



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA

# Un biosensore per la rilevazione dell'acido lattico

*Laureando:*  
Vittorio Ciocca

*Relatore:*  
Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella

*Correlatore:*  
Dr. Giulio Rosati

Anno accademico 2016/2017



# Sommario

Il lavoro svolto durante il percorso di tesi è stato incentrato sulla realizzazione di un biosensore elettrochimico per acido lattico, basato su dispositivi commerciali segrigrafati in carbonio (SPCE). Il biosensore utilizza la reazione di catalisi dell'acido lattico mediata dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH). Questa reazione converte l'acido lattico in acido piruvico e contemporaneamente il NAD, una molecola di tipo redox, in NADH. A sua volta il NADH può essere ossidato sul dispositivo, producendo una corrente elettrica proporzionale alla concentrazione di acido lattico presente nel campione. Per prima cosa, sono stati testati alcuni metodi elettrochimici di pretrattamento dei dispositivi commerciali per tentare di migliorare le *performance* di rilevazione del NADH. Le modifiche apportate da questi metodi sono stati studiati mediante spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS) e caratterizzati al microscopio elettronico (SEM). Successivamente il biosensore è stato caratterizzato mediante tecniche di ciclovoltammetria, amperometria e spettrofotometria, per la rilevazione del NADH e del lattato. Le curve di calibrazione così ottenute, sono state quindi utilizzate per ricavare la concentrazione di acido lattico in campioni biologici reali. Le misure elettrochimiche effettuate sia in soluzione ideale che reale sono state valutate mediante l'utilizzo di un kit commerciale per la misura spettrofotometrica dell'acido lattico. Il confronto dei risultati, sebbene abbia dimostrato una maggiore efficienza del kit commerciale nella rilevazione, ha anche dimostrato una maggiore reiezione delle interferenze del biosensore sviluppato.



# Abstract

During this thesis I focused on the design, characterization and validation of an electrochemical biosensor for lactic acid, based on commercial screen printed carbon electrodes (SPCE). The biosensor is based on the lactic acid catalysis mediated by lactate dehydrogenase enzyme (LDH). This reaction converts lactic acid to pyruvic acid, and simultaneously reduces the NAD cofactor, to NADH. Then, the produced NADH can be measured optically, by its absorbance at 340 nm, or oxidized on the electrode, producing an electrical current proportional to the lactic acid concentration in the sample. The first step of my work regarded the study of some electrochemical pretreatment methods to the commercial devices with the aim to improve the NADH detection performance. The surface properties variations introduced by these methods were studied by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), Cyclic Voltammetry (CV), and Scanning Electron Microscopy (SEM). The results showed that, although the treatments caused great variation of the devices' surface characteristics, the NADH detection performance was better achieved with the not treated devices.

The next step of my work was pointed towards the biosensor characterization by cyclic voltammetry and amperometric measurements for the detection of different NADH concentrations, previously assessed by UV-visible spectrophotometric measurements, obtaining the NADH sensor sensibility and linear range. After that, I optically monitored the enzyme reaction kinetics at 340 nm, and I used the obtained electrochemical protocol to test the sensor response to different lactic acid concentrations in an ideal solution.

Finally, I compared the optical and electrochemical sensing performance of the biosensor with a commercial kit for the lactic acid quantification. This study was performed both in ideal and real samples, by using respectively a standard buffer and sweat samples collected during a physical exercise by the Biomedical Sciences Department. This last study proved that the commercial kit was better than the developed biosensor in terms of efficiency of the reaction however, this last one showed better sample electrochemical interference rejection.



