l'acqua assorbe poca radiazione, giocando un ruolo marginale nell'assorbimento complessivo e consentendo un'elevata profondità di penetrazione, mentre nella spettroscopia MIR, a seguito di lunghezze d'onda maggiori, gioca un ruolo preponderante, limitando la profondità di penetrazione ottenibile a pochi micrometri. Quando ciò accade, l'assorbimento da parte delle molecole d'acqua è indipendente dall'assorbimento operato dalle molecole di glucosio, diminuendo così anche la sensibilità della misura.

Una soluzione può essere la ricerca di una finestra di lunghezze d'onda nello spettro NIR e nello spettro MIR che minimizzi l'assorbimento da parte dell'acqua e massimizzi l'assorbimento da parte delle molecole di glucosio. Nell'intervallo NIR si osservano due picchi di assorbimento da parte dell'acqua: uno fra i 1350 nm e i 1520 nm, e l'altro fra i 1790 nm e i 2000 nm. Pertanto, le finestre ideali per le misure di glicemia nello spettro NIR sono tre: tra i 700 nm e 1100 nm, tra i 1500 nm e i 1850 nm e tra i 2000 nm e i 2400 nm. Infatti, per tali lunghezze d'onda si nota un assorbimento osservabile da parte della molecola di glucosio e si verifica una quantità minima di assorbimento da parte dell'acqua, poiché distanti dai picchi sopra citati. In realtà, l'assorbimento da parte delle due molecole varia nei

diversi intervalli individuati, portando alla definizione delle bande LW-NIR e SW-NIR. Come già discusso precedentemente, l'assorbimento da parte del glucosio è maggiore per lunghezze d'onda più elevate (appartenenti alla banda LW-NIR), ma lo è anche quello dell'acqua, riducendo la profondità di penetrazione. Di contro, per lunghezze d'onda minori si osserva un effetto dell'acqua minore sull'assorbimento complessivo, rendendo la banda SW-NIR ideale per le misure di glicemia. Infatti, con l'utilizzo di intervalli più brevi si osserva un maggior selettività alle molecole di glucosio, riducendo al minimo l'assorbimento dell'acqua.

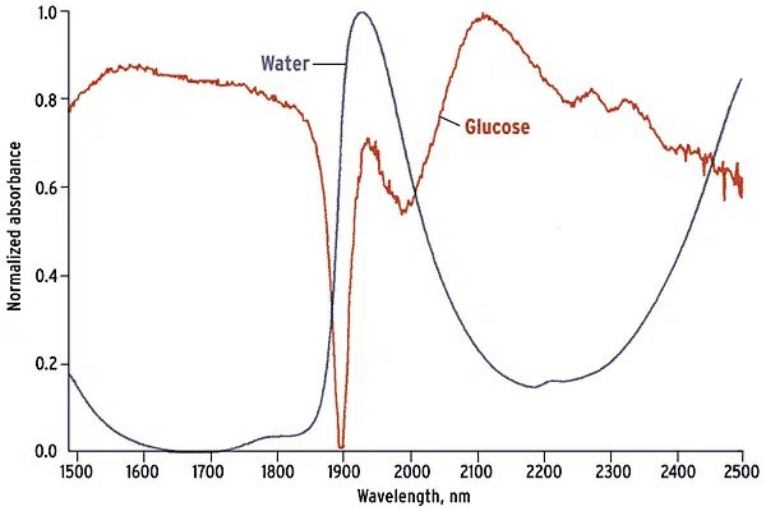

Figura 2.5: spettri normalizzati di assorbimento di acqua e glucosio nell'intervallo fra i 1500 e i 2500 nm

L'effetto interferente dovuto all'assorbimento dell'acqua è molto più consistente quando si lavora nella banda MIR. Infatti, l'utilizzo di lunghezze d'onda maggiori porta ad una evidente riduzione della profondità di penetrazione, a causa del forte assorbimento della radiazione operato dall'acqua. Nell'intervallo MIR il glucosio presenta dei picchi di assorbimento nella regione delle impronte digitali, compresa fra gli 8000 nm e i 9746 nm, mentre l'assorbimento da parte dell'acqua è significativo in tutta la banda. Pertanto, una soluzione efficace può essere l'utilizzo di più lunghezze d'onda al fine di implementare una tecnica di elaborazione che rimuova l'effetto interferente. Infatti, la banda ove si osservano i picchi di assorbimento da parte del glucosio è molto ristretta rispetto all'intero intervallo MIR, consentendo così di ottenere una misura in cui la luce viene assorbita sia dal glucosio che dall'acqua, utilizzando una lunghezza d'onda nella regione delle impronte digitali, e una misura in cui la radiazione è principalmente assorbita dall'acqua, utilizzando frequenze esterne alla regione delle impronte digitali. Valutando quindi il segnale differenziale ottenuto dalle due misure è possibile rimuovere l'assorbimento dell'acqua, ottenendo una rilevazione che rappresenta principalmente l'assorbimento del glucosio.

L'approccio a lunghezza d'onda multipla è stato applicato in vivo con successo nel dispositivo non invasivo per il monitoraggio della glicemia chiamato TensorTip Combo Glucometer. Tale strumento è stato approvato per l'uso in diversi paesi del mondo, dando prova della possibilità di rimuovere l'effetto interferente dell'acqua mediante l'utilizzo di radiazioni a diverse frequenze.

Figura 2.6: Cnoga TensorTip Combo Glucometer

2.3.2. Assorbimento da parte dei costituenti del sangue

Oltre all'assorbimento operato dal glucosio nel sangue, la radiazione elettromagnetica subisce un assorbimento anche da parte di altre molecole costituenti il flusso ematico e i tessuti attraversati. Infatti, secondo il modello di assorbimento descritto dalla legge di Lambert-Beer, il coefficiente di assorbimento è la somma dei coefficienti di assorbimento di tutti i componenti assorbenti incontrati dalla radiazione utilizzata. Fra le molecole assorbenti costituenti la pelle si ricordano la melanina, il beta-carotene e i tessuti grassi, che variano nei diversi individui. I componenti assorbenti del sangue invece sono l'albumina, la globulina e l'emoglobina, che sono presenti in concentrazioni maggiori rispetto al glucosio e, quindi, il loro contributo sull'assorbimento della luce può essere significativo. Tutte queste molecole agiscono come interferenti durante la misura della glicemia; pertanto, è indispensabile trovare una metodologia per ridurne al minimo l'effetto. Ancora una volta la soluzione sta nella ricerca di opportune lunghezze d'onda che minimizzino l'effetto delle sostanze indesiderate e che siano altamente assorbite da parte del glucosio, oppure nell'utilizzo di più radiazioni a diverse frequenze.

Anche nello studio dell'assorbimento da parte dei costituenti dei tessuti attraversati e del sangue è necessaria una distinzione fra banda NIR e banda MIR. Infatti, uno dei vantaggi principali della spettroscopia MIR è l'ottenimento di spettri di assorbimento caratterizzati da picchi distinti e acuti, che facilitano l'identificazione molecolare. Pertanto, il problema degli effetti interferenti dei costituenti del sangue sulla misura è meno presente nell'intervallo MIR. Ciononostante, per migliorare al massimo la misura è comunque possibile utilizzare delle lunghezze d'onda specifiche in cui si notano dei picchi di assorbimento da parte del glucosio e un assorbimento relativamente basso da parte di altri composti assorbenti.

Nel caso invece della spettroscopia NIR, l'assorbimento produce dei picchi più ampi ed eventualmente sovrapposti, generati da molecole caratterizzate dalla presenza di legami N-H, C-H e O-H. Una soluzione possibile per rimuovere l'effetto di questi composti tissutali ed ematici è un approccio che si basi sull'utilizzo di più radiazioni a diverse lunghezze d'onda. In tal caso, si utilizzano più sorgenti luminose e si derivano i dati quantitativi di interesse dalle misure di assorbanza alle diverse frequenze, applicando opportuni metodi analitici e di calibrazione. Questi algoritmi permettono di generare dei modelli che prevedano con precisione la concentrazione di glucosio considerando l'effetto di più variabili, dovute alle molecole interferenti, sull'output. Più nel dettaglio, tali metodi soppesano l'effetto di più variabili, cercando di minimizzare, o meglio di eliminare, l'influenza di segnali concorrenti, dovuti ai composti assorbenti, dal valore reale di interesse. Fra i vari algoritmi che possono essere implementati, si ricordano: la regressione lineare a

lunghezza d'onda multipla, i minimi quadrati parziali, la regressione dei componenti principali e la regressione di Deming.

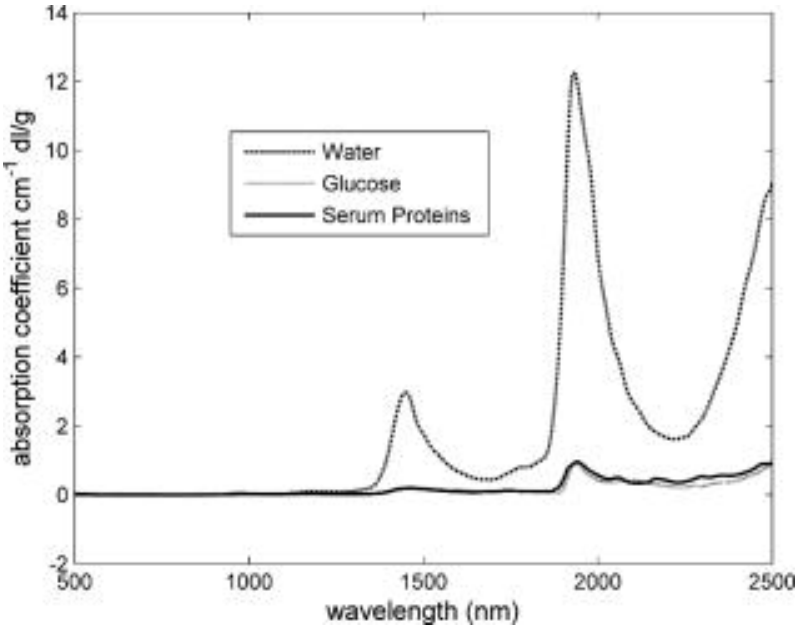

Figura 2.7: spettri di assorbimento di acqua, glucosio e costituenti del sangue nel visibile e nella banda NIR

2.3.3. Diffusione della luce

In entrambe le tecniche spettroscopiche, il fenomeno di assorbimento della radiazione può essere descritto efficacemente mediante la legge di Lambert-Beer. Grazie a tale modello è possibile definire l'assorbanza, indispensabile ai fini del calcolo della concentrazione ematica di glucosio a partire dall'intensità luminosa misurata. Uno dei principali limiti all'utilizzo della legge di Lambert-Beer, per come è stata precedentemente riportata, è la diffusione della radiazione elettromagnetica da parte delle molecole attraversate. Nel caso della spettroscopia MIR, l'utilizzo di radiazioni a lunghezza d'onda maggiore riduce i fenomeni di scattering, rendendo il problema meno evidente. Non si può dire la stessa cosa nel caso della spettroscopia NIR, per la quale i fenomeni di diffusione sono evidenti e non trascurabili. In entrambi i casi è possibile ricavare una soluzione al problema dello scattering, considerandone il contributo nell'attenuazione complessiva della radiazione e separandolo dall'assorbimento operato dalle molecole incontrate.