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>17</b>
1.1	L'acido lattico . . . . .	17
1.1.1	Perchè misurarlo? . . . . .	18
1.1.2	Settore sanitario . . . . .	18
1.1.3	Settore alimentare . . . . .	21
1.2	I biosensori . . . . .	21
1.2.1	Cos'è un biosensore? . . . . .	21
1.2.2	Applicazioni biomediche . . . . .	23
1.2.3	Classificazione dei biosensori . . . . .	23
1.2.4	Biosensori per l'acido lattico: storia e stato dell'arte . . . . .	24
1.2.5	L'importanza dei biosensori per la rilevazione dell'acido lattico . . . . .	27
1.2.6	Esempi di biosensori noti . . . . .	29
<b>2</b>	<b>I biosensori elettrochimici</b>	<b>33</b>
2.1	Sensori voltammetrici e amperometrici . . . . .	33
2.1.1	Biosensori di prima generazione . . . . .	34
2.1.2	Biosensori di seconda generazione . . . . .	35
2.1.3	Biosensori di terza generazione . . . . .	37
2.2	Componente biologica . . . . .	37
2.2.1	Cos'è un enzima? . . . . .	38
2.2.2	Cinetica degli enzimi . . . . .	40
2.2.3	Esempi di enzimi utilizzati nei biosensori per la rilevazione del lattato . . . . .	44
2.2.3.1	Lattato ossidasi . . . . .	44
2.2.3.2	Lattato deidrogenasi . . . . .	45
2.2.4	Processo di immobilizzazione . . . . .	45
2.2.4.1	Immobilizzazione fisica . . . . .	46
2.2.4.2	Immobilizzazione chimica . . . . .	46
2.3	Performance dei biosensori . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Tecniche di misura</b>	<b>49</b>
3.1	Ciclovoltammetria . . . . .	49
3.1.1	Interpretazione del voltammogramma . . . . .	51

3.1.2	Sistemi reversibili o Nerstiani . . . . .	51
3.1.3	Sistemi totalmente irreversibili . . . . .	53
3.1.4	Sistemi quasi reversibili . . . . .	54
3.2	Amperometria e cronoamperometria . . . . .	54
3.2.1	L'equazione di Cottrel . . . . .	56
3.3	Spettrofotometria UV-Visibile . . . . .	56
3.3.1	Applicazioni misure ottiche . . . . .	57
3.3.2	Strumentazione impiegata . . . . .	57
3.3.2.1	Struttura generale di uno spettrofotometro . . . . .	58
3.3.3	Metodi di analisi . . . . .	59
3.3.3.1	La legge di Lambert-Beer . . . . .	60
3.4	Spettroscopia elettrochimica di impedenza . . . . .	60
3.4.1	Modelli interpretativi dell'EIS . . . . .	61
3.4.2	Modelli elettrici equivalenti . . . . .	62
3.4.3	Modelli elettrici noti . . . . .	67
3.5	Misurazioni SEM . . . . .	71
<b>4</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>75</b>
4.1	Caratterizzazione svolte . . . . .	75
4.1.1	Pretrattamenti elettrochimici . . . . .	75
4.1.2	Calibrazione NADH . . . . .	77
4.1.3	Calibrazione Lattato in matrice ideale . . . . .	77
4.1.4	Confronto protocollo BioDevices e kit commerciale . . . . .	78
4.1.5	Rilevazione del lattato in matrice reale . . . . .	79
4.2	Strumentazione e dispositivi . . . . .	80
4.3	Reagenti e materiali biologici . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Risultati ottenuti</b>	<b>87</b>
5.1	Pretrattamento elettrochimico . . . . .	87
5.1.1	Caratterizzazione preliminare dispositivi . . . . .	87
5.1.2	Effetti dei pretrattamenti . . . . .	89
5.1.3	Modellizzazione . . . . .	91
5.2	Calibrazione NADH . . . . .	96
5.2.1	Ciclovoltammetria . . . . .	96
5.2.2	Amperometria . . . . .	99
5.3	Calibrazione Lattato . . . . .	103
5.3.1	Spettrofotometria UV-Vis . . . . .	103
5.3.2	Ciclovoltammetria . . . . .	106
5.4	Confronto tra il kit Megazyme e il protocollo BioDevices . . . . .	109
5.4.1	Spettrofotometria UV-Vis . . . . .	109
5.4.2	Ciclovoltammetria . . . . .	117
5.4.3	Verifica di riproducibilità e ripetibilità del kit Megazyme . . . . .	123



5.5	Confronto tra il kitMegazyme e il protocollo BioDevices su campioni reali . . . . .	125
5.5.1	Spettrofotometria UV-Visibile . . . . .	125
5.5.2	Ciclovoltammetria . . . . .	126
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>129</b>



# Elenco delle figure

1.1	Rappresentazione delle molecole acido L-lattico (sinistra) e D-lattico (destra) . . . . .	17
1.2	Processo di deprotonazione dell'acido lattico . . . . .	18
1.3	Descrizione del ciclo di Cori . . . . .	20
1.4	Schema a blocchi biosensore . . . . .	22
1.5	Schema del biosensore utilizzato da Mizutani et al. 1984 . . . . .	25
1.6	Schema del biosensore utilizzato . . . . .	26
1.7	Immagini al SEM degli enzimi adsorbiti sulla superficie dell'elettrodo, Li et al. del 2001. . . . .	27
1.8	Catalisi enzimatica (LDH) lattato-piruvato . . . . .	27
1.9	Numero di pubblicazioni per anno inerenti biosensori per la rilevazione del lattato . . . . .	28
1.10	Distribuzione dei settori di applicazione dei biosensori per la rilevazione del lattato . . . . .	29
1.11	Esempio di dispositivo per il monitoraggio ed il controllo del glucosio nel sangue . . . . .	30
1.12	Esempio di test di gravidanza commerciale . . . . .	31
1.13	Esempio di etilometro . . . . .	32
2.1	Circuito potenziostato . . . . .	33
2.2	Schema di funzionamento dei biosensori di prima generazione . . . . .	35
2.3	Schema di funzionamento dei biosensori di seconda generazione . . . . .	36
2.4	Variazione del livello energetico di attivazione della reazione in presenza e assenza dell'enzima . . . . .	38
2.5	Rappresentazione dei 4 livelli delle strutture enzimatiche: a) s. primaria b) s. secondaria c) s. terziaria d) s. quaternaria . . . . .	39
2.6	Morfologia dell'enzima in assenza e presenza del substrato . . . . .	40
2.7	Rappresentazione grafica del meccanismo di Michaelis-Menten . . . . .	41
2.8	Andamento tipico della cinetica di Michaelis-Menten . . . . .	42
2.9	Esempio di grafico di Lineweaver-Burk . . . . .	44
3.1	Esempio di forma d'onda di potenziale tipico della ciclovoltammetria . . . . .	50
3.2	Esempio di un tipico voltammogramma . . . . .	50
3.3	Dipendenza del voltammogramma dallo scan rate utilizzato . . . . .	52

3.4	Esempio di potenziale applicato in amperometria . . . . .	55
3.5	Andamento tipico della corrente registrata durante l'amperometria . .	56
3.6	Elementi che compongono lo spettrofotometro . . . . .	58
3.7	Rappresentazione segnale input/output caratteristica dell'EIS . . . . .	61
3.8	Parametri specifici della resistenza . . . . .	63
3.9	Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da una sola resistenza ( $R = 100\Omega, 200\Omega, 300\Omega, 400\Omega$ ) . . . . .	64
3.10	Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un condensatore nell'intervallo di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz ( $C = 1$ mF) . . . . .	65
3.11	Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un elemento induttore nell'intervallo di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz ( $L = 1$ mH) . . . . .	65
3.12	Simulazione del diagramma di Nyquist nel range di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz per l'elemento di Warburg ideale (grafico blu, $= 400 \frac{\Omega}{\sqrt{s}}$ ) . . . . .	66
3.13	Diagramma di Nyquist nel range di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz per l'elemento a fase costante a differenti valori di n . . . . .	67
3.14	Modello dell'elettrodo a polarizzazione ideale . . . . .	68
3.15	Modello dell'elettrodo a polarizzazione non ideale . . . . .	68
3.16	Diagramma di Nyquist ricavato dal modello elettrodo a polarizzazione non ideale . . . . .	69
3.17	Circuitio elettrico della cella di Randles . . . . .	69
3.18	Simulazione del diagramma di Nyquist per il circuito in figura 5.9 nell'intervallo di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz a diversi valori di $C_{dl}$ : 300 $\mu$ F (in rosso), 1 mF (in nero), 3 mF (in verde), 10 mF (in blu) con valori fissi degli altri componenti ( $R_s = 100\Omega$ , $R_{ct} = 5000\Omega$ , $\omega = 100\Omega$ ) . . . . .	71
3.19	Microscopio a scansione elettronica utilizzato per effettuare le misure SEM . . . . .	72
3.20	Immagine del tamburo su cui sono fissati i dispositivi campione ricoperti da del nastro conduttivo . . . . .	72
4.1	Rappresentazione grafica della soluzione utilizzata nel protocollo Bio-Devices . . . . .	78
4.2	Confronto tra dispositivi DropSense 110 (sinistra) e c110 (destra) . .	81
4.3	Descrizione dei principali componenti del dispositivo DropSense (modello 110) . . . . .	82
4.4	Immagine al microscopio della superficie degli elettrodi (ingrandimento 125x) . . . . .	82
4.5	Immagine al SEM relativa una porzione della superficie del working .	83
4.6	L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit . . . . .	84
5.1	Diagramma di Bode delle misure EIS in ferri/ferrocianuro 1 mM in media e deviazione standard su 12 sensori . . . . .	87