La diffusione della radiazione luminosa è operata dai diversi componenti tissutali incontrati e provoca una deviazione dell'attenuazione subita dalla legge di Lambert-Beer. Infatti, sia i tessuti che i componenti del sangue causano lo scattering della luce, attenuandone l'intensità. Pertanto, l'attenuazione complessiva della radiazione elettromagnetica è dovuta sia all'assorbimento operato dalle molecole attraversate, sia alla diffusione indotta dalle specie colpite. Con riferimento alla legge di Lambert-Beer, allora l'attenuazione totale dipende dal coefficiente di attenuazione totale, μ_{tot}, che è la somma del coefficiente di assorbimento di tutti i componenti assorbenti incontrati, μ_{ass}, e del coefficiente di diffusione ridotto delle molecole di dispersione, μ'_{diff}. Anche considerando il contributo dello scattering, rimane la dipendenza del coefficiente di attenuazione dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata, poiché le diverse specie assorbono diversamente la luce in base alla sua frequenza. Inoltre, si parla di coefficiente di diffusione ridotto, in quanto rappresenta sia il contributo dell'effettivo coefficiente di diffusione della specie, μ_{diff}, che il contributo

dell'anisotropia della propagazione della radiazione nel tessuto biologico, *g*. Quindi, riassumendo matematicamente quanto discusso, è possibile ricavare una legge che descriva il coefficiente di attenuazione totale considerando anche l'effetto dello scattering:

$$\mu_{tot} = \mu_{ass} + \mu'_{diff} = \mu_{ass} + \mu_{diff} \cdot (1 - g)$$

Il parametro *g* introdotto è definito semplicemente come il coseno medio dell'angolo di scattering. È necessario prendere un valor medio poiché la radiazione può essere diffusa in diverse direzioni da una singola molecola. Per la relazione sopra riportata, se *g* è vicino all'unità allora il contributo della diffusione sull'attenuazione complessiva è minore, in quanto la luce viene maggiormente dispersa lungo direzioni di avanzamento della radiazione rispetto alla sorgente. Il valore assunto dal parametro *g* per i tessuti biologici è compreso tra 0,65 e 0,95. Pertanto, quando la luce interagisce con i componenti dei tessuti tende a disperdersi lungo direzioni di avanzamento piuttosto che lungo direzioni di ritorno alla sorgente. Questo vale unicamente per un singolo evento di diffusione. Infatti, dopo multipli eventi di scattering, la diffusione complessiva può causare una propagazione retrograda della luce dispersa. Quindi, anche se i valori del parametro *g* per i tessuti biologici sono a prima vista favorevoli per un minor impatto della diffusione sulla misura, in realtà ripetuti fenomeni di scattering possono comunque causare degli errori sulle misurazioni della concentrazione del glucosio. Inoltre, l'evento diffusivo può variare a parità di tessuto e di molecola in diversi individui ed in un singolo soggetto, per effetto di differenze nel grasso tissutale, nel collagene, nelle proteine, nel flusso sanguigno e nello stato di idratazione. Pertanto, la definizione della relazione precedente, che descrive il coefficiente di attenuazione come somma di un contributo dovuto all'assorbimento e uno dovuto alla diffusione, non è sufficiente per rimuovere l'effetto dannoso dello scattering, in quanto è difficile riuscire a definire a priori un μ'_{diff} per diversi pazienti.

Una possibile soluzione al problema dello scattering della luce è data dall'accurata selezione della lunghezza d'onda utilizzata. Infatti, l'intensità della radiazione diffusa è correlata negativamente con la lunghezza d'onda della luce incidente, e viene pertanto ridotta aumentando quest'ultima. Di conseguenza, le radiazioni nella banda NIR provocano una maggior dispersione da parte dei tessuti rispetto alle radiazioni nella banda MIR. Come già discusso, le particelle di dispersione danno luogo a multipli fenomeni di scattering, causando la diffusione della radiazione. L'intensità della luce diffusa dipende dalle proprietà ottiche del tessuto, che a loro volta dipendono dalla concentrazione di glucosio. Rispettando una serie di approssimazioni nel descrivere il fenomeno di scattering e utilizzando opportuni algoritmi di modellazione, è stato possibile definire una legge che leghi l'intensità della luce diffusa in un mezzo di diffusione infinito e le proprietà ottiche dei tessuti:

$$I_0(\rho) = I_0 \cdot \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \rho \cdot D} \cdot e^{-\mu_{eff} \cdot \rho}$$

dove $I_0(\rho)$ è l'intensità della luce diffusa, I_0 è l'intensità della luce incidente, ρ è la distanza radiale tra la sorgente luminosa e il rilevatore e D è un coefficiente definito come $[3 \cdot (\mu_{ass} + \mu'_{diff})]^{-1}$. Sulla base di tale relazione è possibile osservare che l'intensità della radiazione diffusa è proporzionale all'esponente negativo del coefficiente di attenuazione effettivo, definito come:

$$\mu_{eff} = [3 \cdot \mu_{ass} \cdot \left(\mu_{ass} + \mu'_{diff}\right)]^{\frac{1}{2}}$$

Pertanto, siccome entrambi i coefficienti di assorbimento e di diffusione dipendono dalla lunghezza d'onda, aumentandola è possibile diminuire il valore di intensità della radiazione diffusa, grazie alla relazione esponenziale decrescente. Sulla scorta di tale legge è quindi possibile selezionare accuratamente la frequenza della radiazione utilizzata, al fine di ridurre gli effetti dello scattering sulla misura.

Una soluzione alternativa al problema della diffusione è fornita da una particolare tecnica di misura, la spettroscopia fotoacustica, che consente di quantificare l'assorbimento della radiazione senza preoccuparsi dell'effetto di interferenza dovuto alle componenti di scattering. Secondo questo metodo, una radiazione luminosa nella banda MIR o NIR viene irradiata su un campione di interesse, ove la luce viene in parte assorbita e in parte dispersa. L'assorbimento da parte delle molecole presenti nel bersaglio colpito produce un'onda termica che si propaga attraverso il campione e verso la sua superficie. A tal punto, il segnale di calore si espande al gas adiacente, traducendosi in un segnale acustico che può essere captato da un opportuno rilevatore. Il vantaggio della spettroscopia fotoacustica sta nel fatto che l'intensità del segnale sonoro dipende unicamente dal coefficiente di assorbimento del campione, che a sua volta dipende dalla concentrazione delle molecole assorbenti, come discusso in precedenza. Pertanto, la porzione di radiazione che è stata diffusa dalle molecole non fornisce alcun contributo al segnale acustico generato, consentendo così di ovviare al problema dello scattering sulla misura. Nell'applicazione pratica, i sensori basati sulla spettroscopia fotoacustica per il monitoraggio della glicemia hanno mostrato risultati molto promettenti, ma non sono ancora disponibili al commercio.

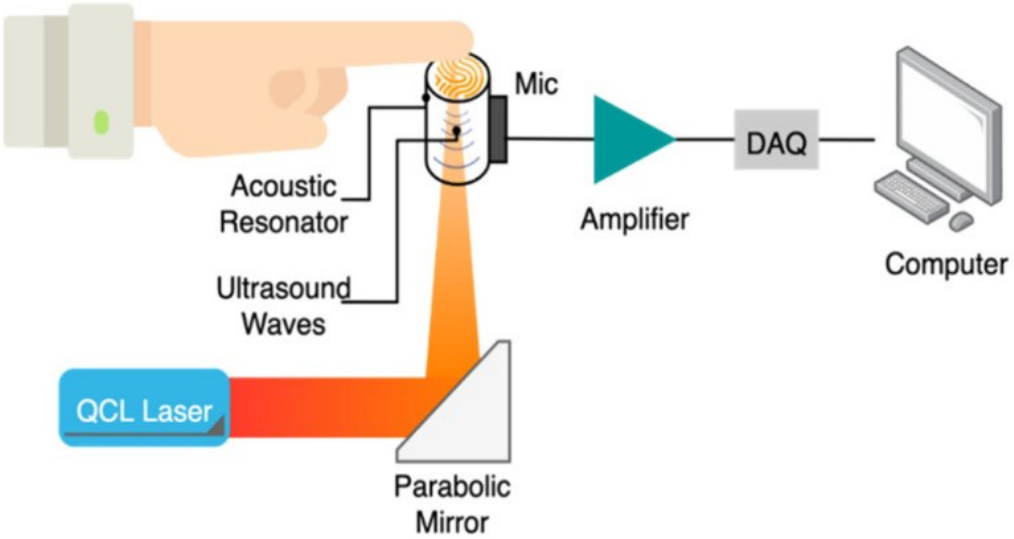

Figura 2.8: rappresentazione schematica della spettroscopia fotoacustica

In conclusione, la presenza di componenti di scattering provoca una relazione non lineare multivariata tra gli spettri di assorbimento e la concentrazione delle componenti assorbenti, rendendo più complicato l'utilizzo corretto della misura. Dato che la spettroscopia fotoacustica ha ricevuto solo di recente un lavoro di ricerca e sviluppo per l'applicazione pratica, nel corso degli anni sono stati sviluppati vari metodi di calibrazione per modellare le non linearità e migliorare l'accuratezza della lettura della glicemia. In particolare, la non linearità può essere minimizzata in tre passi:

1. Identificazione della lunghezza ideale del percorso seguito dal fascio, così da rimuovere eventuali componenti di scattering lungo altre direzioni
2. Combinazione di acquisizioni multiple, nelle quali i fenomeni di scattering possono essere differenti
3. Applicazione di algoritmi di pre-elaborazione sulle informazioni spettrali

2.3.4. Variazione di temperatura nei tessuti

Un ultimo fattore che influenza l'accuratezza delle misure di glicemia è la temperatura corporea, o per meglio dire le fluttuazioni di temperatura corporea, che impattano sulla fase di rilevazione dell'assorbimento ottico. Pertanto, risulterà indispensabile la misura del segnale termico, in modo tale da implementarla negli algoritmi di determinazione della concentrazione ematica di glucosio, migliorando la precisione del sensore.

La misura della temperatura corporea avviene mediante opportuni sensori di temperatura, come ad esempio un termometro a membrana timpanica. Tale strumento rileva la temperatura in base all'intensità della radiazione elettromagnetica emessa dal corpo in un ampio intervallo spettrale. Il vantaggio di misurare il segnale termico di interesse a livello della membrana timpanica sta nel fatto che quest'ultima condivide il suo apporto di sangue con l'ipotalamo, ove è presente il centro per la regolazione della temperatura interna del corpo.

Una volta nota la temperatura corporea, per aumentare l'accuratezza della misura della glicemia, è necessario includerla in opportuni algoritmi che ne compensino l'effetto. Da diversi lavori di ricerca in tale ambito, è stato sviluppato un modello che permette di compensare l'effetto della temperatura cutanea sulla misura di glucosio, come mostrato nella seguente equazione:

$$i_{TC} = i_0 \cdot 1{,}07^{(32{,}5-T)}$$

dove i_0 è il segnale di corrente grezzo misurato, T è la temperatura superficiale in gradi Celsius e i_{TC} è il segnale di corrente compensato in temperatura, proporzionale alla concentrazione di glucosio. Infatti, i sensori fotoemissivi e fotoconduttivi utilizzati per la rilevazione convertono l'intensità luminosa in un segnale di natura elettrica (intensità di corrente o differenza di potenziale) ad essa proporzionale. Pertanto, effettuando la compensazione in temperatura sull'intensità di corrente si ovvia al problema anche sui valori del segnale luminoso di interesse. In questo modo è possibile ottenere una misura più accurata della glicemia, risolvendo il problema delle fluttuazioni di temperatura corporea.

Fino ad ora si è però trascurato l'effetto dell'ambiente circostante sulla misura del segnale termico. Infatti, variazioni nella temperatura ambientale possono influenzare la temperatura corporea misurata. Per ovviare a tale effetto è sufficiente l'utilizzo di un secondo misuratore che monitori la temperatura esterna, così da poterla includere nel modello di previsione del glucosio.

CAPITOLO 3:
SPETTROSCOPIA RAMAN

La spettroscopia NIR e la spettroscopia MIR sono tecniche molto promettenti per il monitoraggio non invasivo della glicemia, ma presentano una serie di svantaggi non trascurabili. Alcuni di questi sono stati studiati nel dettaglio e sono stati ricavati dei metodi per compensarne in parte l'effetto. Ciononostante, rimangono delle problematiche rilevanti che impattano sull'accuratezza, sulla sensibilità e sulla selettività dei sensori ottici basati sulle due tecniche spettroscopiche. Pertanto, la ricerca si è mossa verso l'implementazione di metodi alternativi per il monitoraggio ottico del glucosio che si basino comunque su radiazioni appartenenti alla banda NIR e MIR, poiché possiedono proprietà molto interessanti al fine pratico. Fra queste tecniche sviluppate si andrà di seguito a descrivere la spettroscopia Raman.

3.1. Principi fisici e applicazione al monitoraggio

Come deducibile dal nome, la spettroscopia Raman basa il suo funzionamento su un fenomeno fisico che interessa le radiazioni luminose, l'effetto Raman. Quando la luce monocromatica colpisce il bersaglio di interesse, produce raggi sparsi che viaggiano in tutte le direzioni. La maggior parte della luce diffusa presenta la medesima lunghezza d'onda della radiazione incidente e viene detta scattering Rayleight, mentre la parte restante presenta una diversa frequenza ed è chiamata scattering Raman. La variazione indotta è dovuta all'interazione con il campione, che causa rotazione e vibrazione dei legami delle molecole costituenti. La differenza di lunghezza d'onda indotta prende il nome di spostamento Raman e rappresenta la differenza fra gli stati vibrazionali iniziale e finale. Di conseguenza, la spettroscopia Raman può essere utilizzata per rilevare specifiche bande di assorbimento e quantificare le molecole di interesse, in quanto la variazione di frequenza della radiazione dipende dalla concentrazione molecolare dei tessuti e dei fluidi attraversati. Allora, è possibile stimare la concentrazione ematica di glucosio mediante il monitoraggio della luce diffusa.

Quando una radiazione elettromagnetica colpisce un campione di interesse, parte della luce subisce un fenomeno di dispersione. Basandosi su un'interpretazione corpuscolare della radiazione luminosa è possibile distinguere lo scattering in elastico, detto anche scattering Rayleight, o anelastico, spesso chiamato scattering Raman. Nel primo caso, che interessa la maggior parte della luce diffusa, non si osserva alcuna variazione della lunghezza d'onda e della frequenza rispetto alla radiazione incidente, mentre nel secondo caso è possibile notare una modifica di entrambe. Tale cambiamento nella lunghezza d'onda prende il nome di spostamento Raman ed è dovuto all'interazione della luce con le molecole di scattering. Più nel dettaglio, i fotoni della radiazione incidente cedono energia sufficiente agli elettroni delle molecole per poter saltare da un livello energetico minore a un livello energetico maggiore. Con il ritorno allo stato di equilibrio si verifica una cessione di energia sottoforma di emissione di fotoni a specifica frequenza, diversa da quella dei fotoni incidenti. La differenza di lunghezza d'onda fra i fotoni incidenti e i fotoni emessi rappresenta lo spostamento Raman, tipicamente espresso come numero d'onda in cm^{-1}. Le transizioni energetiche degli elettroni sono associate, nel caso della radiazione infrarossa, ai livelli di energia vibrazionale. Siccome tutte le molecole hanno degli specifici livelli di energia vibrazionale, nello spettro di assorbimento rilevato si osservano dei picchi caratteristici che consentendo l'identificazione molecolare. Infatti, le nuove frequenze ottenute hanno valori determinati, attraverso la legge di Plank, dalle energie rotazionali e vibrazionali dei composti interessati. L'intensità dello spettro Raman misurato dipende della concentrazione della sostanza e

dalla lunghezza d'onda utilizzata, mentre lo spostamento Raman indotto, e di conseguenza la posizione del picco, dipende esclusivamente dalla molecola di dispersione colpita, poiché i diversi gruppi funzionali vibrano in modi unici. Questo consente di utilizzare l'effetto Raman come metodo ottico per il monitoraggio della glicemia.

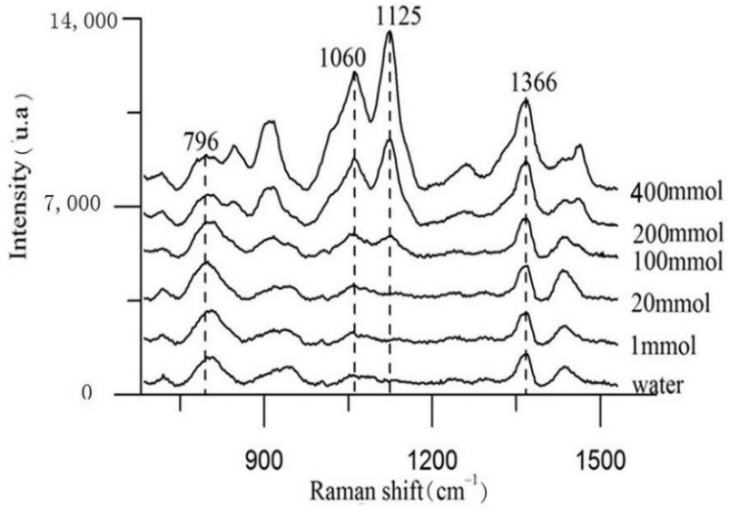

Figura 3.1: spettro Raman di soluzioni a diversa concentrazione di glucosio

Nella spettroscopia Raman, le modalità vibrazionali di interesse per le molecole di glucosio sono associate a stiramenti dei legami C=O, C-C e C-H. Le oscillazioni per i legami C=O e C-C si osservano tra gli 800 cm^{-1} e i 1200 cm^{-1}, mentre per il legame C-H si osservano a circa 2900 cm^{-1}. Questo implica che nello spettro Raman rilevato si troveranno delle tipiche impronte digitali per il glucosio, che ne consentono l'identificazione e la quantificazione nel campione colpito. Comunemente, i picchi di interesse si osservano a 911, 1060 e 1125 cm^{-1}, con un segnale Raman ad altissima intensità in quest'ultimo caso.

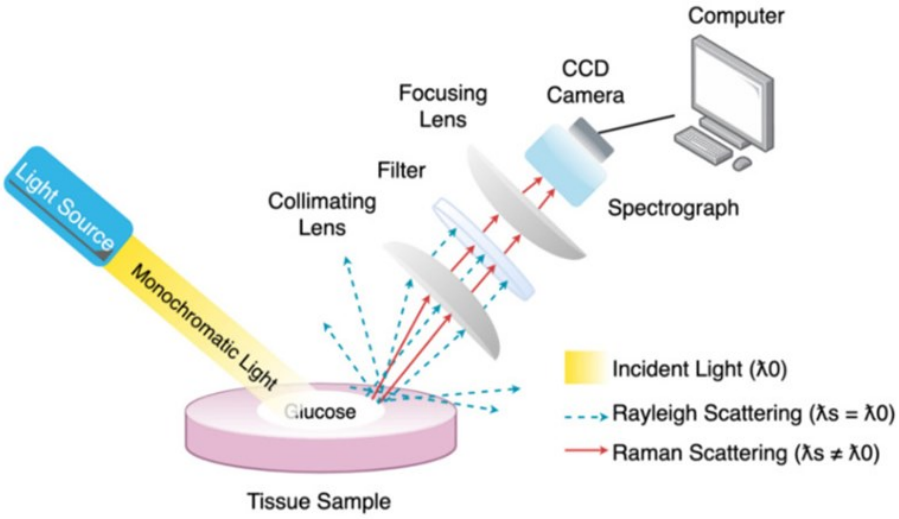

Figura 3.2: rappresentazione schematica della spettroscopia Raman

La strumentazione di base di uno spettrometro Raman consiste in: una sorgente luminosa ad alta intensità, un fotorilevatore, delle lenti e un filtro. La sorgente ha il compito di generare la radiazione monocromatica utilizzata per l'analisi della glicemia, inviandola a colpire il campione di interesse. Come si tratterà meglio nel seguito, un problema rilevante della spettroscopia Raman è che produce segnali intrinsecamente deboli. Infatti, solo una piccola parte della radiazione incidente subisce l'effetto Raman; pertanto, si preferisce l'utilizzo di luce ad alta intensità, in modo da ovviare

parzialmente al problema. Inoltre, si è già discusso come l'altezza dei picchi nello spettro Raman dipenda anche dalla lunghezza d'onda utilizzata. Questo implica che mediante un'opportuna scelta della frequenza della radiazione incidente è possibile ottenere un segnale ottimo per la misura. Di conseguenza, il rilevamento del glucosio con la spettroscopia Raman sfrutta luce appartenente all'estremità a bassa frequenza della banda NIR, nonostante la presenza di picchi più ampi che possono causare interferenze nei profili di assorbimento di diverse molecole e variabilità nello spettro rilevato. Inoltre, lavorando con radiazione elettromagnetica NIR si può anche ottenere un'elevata profondità di penetrazione, che consente di raggiungere gli strati a maggior concentrazione ematica con alta intensità della luce. Le lenti invece hanno lo scopo di catturare parte della radiazione diffusa e dirigerla verso il filtro. Quest'ultimo consente unicamente alla luce diffusa per effetto Raman di essere rilevata dal fotorilevatore, rimuovendo tutti gli altri contributi dovuti allo scattering Rayleight. In questo modo risulta più facile la successiva elaborazione del segnale misurato per la determinazione dei livelli di glucosio nel sangue. Oltre a direzionare la radiazione diffusa verso il filtro, spesso le lenti vengono utilizzate anche per focalizzare la luce filtrata prima della rilevazione, in modo da aumentarne l'intensità e limitare il problema relativo ai segnali Raman intrinsecamente deboli.

In conclusione, la spettroscopia Raman è una tecnica di monitoraggio che sfrutta sempre radiazioni nell'infrarosso, ma a differenza dei metodi precedenti si basa sulla rilevazione della luce diffusa da un particolare fenomeno dispersivo detto effetto Raman. Quest'ultimo porta una piccola parte della radiazione diffusa a perdere o acquisire energia, e quindi frequenza, rispetto alla luce incedente, per effetto dell'interazione con il campione in analisi. Siccome tali variazioni di lunghezza d'onda sono associate ai movimenti vibrazionali e rotazionali delle molecole colpite, allora nello spettro rilevato si osserveranno delle bande uniche per i diversi composti, che consentono facilmente l'identificazione e la quantificazione. Fra i vantaggi principali della spettroscopia Raman si ricordano:

- La minor sensibilità alle variazioni di temperatura, che costituivano un problema nella spettroscopia NIR e nella spettroscopia MIR
- La minor sensibilità all'acqua, dovuta all'utilizzo di radiazione a bassa frequenza nella banda NIR, che consente di aumentare la profondità di penetrazione e ridurre gli effetti interferenti sulla misura
- L'adattabilità a qualsiasi superficie, poiché si misura la luce diffusa, che permette di non limitare la tecnica a specifici siti anatomici come nei casi precedenti
- L'alta specificità, dovuta alla larghezza dei picchi, circa 10/100 volte più stretti di quelli prodotti dalla spettroscopia NIR e MIR basate sull'assorbimento

Ciononostante, la spettroscopia Raman presenta una serie di problemi che ne limitano l'applicazione pratica e che richiedono ancora di molta ricerca e sperimentazione. Infatti, anche se la tecnica permette di superare diversi ostacoli presenti nella spettroscopia NIR e MIR, primo fra tutti lo scattering, poiché si basa sulla rilevazione della luce diffusa, è importante ricordare alcuni dei suoi svantaggi più rilevanti, che devono essere opportunamente trattati per ottenere una misura utile. Fra questi si riportano:

- La sensibilità a interferenze da parte di altre molecole incontrate dalla radiazione, che causano una maggior difficoltà di interpretazione ed elaborazione dello spettro e minano la veridicità della misura
- L'instabilità della lunghezza d'onda e dell'intensità della radiazione prodotta dalla sorgente
- Il lungo tempo di raccolta del segnale

- La suscettibilità a interferenze acustiche, autofluorescenza e torbidità, che alterano lo spettro Raman rilevato
- La produzione di un segnale intrinsecamente debole

Pertanto, nel corso degli anni si è osservato un lavoro di ricerca intensivo per minimizzare o compensare tali problemi, che ha portato allo sviluppo di diverse tecniche Raman avanzate, come la spettroscopia Raman a risonanza, la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie e la spettroscopia Raman potenziata con punta.

Figura 3.3: dispositivo sperimentale di monitoraggio tramite spettroscopia Raman

3.2. Problematiche nell'applicazione pratica della spettroscopia Raman

Ci sono diversi ostacoli all'accuratezza e alla precisone delle misurazioni di glucosio non invasive basate sulla spettroscopia Raman, alcuni dei quali sono dovuti a fattori fisiologici. Di seguito verranno discussi questi problemi e le tecniche che sono state sviluppate nel corso degli anni per minimizzarne l'effetto sulla rilevazione. Più nel dettaglio, verranno trattati:

- L'interferenza dell'acqua e degli emocomponenti incontrati dalla radiazione
- L'interferenza dovuta al segnale di autofluorescenza delle proteine
- La debolezza intrinseca del segnale Raman prodotto

3.2.1. Interferenza dell'acqua e degli emocomponenti

Il glucosio costituisce unicamente una piccola percentuale del volume totale di sangue. Pertanto, nello studio della radiazione diffusa non è possibile trascurare l'effetto di scattering operato da molecole differenti come l'acqua o altri emocomponenti. Infatti, quest'ultime sono presenti in quantità maggiori del glucosio nel flusso ematico, partecipando in maggior misura alla dispersione della radiazione. Per studiarne le tecniche di rimozione, è più conveniente valutare separatamente l'acqua dagli altri emocomponenti.

L'effetto interferente dovuto all'acqua può essere trattato scegliendo un'opportuna lunghezza d'onda per la radiazione utilizzata. Come discusso precedentemente, l'intensità dello spettro Raman dipende sia dalla concentrazione molecolare dei tessuti attraversati che dalla frequenza utilizzata. In particolare, maggiore risulta la lunghezza d'onda della luce incidente, maggiore sarà l'altezza dei picchi nel segnale Raman misurato. Pertanto, la scelta migliore risulta l'utilizzo di radiazioni a bassa frequenza, appartenenti quindi alla banda MIR. In tal caso però si osserverebbe un assorbimento rilevante della luce da parte dell'acqua, riducendo così la profondità di penetrazione. Di conseguenza, la radiazione elettromagnetica sarebbe incapace di raggiungere gli strati più profondi, a maggior concentrazione ematica, con elevata intensità. Allora, nella spettroscopia Raman si utilizza tipicamente una radiazione luminosa appartenente

alla ragione a basse frequenze della banda NIR, in modo tale da garantire sia un'elevata profondità di penetrazione che un segnale Raman misurato sufficientemente ampio. Inoltre, utilizzando luce NIR, si osserva che lo spettro Raman dell'acqua è molto debole e, quindi, ha un effetto minimo sulla misura della glicemia. Infine, la scelta di una radiazione monocromatica nella banda near infrared fa sì che lo spostamento Raman dovuto all'allungamento del legame O-H della molecola d'acqua sia di 3400 cm^{-1}, quindi facilmente distinguibile dalle modalità vibrazionali che consentono il riconoscimento del glucosio.

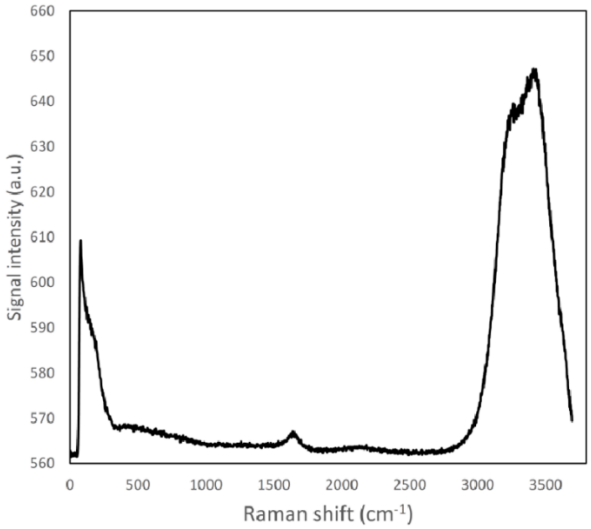

Figura 3.4: spettro Raman dell'acqua

Oltre all'acqua, vi è da considerare l'effetto interferente dovuto agli altri emocomponenti, presenti nel flusso sanguigno in concentrazioni maggiori rispetto al glucosio. Lo spettro Raman del sangue presenta dei picchi evidenti a specifici valori di numero d'onda, compresi fra i 650 cm^{-1} e i 1660 cm^{-1}, per effetto dello scattering Raman operato dalle diverse molecole del flusso ematico. Siccome il glucosio rappresenta una piccola parte del volume totale di sangue, allora costituisce anche una piccola porzione delle ampiezze dei picchi nel segnale Raman. Pertanto, risulta più complicato estrarre informazioni sui livelli di glicemia dallo spettro Raman, in quanto le altezze dei picchi saranno proporzionali alla concentrazione molecolare di più componenti del sangue. Per ovviare al problema ed estrarre informazioni utili sulla concentrazione ematica di glucosio è necessaria l'analisi multivariata del segnale rilevato. I metodi di analisi che possono essere applicati allo spettro Raman includono: la regressione parziale dei minimi quadrati, l'analisi dei componenti principali, la macchina vettoriale di supporto e reti neurali artificiali di retropropagazione. In particolare, i primi due sono impiegati come tecniche di compressione dei dati mentre gli ultimi due sono utilizzati per ricavare relazioni lineari o non lineari tra la concentrazione di glucosio e lo spettro misurato. In questo modo, con una elaborazione più complessa del segnale, è possibile ricavare informazioni sui livelli di glicemia del soggetto nonostante l'effetto interferente degli emocomponenti.

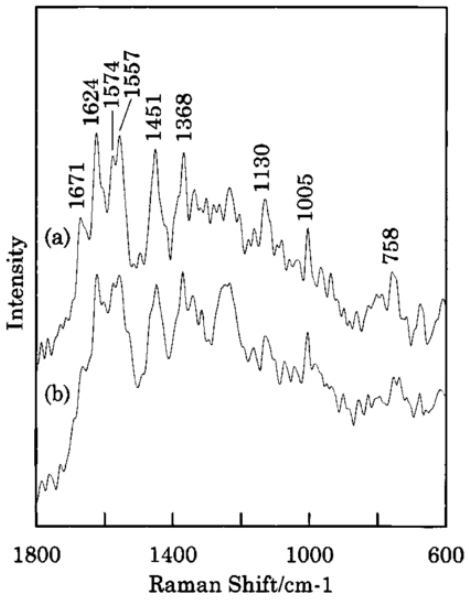

Figura 3.5: spettri Raman di sangue (a) e di emoglobina (b)

3.2.2. Segnale di fluorescenza delle proteine

Fra gli emocomponenti, le proteine del sangue hanno un altro effetto interferente sugli spettri Raman. Infatti, quest'ultime sono capaci di emettere un segnale di fluorescenza di fondo quando vengono colpite dalla radiazione luminosa, a causa di una serie di transizioni elettroniche che verranno discusse meglio nel seguito. Il problema principale di tale fenomeno riguarda il fatto che il segnale fluorescente prodotto presenta un'intensità maggiore o uguale a quella del segnale Raman. Pertanto, rappresenta una componente di rumore che maschera lo spettro rilevato, rendendo più complicata l'estrazione di informazioni utili sui livelli di glucosio.

Si può osservare che un aumento della lunghezza d'onda della radiazione prodotta dalla sorgente luminosa comporta una riduzione del segnale di fluorescenza. Quindi, utilizzando luce appartenente all'estremità inferiore della banda NIR, cioè a bassa freqeunza, è possibile minimizzare il problema, mantenendo anche i vantaggi prima discussi riguardo l'effetto interferente dell'acqua. Un risultato ancora migliore è possibile mediante l'utilizzo di più lunghezze d'onda. Infatti, un piccolo cambiamento di frequenza della sorgente luminosa non influenza significativamente lo spettro di fluorescenza, mentre l'impronta digitale del glucosio sullo spettro Raman si sposterà. Pertanto, utilizzando due sorgenti con lunghezze d'onda diverse ma vicine e valutando il segnale differenziale è possibile rimuovere il contributo indesiderato del segnale di fluorescenza, poiché circa uguale in entrambi, lasciando unicamente lo spettro Raman, da cui si possono ricavare le informazioni di interesse sulla glicemia.

Bisogna anche considerare che le proteine sono presenti sia nel sangue che nel tessuto cutaneo attraversato dalla radiazione e possono dar luogo, in ugual misura, alla genesi di un segnale indesiderato di fluorescenza. Una soluzione per evitare le interferenze proteiche nella pelle è misurare la concentrazione di glucosio, mediante spettroscopia Raman, all'interno della camera anteriore dell'occhio. In questo modo si evita completamente la presenza di segnali di fluorescenza dovuti a proteine nel tessuto cutaneo. Le misurazioni oculari però richiedono di una sorgente luminosa a potenza inferiore, e questo risulta un problema evidente poiché si traduce in un rapporto segnale/rumore inferiore. Pertanto, sarà necessario lo sviluppo di

tecniche di elaborazione che permettano di rimuovere o trattare il rumore in misura maggiore sulle rilevazioni effettuate a livello dell'occhio.

3.2.3. Debole intensità dei segnali Raman

L'effetto Raman interessa solamente una piccola percentuale della radiazione diffusa. Pertanto, i segnali associati allo scattering Raman sono più deboli rispetto ai picchi di intensità associati allo scattering elastico. Inoltre, la bassa percentuale di glucosio nel sangue rispetto ad altre molecole diffusive rende la spettroscopia Raman meno sensibile e selettiva. Infatti, la presenza di segnali intrinsecamente deboli aumenta la pericolosità degli effetti interferenti dovuti agli emocomponenti e rende più difficile l'estrazione delle informazioni utili sulla glicemia. Quindi, nel corso degli anni sono state sviluppate diverse tecniche che permettono di migliorare la sensibilità della spettroscopia Raman, come la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie.

La spettroscopia Raman potenziata dalla superficie, spesso abbreviata in SERS, è stata sviluppata a metà degli anni Settanta. Tale tecnica eredita tutti i vantaggi della spettroscopia Raman classica, come spettri di assorbimento unici per le diverse molecole e picchi a banda stretta, ma permette anche di superarne i limiti intrinsechi, quali segnali deboli e scarsa sensibilità. Pertanto, negli ultimi anni è stata svolta molta ricerca e sperimentazione ai fini di poter applicare la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie al monitoraggio non invasivo del glucosio. Di seguito verranno discussi i principi fisici su cui si basa la SERS e le metodologie di applicazione della tecnica al rilevamento della glicemia.

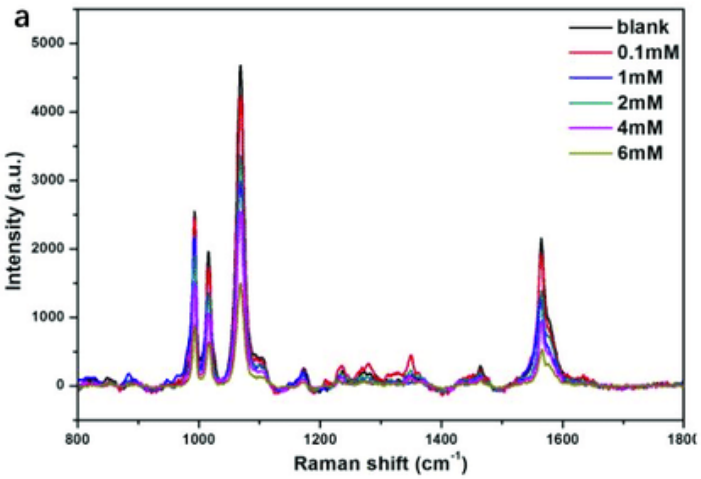

Figura 3.6: spettro SERS del glucosio a diversa concentrazione

La spettroscopia Raman potenziata dalla superficie prevede l'utilizzo di varie nanostrutture metalliche per l'aumento dell'intensità dello spettro Raman. Ci sono due meccanismi di interesse responsabili dei segnali Raman potenziati: il potenziamento elettromagnetico e il potenziamento chimico, rispettivamente abbreviati in EM ed EC.

Il meccanismo EM contribuisce in misura maggiore al miglioramento totale dell'intensità dello spettro Raman, con un aumento compreso fra i 4 e gli 11 ordini di grandezza. Ciò che sta alla base del potenziamento elettromagnetico è un fenomeno fisico che interessa i substrati metallici quando colpiti da una radiazione luminosa, noto come risonanza plasmonica di superficie localizzata (abbreviata comunemente in LSPR). I plasmoni sono oscillazioni coerenti della nube elettronica. In condizioni di assenza di eccitazione esterna, gli elettroni liberi sono uniformemente distribuiti sul volume del substrato. L'interazione con la radiazione luminosa

nella banda infrarossa (più nel dettaglio nella banda NIR) fa si che la nube elettronica si sposti dallo stato stazionario e dia luogo alle oscillazioni plasmoniche. Questo fenomeno si traduce in un'amplificazione del campo elettromagnetico della radiazione, che sarà tanto maggiore quanto più sono simili la frequenza del plasmone e la frequenza della luce incidente. Pertanto, si osserverà un'amplificazione massima quando ci si trova in condizioni di risonanza fra l'oscillazione plasmonica e la radiazione. Anche il segnale di scattering Raman prodotto dalle molecole che si trovano a poche decine di nanometri dal substrato subisce un aumento di intensità, il quale però difficilmente potrà essere massimo. Infatti, per definizione, la luce diffusa Raman presenta una frequenza diversa dalla luce incidente. Ciononostante, è possibile osservare un aumento del segnale Raman di 10^6 volte per solo effetto del potenziamento elettromagnetico.

Un altro contributo di amplificazione al segnale di interesse è dato dal potenziamento chimico. Il meccanismo EC si osserva a seguito della formazione di interazioni chimiche tra le molecole del campione e la superficie metallica. Di conseguenza, si porta alla formazione di uno stato di trasferimento di carica fra il substrato metallico e i componenti del tessuto analizzato, che può essere eccitato in modo risonante dalla luce incidente. Questo si traduce in un potenziamento del segnale Raman di 10^1-10^3 volte, quindi relativamente minore rispetto all'aumento fornito dal fenomeno EM. Inoltre, è importante sottolineare che il meccanismo EC è presente unicamente in specifici casi in cui si può osservare l'interazione molecola-metallo.

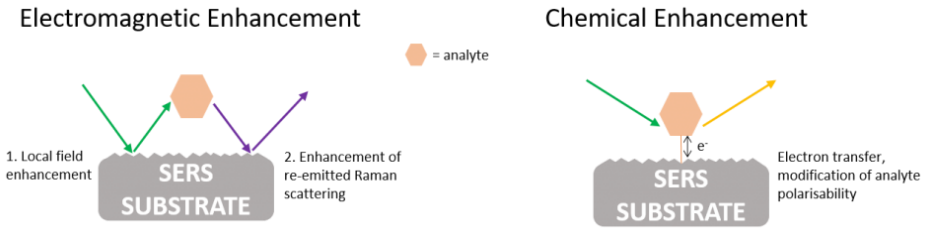

Figura 3.7: rappresentazione schematica del potenziamento elettromagnetico e chimico

È possibile quantificare il miglioramento ottenuto rispetto alla spettroscopia Raman classica definendo un fattore di miglioramento totale (*EF*) che comprenda il contributo di entrambi i meccanismi di potenziamento. Una comune definizione che permette di calcolare l'indice di interesse attraverso semplici dati sperimentali è la seguente:

$$EF = \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{SERS}}}{\frac{I_{NR}}{N_{NR}}}$$

dove I_{SERS} e I_{NR} sono le intensità dello spettro Raman ottenute rispettivamente con la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie e la spettroscopia Raman classica e N_{SERS} e N_{NR} sono il numero medio di molecole diffusive nel volume attraversato dalla radiazione per la SERS e la spettroscopia Raman normale.

Per quanto discusso fino ad ora è possibile concludere che la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie è estremamente dipendente dal substrato utilizzato. Infatti, il fenomeno di potenziamento del segnale Raman è dovuto all'interazione fra la luce incidente e lo strato scelto. Ricordando che nella spettroscopia Raman si lavora nella banda NIR allora è preferibile l'uso di substrati metallici quali oro, argento e rame, poiché presentano una frequenza di

risonanza plasmonica compresa fra la banda visibile e la banda infrarossa. Inoltre, ai fini di massimizzare il potenziamento del segnale è preferibile l'utilizzo di superfici irregolari, preparate al giorno d'oggi tramite deposizione di nanoparticelle metalliche su un substrato regolare. La forma e la dimensione delle irregolarità influenzano significativamente la forza dell'amplificazione poiché influiscono sul rapporto tra gli eventi di assorbimento e gli eventi di dispersione subiti dalla radiazione nel substrato. Pertanto, la scelta della grandezza delle asperità, del materiale metallico utilizzato e dello spessore della superficie sono fondamentali per poter ottenere un potenziamento massimo dello spettro Raman.

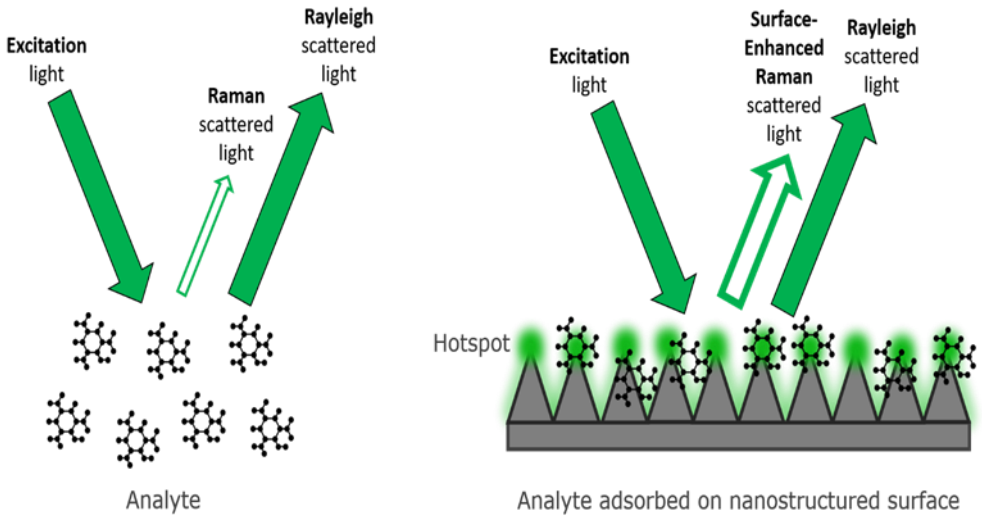

Figura 3.8: rappresentazione schematica del potenziamento indotto dalla SERS

Esistono due sfide principali che devono essere superate per poter applicare la spettroscopia Raman potenziata dalla superficie al monitoraggio della glicemia: la bassa sezione trasversale Raman del glucosio e lo scarso adsorbimento del glucosio sulla superficie del substrato metallico nudo. Infatti, il segnale Raman prodotto per effetto dello scattering Raman operato dal glucosio è molto debole e, quindi, facilmente oscurato da rumori di fondo provenienti dall'ambiente esterno. Inoltre, essendo un carboidrato ha una bassa affinità di legame sulle superfici metalliche nude, facendo sì che ci sia una maggior distanza fra la molecola e la superficie. Questo riduce sensibilmente il potenziamento possibile per lo spettro Raman di interesse. Per risolvere tali sfide sono stati proposti diversi approcci che si basano su idee e tecnologie differenti. Per l'identificazione di molte piccole molecole tramite la SERS è stato prevalentemente utilizzato il metodo intrinseco. Tale rilevamento diretto, chiamato anche rilevamento senza etichetta, si basa sull'ottenimento di spettri Raman con picchi unici per l'analita mediante lo sviluppo di opportuni materiali plasmonici con hotspot migliorati. Quest'ultimi sono regioni specifiche sul substrato metallico, quali lacune, fessure o caratteristiche strutturali particolari, ove si verifica una LSPR nella regione dal visibile al vicino infrarosso. In alternativa, il metodo intrinseco propone di realizzare substrati ingegnerizzati in modo da aumentare l'affinità di legame fra il glucosio e il metallo, diminuendo la distanza fra la molecola e la superficie, ma senza che si formi alcuna interazione chimica effettiva. Di conseguenza, si ottengono segnali Raman più ampi e, quindi, un maggior potenziamento dello spettro Raman. Ciononostante, dati i due problemi prima riportati, per il monitoraggio del glucosio attraverso SERS è preferibile il metodo estrinseco. Il rilevamento indiretto si basa sull'utilizzo di una molecola legata alla superficie plasmonica, detta sonda Raman, che reagisce chimicamente con l'analita di interesse. I cambiamenti chimici indotti dall'analita alla sonda provocano delle differenze misurabili nel segnale Raman per alcuni o per

tutti i modi vibrazionali. In questo modo, rilevando le variazioni nello spettro, è possibile ottenere un monitoraggio efficiente della glicemia, poiché le alterazioni del segnale della sonda dipendono dalla concentrazione di glucosio.

Per affrontare le sfide del rilevamento del glucosio attraverso la SERS sono state sviluppate diverse tecnologie per il substrato utilizzato, che permettono di implementare i metodi di monitoraggio intrinseco ed estrinseco ottenendo i risultati migliori possibili. Senza voler entrare nei dettagli di tali tecniche, si ricordano:

- La piattaforma attiva SERS, che si basa sull'utilizzo di specifici e particolari substrati, dal punto di vista strutturale e della composizione, per ovviare al problema della bassa sezione trasversale del glucosio
- La superficie funzionalizzata dallo strato divisorio, che sfrutta uno strato di partizione fra il substrato metallico e il tessuto per portare il glucosio più vicino possibile al metallo, in modo da aumentare il potenziamento del segnale
- I sensori a base di acido boronico, che sfruttano tale composto per il rilevamento estrinseco, data la sua forte capacità di interagire sia con la superficie metallica che con il glucosio
- I biosensori basati sulla reazione enzimatica, che sfruttano la presenza di glucosio ossidasi sul substrato metallico per catalizzare la reazione di ossidazione del glucosio in presenza di ossigeno

Nonostante i risultati promettenti nel superamento delle sfide del monitoraggio non invasivo del glucosio mediante SERS, tali metodi sono ancora in fase di studio e perfezionamento. Infatti, si possono riscontrare problemi di riproducibilità e affidabilità della misura, che devono essere necessariamente risolti prima di poter avere un'applicazione pratica. Il costante sviluppo però nell'ambito dello studio dei materiali e nell'ingegnerizzazione dei substrati ha già permesso di ottenere importanti miglioramenti nella qualità della misura.

CAPITOLO 4:
SPETTROSCOPIA FLUORESCENTE

Oltre alle tecniche spettroscopiche basate sulla misura dell'assorbimento e della dispersione subiti dalla radiazione luminosa, esistono metodi di monitoraggio che si fondano sull'emissione di luce a specifica lunghezza d'onda dall'analita di interesse. Fra queste si ricorda la spettroscopia fluorescente, che, come suggerisce il nome, si basa sul fenomeno di fluorescenza. Data la maggior sensibilità e specificità rispetto agli altri metodi e lo sviluppo nell'ambito dello studio dei nanomateriali, tale tecnica è diventata il fulcro di un intensivo lavoro di ricerca dall'inizio del ventunesimo secolo. Di seguito verranno trattati i principi fisici della spettroscopia fluorescente, la sua applicazione al monitoraggio della glicemia e i principali nanomateriali che vengono utilizzati.

4.1. Principi fisici e applicazione al monitoraggio

La spettroscopia fluorescente fonda il suo funzionamento sul fenomeno fisico di fluorescenza, che interessa una serie di molecole, dette fluorofori, presenti anche nel corpo umano. Questi composti sono capaci di emettere luce ad una specifica lunghezza d'onda quando vengono colpiti da una radiazione luminosa a diversa frequenza. Più nel dettaglio, il fluoroforo colpito assorbe dalla radiazione incidente l'energia sufficiente per portarsi ad un livello eccitato. A seguito del decadimento della molecola dallo stato di energia superiore allo stato stazionario iniziale si osserva l'emissione di fotoni ad una specifica frequenza, associata al salto energetico compiuto dal composto. Questo fenomeno di rilassamento molecolare prende anche il nome di fenomeno di rilassamento della radiazione e comporta fluorescenza e fosforescenza per effetto dell'emissione di energia sotto forma di fotoni. La radiazione emessa da parte del fluoroforo presenta una diversa lunghezza d'onda, tipicamente maggiore, rispetto alla radiazione incidente e la differenza fra le due prende il nome di spostamento Stokes. Siccome ciascuna molecola fluorescente emette radiazione ad una specifica frequenza, poiché caratterizzata da spettri di assorbimento e di emissione ben precisi e unici, allora è possibile sfruttare la misura dello spostamento indotto per l'identificazione molecolare. Bisogna però tenere in considerazione che le proprietà di fluorescenza delle molecole variano con la lunghezza d'onda della luce incidente. Pertanto, sarà sempre possibile definire un valore ottimale di frequenza della radiazione utilizzata che consente di ottenere la massima intensità possibile per il fenomeno di fluorescenza. Inoltre, la luce emessa presenta anche delle proprietà, quali l'intensità e il tempo di decadimento, che variano con la concentrazione dell'analita fluorescente di interesse. Questo permette di applicare la tecnica al monitoraggio non invasivo della glicemia.

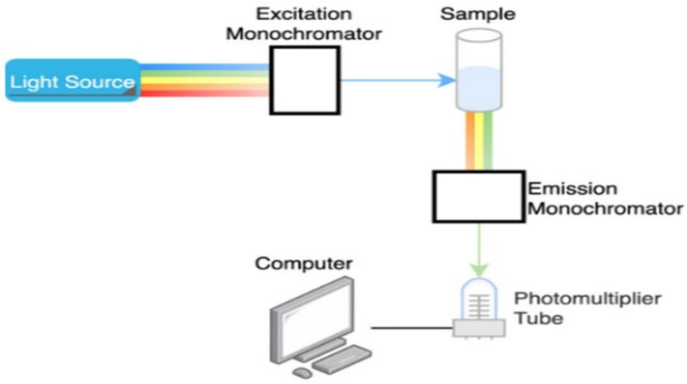

Figura 4.1: rappresentazione schematica della spettroscopia fluorescente

Diversi studi hanno dimostrato che anche il glucosio è capace di emettere luce fluorescente se esposto alla luce visibile o ultravioletta (UV). Tuttavia, il segnale prodotto presenta diversi problemi che rendono più complesso l'utilizzo della misura per ricavare informazioni utili sulla glicemia, primo fra tutti un'elevata suscettibilità alle interferenze. Una soluzione al problema potrebbe essere l'utilizzo di fluorofori esogeni che si leghino alla molecola di glucosio permettendo di aumentare il segnale di fluorescenza e, quindi, migliorare la misura. Nonostante alcune molecole fluorescenti possono legarsi direttamente all'analita in esame, problemi relativi alla bassa selettività della misura e all'irreversibilità dell'interazione hanno portato allo sviluppo di tecniche alternative. In particolare, per misurare la concentrazione di glucosio, si è proposto un metodo di etichettatura fluorescente che prevede l'utilizzo di molecole intermedie dette recettori. Tali composti ingegnerizzati sono capaci di legarsi più efficacemente alla molecola di interesse e, per effetto di tali interazioni, vanno incontro a cambiamenti reversibili nelle loro proprietà locali che portano ad un aumento del segnale di fluorescenza prodotto. Inoltre, esistono recettori di diverso tipo e natura, tra cui enzimi, derivati dell'acido boronico, proteine leganti il glucosio e persino materiali sintetici, che verranno discussi più nel dettaglio a seguito. L'ampia varietà di possibili materiali consente di poter effettuare la scelta più opportuna per ottimizzare la misura. L'utilizzo di queste molecole intermedie consente l'implementazione di diverse tecniche fluorescenti e permette di ottenere parametri di monitoraggio su un più ampio intervallo spettrale, dall'ultravioletto al vicino infrarosso. Quest'ultimo è un vantaggio non indifferente rispetto alla spettroscopia fluorescente senza recettori, poiché evita di dover necessariamente utilizzare una sorgente luminosa UV, ionizzante e quindi pericolosa per il paziente, per ottenere un segnale di fluorescenza dal glucosio. Infine, è importante sottolineare che i metodi per il monitoraggio del glucosio tramite spettroscopia fluorescente si differenziano in due categorie principali: i metodi indiretti e i metodi diretti. I primi si basano su nanomateriali sensibili al perossido di ossigeno (H_2O_2), prodotto dalla reazione di ossidazione del glucosio. Pertanto, accoppiando il materiale con l'enzima glucosio ossidasi (GOx), o con sistemi di emulazione, è possibile la quantificazione dei livelli di glicemia sulla base del segnale di fluorescenza prodotto. Infatti, la sua intensità e il suo tempo di decadimento dipendono dalla quantità di perossido rilevato, che è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio, poiché prodotto della reazione di ossidazione. I metodi diretti invece sfruttano recettori non enzimatici per una misura diretta del glucosio. In particolare, l'aumento di concentrazione di glucosio porta ad una inibizione del legame fra il recettore e il fluoroforo esogeno, causando un aumento di intensità nel segnale di fluorescenza. Sulla base di ciò è poi possibile risalire alla misura dei livelli di glicemia.

Tra le diverse tecniche permesse dall'utilizzo di recettori, il trasferimento di energia risonante a fluorescenza ha ricevuto molta attenzione negli ultimi anni. Questo è un metodo basato su un fenomeno fisico detto trasferimento di energia risonante di Förster, spesso abbreviato in FRET, che sfrutta il passaggio di energia fra due molecole sensibili alla luce, chiamate donatore e accettore. Più nel dettaglio, il fluoroforo donatore viene colpito dalla radiazione luminosa ad una specifica lunghezza d'onda, tipicamente quella relativa al picco di assorbimento. A seguito dell'eccitazione subita, la molecola è in grado di emettere luce fluorescente secondo il suo spettro di emissione. Però, se lo spettro di emissione del donatore è sovrapposto in modo consistente allo spettro di assorbimento dell'accettore, si osserva un passaggio risonante di energia fra i due. Pertanto, sarà quest'ultimo ad emettere una radiazione luminosa alla sua lunghezza d'onda caratteristica. Affinché si possa osservare il fenomeno è fondamentale che le molecole accoppiate soddisfino ad alcuni requisiti. Questo implica che non tutte le coppie possibili di fluorofori possono essere utilizzati per il FRET. Innanzitutto, è necessario che vi sia una sovrapposizione ampia fra lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di assorbimento dell'accettore, in modo tale da dar luogo al trasferimento. Inoltre, è importante che i due spettri della prima molecola colpita dalla radiazione non siano

sovrapponibili, altrimenti si verificherebbe un fenomeno di auto-trasferimento di energia. Poi, è richiesto che non vi sia alcun tipo di sovrapposizione fra lo spettro di emissione del donatore e dell'accettore. Infatti, nonostante il trasferimento di energia, si verifica comunque la produzione di un segnale di fluorescenza da parte del primo fluoroforo colpito. Pertanto, una sovrapposizione degli spettri di emissione darebbe luogo ad un elevato rumore di fondo sul segnale emesso dall'accettore. Infine, anche la concentrazione in soluzione delle due molecole influenza il FRET e, quindi, dev'essere accuratamente controllata. È possibile dimostrare che i risultati migliori sono ottenibili quando si osserva una concentrazione limitata di donatore ed una concentrazione molto elevata di accettore.

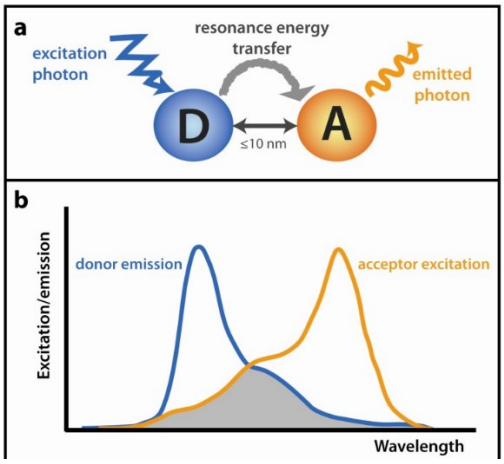

Figura 4.2: rappresentazione schematica del fenomeno di FRET (a) e spettri di emissione del donatore e di eccitazione dell'accettore (B)

Posti il fluoroforo esogeno e il recettore come rispettivamente donatore e accettore, il trasferimento di energia risonante a fluorescenza può essere utilizzato come metodo diretto per il monitoraggio non invasivo della glicemia. Quando il glucosio si lega al recettore induce delle alterazioni conformazionali sulla molecola, che si ripercuotono a livello del trasferimento energetico. Infatti, l'interazione fra l'analita di interesse e l'accettore modifica la relazione spaziale fra i due fluorofori. Siccome l'efficienza del processo FRET è altamente dipendente dalla distanza fra le due molecole suscettibili alla luce, allora si osserva un aumento o una diminuzione nel trasferimento di energia. Questo si ripercuote sull'intensità e sul tempo di decadimento del segnale fluorescente emesso dal donatore e dall'accettore. Quindi, mediante una misura di tali variazioni indotte è possibile il monitoraggio non invasivo della glicemia, poiché proporzionali alla concentrazione di glucosio.

Nella precedente discussione si è spesso parlato sia di intensità che di tempo di decadimento del segnale di fluorescenza per la misurazione dei livelli di glicemia. Infatti, il monitoraggio della radiazione fluorescente può essere effettuato attraverso il rilevamento di entrambi. Tuttavia, la misura del tempo di decadimento è preferita, poiché la durata del fenomeno di fluorescenza è specifica per ciascuna molecola. Questo consente la differenziazione delle sostanze anche quanto emettono luce fluorescente alla medesima lunghezza d'onda. Inoltre, a differenza dell'intensità, che risulta altamente influenzata dai fenomeni di scattering, la durata dell'evento di fluorescenza può essere misurata con precisione anche nei mezzi di dispersione. Pertanto, la tecnologia fluorescente basata sul rilevamento del tempo di decadimento è stata studiata intensivamente negli ultimi anni, poiché ideale per i dispositivi di monitoraggio del glucosio transdermici.

In conclusione, la spettroscopia fluorescente è una tecnica di monitoraggio non invasivo che si basa sulla rilevazione di luce fluorescente emessa da particolari molecole dette fluorofori. Tra i diversi vantaggi che tale metodo presenta, si ricordano:

- L'elevata sensibilità a basse concentrazioni di glucosio, che consente anche il rilevamento di singole molecole
- L'elevata specificità dovuta alle proprietà ottiche uniche delle molecole, che emettono segnali fluorescenti a lunghezze d'onda specifiche
- La possibilità di misurare le concentrazioni degli analiti sia mediante il rilevamento dell'intensità che mediante il rilevamento del tempo di decadimento del segnale
- L'immunità ai fenomeni di diffusione della radiazione quanto si sfrutta la durata del fenomeno di fluorescenza per le misure di interesse

Ciononostante, la spettroscopia fluorescente presenta anche una serie di difetti che ne limitano l'applicabilità alla produzione di sensori per il monitoraggio. Pertanto, la tecnica è ancora al centro di molteplici lavori di ricerca, che si pongono l'obbiettivo di superare le principali problematiche riscontrate nel tempo. Tra gli svantaggi più evidenti della spettroscopia fluorescente, si ricordano:

- La suscettibilità del segnale a interferenze dovute a variazioni del pH e dei livelli di ossigeno
- I potenziali problemi di tossicità dovuti all'utilizzo di materiali estranei al mezzo biologico
- La breve emivita del fluoroforo, che aumenta notevolmente i costi della strumentazione
- La suscettibilità a fenomeni di autofluorescneza, che alternano il segnale rilevato minando la veridicità della misura
- L'utilizzo di radiazioni nella banda ultravioletta, che sono ionizzanti e, quindi, potenzialmente pericolose per il soggetto

Inoltre, va anche considerato il fatto che ad oggi è possibile unicamente misurare i segnali di fluorescenza del glucosio da fluidi corporei isolati, quali lacrime e sudore, che sono scarsamente correlati con la glicemia. Tali misure soffrono anche di un basso rapporto segnale-rumore e di isteresi del rilevamento, che rende la misura non riproducibile.

4.2. Materiali fluorofori per il rilevamento del glucosio

Come già discusso precedentemente, il rilevamento del glucosio tramite spettroscopia fluorescente richiede di fluorofori esogeni e recettori. Fra i diversi vantaggi offerti dal loro utilizzo si ricorda la possibilità di ottenere parametri per il monitoraggio su un più ampio intervallo spettrale, dall'ultravioletto al vicino infrarosso. L'utilizzo di una radiazione luminosa appartenente alla banda NIR permette una minor invasività della misura e una maggior profondità di penetrazione. Ciononostante, le proprietà della rilevazione, quali sensibilità e selettività, sono fortemente influenzate dal fluoroforo esogeno scelto. Grazie alle loro particolari proprietà fisiche e chimiche, i nanomateriali sono composti molto promettenti per lo sviluppo di sensori in vivo della glicemia. Secondo la definizione adottata, quest'ultimi sono materiali che devono soddisfare a due principali proprietà. Infatti, per essere definiti tali, i nanomateriali devono avere caratteristiche morfologiche su nanoscala e possedere particolari proprietà dipendenti dalle loro dimensioni. Di seguito verranno riportati e discussi i principali nanomateriali utilizzati per il rilevamento della concentrazione di glucosio.

I punti di carbonio, spesso abbreviati in CD dall'inglese carbon dots, sono nanoparticelle di carbonio ibridizzato sp^3 con forma sferica di dimensione compresa fra 1 e 10 nm. Questi nanomateriali sono spesso utilizzati per i metodi diretti e indiretti di monitoraggio del glucosio mediante spettroscopia fluorescente, poiché presentano alta biocompatibilità, bassa tossicità ed emissione di luce fluorescente non lampeggiante. Pertanto, nel corso degli anni sono stati sviluppati molti metodi di sintesi dei CD a partire da diversi precursori del carbonio o da specifiche molecole

dopanti. Inoltre, si è riscontrata una notevole potenzialità nella funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle. Mediante l'aggiunta di gruppi carbonilici e ossidrilici alla superficie dei CD è possibile incentivare la formazione di legami specifici con l'analita di interesse, consentendo l'applicazione dei punti di carbonio al rilevamento di un numero molto maggiore di molecole. In particolare, nei metodi indiretti di monitoraggio della glicemia le nanoparticelle sono utilizzate per il rilevamento del perossido di idrogeno, la cui concentrazione dipende da quella dell'analita di interesse. Infatti, la reazione tra H_2O_2, prodotto dell'ossidazione del glucosio, e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) presenti sulla superficie del materiale utilizzato danno luogo ad una diminuzione dell'intensità della fluorescenza prodotta dal nanomateriale, fenomeno noto come quenching della radiazione. Sulla base dello smorzamento ottenuto è possibile risalire alla concentrazione di perossido di idrogeno e, quindi, alla concentrazione di glucosio in soluzione. Di contro, nei metodi diretti di monitoraggio della glicemia i CD sono preparati in modo tale da reagire direttamente con la molecola di interesse. In questo caso, i punti di carbonio sono preparati tramite carbonizzazione idrotermale utilizzando l'acido fenilboronico come precursore, che permette di ottenere le proprietà desiderate per l'interazione diretta con l'analita ricercato. Infatti, la presenza di glucosio porta alla formazione di legami chimici fra quest'ultimo e i residui di acido boronico presenti sulla superficie dei CD, che provocano il quenching della loro fluorescenza. Ancora una volta, lo smorzamento indotto può essere espresso come funzione della concentrazione di glucosio, permettendo di monitorare i livelli di glicemia del paziente.

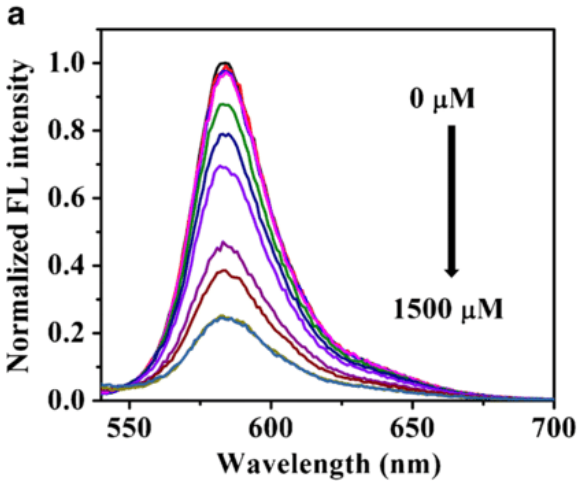

Figura 4.3: spettri normalizzati di fluorescenza a diverse concentrazioni di glucosio in presenza di CD

Un altro esempio di nanomateriale utilizzato nel monitoraggio della glicemia mediante spettroscopia fluorescente è dato dai punti quantici, spesso chiamati QD dall'inglese quantum dots. Questi sono nanoparticelle a semiconduttore fluorescente caratterizzate da elevate rese quantistiche e dalla presenza del fenomeno di confinamento quantistico. Inoltre, i punti quantici presentano proprietà ideali per l'applicazione alla spettroscopia fluorescente, come bande di emissione strette, ampi spettri di assorbimento e grande spostamento Stokes. Però, il loro costo elevato e l'alta tossicità intrinseca rappresentano due limiti evidenti che ne impediscono l'applicazione pratica su larga scala. A differenza dei CD, nei metodi di monitoraggio indiretti basati sui punti quantici può essere sfruttato sia il fenomeno di quenching che l'aumento di intensità della fluorescenza prodotta. Nel primo caso si sfrutta ancora una volta il rilevamento del perossido di idrogeno, che, legandosi con i QD, produce uno smorzamento della radiazione dipendente dalla concentrazione del glucosio. Nel secondo caso, invece, si sfrutta il trasferimento di elettroni ai semiconduttori risultante dalla reazione di ossidazione del glucosio, che induce un aumento dell'intensità del segnale fluorescente

per spontanea ricombinazione delle coppie elettrone-lacuna nel materiale. L'incremento della fluorescenza è poi proporzionale alla concentrazione in soluzione dell'analita di interesse, permettendo così di ricavare informazioni utili sui livelli di glicemia. Nonostante vengano difficilmente utilizzati per il monitoraggio diretto a causa della scarsa sensibilità ottenibile, i QD possono essere funzionalizzati superficialmente per legare direttamente con il glucosio. In particolare, tramite l'utilizzo di stabilizzatori e agenti di accoppiamento, è possibile legare alla superficie dei punti quantici molecole di concanavalina A (spesso abbreviata in ConA), che a loro volta interagiscono chimicamente con l'analita di interesse. Tali interazioni portano al quenching della fluorescenza; pertanto, mediante la misura dello smorzamento indotto è possibile risalire alla concentrazione di glucosio.

Un'alternativa ai punti quantici a semiconduttore è data dai punti quantici di grafene, spesso abbreviati in GQD dall'inglese graphene quantum dots. Questi sono nanoparticelle a forma di disco costituite da uno o pochi strati di grafene, con dimensioni comunemente comprese tra 2 e 30 nm. A differenza dei QD, i punti quantici di grafene presentano bassa tossicità, stabilità chimica e fisica, fotoluminescenza stabile e un pronunciato effetto di confinamento quantistico, che li rende ideali per le applicazioni biologiche. Inoltre, l'emissione di fluorescenza dei GQD si estende su un ampio intervallo spettrale, dall'ultravioletto all'infrarosso. Dal punto di vista applicativo, sia nei metodi diretti che nei metodi indiretti di monitoraggio del glucosio si sfrutta il fenomeno di quenching della fluorescenza prodotta dai punti quantici di grafene, indotto dall'interazione attiva o passiva dell'analita di interesse con le nanoparticelle utilizzate. Recenti studi hanno permesso di ottenere GQD funzionalizzati superficialmente con acido boronico, rinominati BGQD, mediante una tecnica di taglio a specifica temperatura del grafene drogato con boro. Tali nanoparticelle permettono di sfruttare una strategia alternativa per il monitoraggio diretto del glucosio. Infatti, l'interazione dell'analita di interesse con i residui di acido boronico sulla superficie dei punti quantici di grafene induce un aumento di intensità del segnale di fluorescenza, che è linearmente proporzionale con la concentrazione di glucosio, consentendo il rilevamento dei livelli di glicemia.

Altri esempi notevoli di nanomateriali utilizzati per la spettroscopia fluorescente sono: le nanoparticelle di argento (AgNP), le nanoparticelle di oro (AuNP) e le nanoparticelle drogate con lantanidi, spesso chiamate con il termine inglese upconversion nanoparticles (UCNP). Similmente ai materiali prima discussi, vengono implementati nei metodi diretti e indiretti di monitoraggio del glucosio, grazie alla loro capacità di emettere radiazione fluorescente. Più in particolare si sfruttano le alterazioni nel segnale di fluorescenza emesso per effetto dell'interazione con l'analita di interesse, dalla cui misura è possibile il rilevamento della glicemia.

In conclusione, la spettroscopia fluorescente per il monitoraggio della glicemia si è rilevata una degna alternativa alle tecniche spettroscopiche basate sull'assorbimento e sulla dispersione. Inoltre, la possibilità di applicare specifici nanomateriali fluorescenti come fluorofori esogeni ha permesso di migliorare la qualità della misura e di sviluppare delle strategie ad hoc per un rilevamento più efficacie. Fra questi materiali, i più utilizzati al giorno d'oggi sono sicuramente i punti quantici a semiconduttore, mentre esistono solamente pochi metodi basati sulle nanoparticelle metalliche. Ciononostante, sono ancora presenti diverse problematiche che devono essere superate prima di poter utilizzare tutti i diversi nanomateriali su larga scala. In particolare, la biocompatibilità e la possibile tossicità dei materiali rappresentano le limitazioni principali allo sviluppo di sensori basati sulla fluorescenza e, quindi, sono al centro di molteplici lavori di ricerca.

CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni si è osservato un grande interesse nello sviluppo di metodi innovativi e non invasi per il monitoraggio della glicemia. Grazie a questo intensivo lavoro di ricerca, incentivato dall'aumento di incidenza del diabete di tipo 1, sono state introdotte nuove tecniche per il rilevamento della concentrazione di glucosio, che non impattano sullo stato di salute dell'individuo. Fra queste, i metodi ottici hanno mostrato risultati molto promettenti dal punto di vista della non invasività e della qualità della misura. Ciononostante, ci sono ancora diverse problematiche che devono essere risolte per soddisfare le normative di mercato e, quindi, consentirne l'implementazione su larga scala in sensori per il monitoraggio della glicemia. Pertanto, vi è ancora molto lavoro di ricerca da compiere nel campo dei metodi ottici, ai fini di garantire delle condizioni di vita ottimali ai pazienti diabetici. Infatti, l'obbiettivo principale è lo sviluppo di sensori non invasivi per il monitoraggio continuo della glicemia, così da consentire un rapido ed efficacie intervento per prevenire condizioni patologiche gravi.

Questo elaborato si è posto l'obbiettivo di analizzare quattro metodi spettroscopici basati sull'assorbimento, sulla dispersione e sull'emissione di radiazioni elettromagnetiche. Più in particolare, sono stati discussi i principi fisici su cui si fondano la spettroscopia NIR, MIR, Raman e fluorescente e la loro applicazione pratica al monitoraggio della glicemia, evidenziandone pregi e difetti più rilevanti. Inoltre, sono stati trattati singolarmente i principali problemi che interessano le prime tre tecniche riportate, presentando anche le diverse soluzioni che sono state sviluppate negli ultimi anni. Infine, nel caso specifico della spettroscopia fluorescente è stato affrontato l'argomento dei nanomateriali fluorescenti, di cui si sono discusse le principali proprietà che ne hanno incentivato l'uso e le tecniche di monitoraggio che è stato possibile sviluppare grazie ad essi.

Da quanto riportato in tale elaborato, è possibile concludere che sebbene le tecniche ottiche presentino un notevole potenziale per lo sviluppo di sensori non invasivi di monitoraggio della glicemia, esistono una serie di limitazioni che le rendono ancora al centro della ricerca internazionale. Fra i principali problemi vi sono la sensibilità, la selettività e la specificità della misura, i fattori biologici e i problemi di calibrazione. In particolare, le interazioni fra la radiazione utilizzata e i componenti dei tessuti attraversati rappresentano il limite principale da superare. Infatti, l'assorbimento e la dispersione operata da molecole differenti dal glucosio impattano sensibilmente sulla qualità della misura, rendendo complicata l'estrazione di informazioni utili sui livelli di glicemia. Pertanto, è ancora necessario un miglioramento di questi metodi ottici non invasivi ai fini di superare i limiti sopra riportati e sostituire sul mercato i metodi convenzionali invasivi attualmente in uso, garantendo così migliori condizioni di vita ai pazienti diabetici.

BIBLIOGRAFIA

[1] Beć K.B., Grabska J., Huck C.W. *Near-Infrared spectroscopy in bio-application*, 2020 Jun; 25(12): 2948, doi: 10.3390/molecules25122948

[2] Tang L., Chang S.J., Chen C.J., Liu J.T. *Non-invasive blood glucose monitoring technology: a review*, 2020 Dec; 20(23): 6925, doi: 10.3390/s20236925

[3] Shokrekhodaei M., Quinones S. *Review of non-invasive glucose sensing techniques: optical, electrical and breath acetone*, 2020 Mar; 20(5): 1251, doi: 10.3390/s20051251

[4] Alsunaidi B., Althobaiti M., Tamal M., Albaker W., Al-Naib I. *A review of non-invasive optical systems for continuous blood glucose monitoring*, 2021 Oct; 21(20): 6820, doi: 10.3390/s21206820

[5] Villena Gonzales W., Mobashsher A.T., Abbosh A. *The progress of glucose monitoring-a review of invasive to minimally and non-invasive techniques, devices and sensors*, 2019 Feb; 19(4): 800, doi: 10.3390/s19040800

[6] Pandey R., Paidi S.K., Valdez T.A., Zhang C., Spegazzini N., Dasari R.R., Barman I. *Noninvasive monitoring of blood glucose whit Raman spectroscopy*, 2017 Feb; 50(2): 264-272, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00472

[7] Zhang R., Liu S. Jin H., Luo Y., Zheng Z., Gao F., Zheng Y. *Noninvasive electromagnetic wave sensing of glucose*, 2019 Mar; 19(5): 1151, doi: 10.3390/s19051151

[8] Sun X. *Glucose detection through surface-enhanced Raman spectroscopy: a review*, 2022 May; 1206: 339226, doi: 10.1016/j.aca.2021.339226

[9] Mello G.P.C., Simões E.F.C., Crista D.M.A., Leitão J.M.M., Pinto da Silva L., Esteves da Silva J.C.G. *Glucose sensing by fluorescent nanomaterials*, 2019 Feb; 49(6): 542-552, doi: 10.1080/10408347.2019.1565984

[10] Kozik A., Pavlova M., Petrov I., Bychkov V., Kim L., Dorozhko E., Cheng C., Rodriguez R.D., Sheremet E. *A review of surface-enhanced Raman spectroscopy in pathological processes*, 2021 Dec; 1187: 338978, doi: 10.1016/j.aca.2021.338978

[11] Tahir M.A., Dina N.E., Cheng H., Valev V.K., Zhang L. *Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis and diagnosis*, 2021 Jul; 13(27): 11593-11634, doi: 10.1039/d1nr00708d

[12] Voyton C.M., Qiu Y., Morris M.T., Ackroyd P.C., Suryadi J., Crowe L., Morris J.C., Christensen K.A. *A FRET flow cytometry method for monitoring cytosolic and glycosomal glucose in living kinetoplastid parasites*, 2018 May; 12(5): e0006523, doi: 10.1371/journal.pntd.0006523

[13] *https://it.wikipedia.org/wiki/Spettroscopia_Raman_amplificata_da_superfici*

[14] *https://it.wikipedia.org/wiki/Trasferimento_di_energia_per_risonanza*

[15] Cash J.K., Clark H.A. *Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes,* 2010 Sep; 16(12): 584-593, doi: 10.1016/j.molmed.2010.08.002

[16] Jain P., Maddila R., Joshi A.M. *A precise non-invasive blood glucose measurement system using NIR spectroscopy and Huber's regression model,* 2019 Feb; doi: 10.1007/s11082-019-1766-3