5.2	Ciclovoltammogramma relativo a misure in ferro/ferricianuro 1 mM in Tris-HCl con dispositivi <i>fresh</i> . Media e deviazione standard calcolate su 12 sensori . . . . .	88
5.3	Diagrammi di Bode delle misure EIS in ferro/ferricianuro 1 mM in Tris-HCl sui dispositivi non trattati e trattati con $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . Le misure preliminari su tutti e 12 i dispositivi sono raggruppate nella curva «fresh». . . . .	89
5.4	Ciclovoltammogramma relativo a misure in ferro/ferricianuro 1 mM su dispositivi non trattati e trattati con $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$	90
5.5	Ciclovoltammogrammi relativi a misure in NADH 100 $\mu$ M in Tris-HCl (rosso) e Tris-HCl (blu) utilizzando i gruppi di dispositivi non trattati, $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . Media e deviazione standard calcolate su 3 sensori . . . . .	91
5.6	Confronto del parametro $R_s$ nei gruppi di dispositivi non trattati, $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . . . . .	92
5.7	Confronto del parametro $R_{ct}$ nei gruppi di dispositivi non trattati, $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . . . . .	92
5.8	Confronto del parametro $CPE-T$ nei gruppi di dispositivi non trattati, $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . . . . .	93
5.9	Confronto del parametro $CPE-P$ nei gruppi di dispositivi non trattati, $Na_2CO_3$ , $NaHCO_3$ e $NaOH$ . . . . .	93
5.10	Confronto tra le immagine SEM ottenute dai 4 gruppi di dispositivi .	94
5.11	Confronto tra rugosità superficiale media e variabilità di rugosità dei 4 gruppi di dispositivi . . . . .	95
5.12	Confronto tra area sperimentale e proiettata dei 4 gruppi di dispositivi	95
5.13	Rapporto tra area sperimentale e proiettata dei 4 gruppi di dispositivi	96
5.14	Ciclovoltammogramma relativo a misure in NADH in Tris-HCl a differenti concentrazioni ( $1 \mu M$ , $10 \mu M$ , $100 \mu M$ , $1 mM$ e $10 mM$ ). Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi . . . . .	97
5.15	Studio delle correnti di picco registrate durante la ciclovoltammetria con NADH in Tris-HCl a potenziali compresi fra 400 mV e 700 mV .	98
5.16	Curva di calibrazione del NADH ottenuta mediante ciclovoltammetria, considerando la corrente di ossidazione a 456 mV . . . . .	99
5.17	Studio delle correnti amperometriche prodotte in soluzione di NADH 1mM in Tris-HCl a potenziali compresi fra -400 mV e 800 mV . . . .	100
5.18	Corrente amperometrica a 600 mV misurata in NADH in Tris-HCl a differenti concentrazioni ( $0 \mu M$ , $1 \mu M$ , $10 \mu M$ , $100 \mu M$ , $1 mM$ e $10 mM$ )	101
5.19	Curve di calibrazione del NADH in Tris-HCl all'istante iniziale e finale dell'amperometria . . . . .	102
5.20	Curva di calibrazione del NADH in Tris-HCl in ciclovoltammetria, e fit lineare delle concentrazioni tra $5 \mu M$ e $1000 \mu M$ . . . . .	103

5.21	Cinetiche di catalisi del lattato in HBRS ottenute ad una lunghezza d'onda $\lambda$ pari a 340 nm. La baseline delle misure è misurata aggiungendo HBRS al posto del campione. . . . .	104
5.22	Curva di calibrazione del NADH prodotto dalla catalisi del lattato in HBRS. . . . .	105
5.23	Efficienza dell'enzima LDH per la catalisi del lattato in piruvato in funzione della concentrazione di lattato iniziale . . . . .	106
5.24	Ciclovoltammogrammi relativi alle misure di lattato in HBRS al termine delle cinetiche allo spettrofotometro. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi . . . . .	107
5.25	Curva di calibrazione del lattato ottenuta dalla corrente a 456 mV delle ciclovoltammetrie sulle soluzioni di lattato in HBRS a concentrazione: $1 \mu M$ , $10 \mu M$ , $100 \mu M$ , $200 \mu M$ , $500 \mu M$ , $1 mM$ , $2 mM$ , $5 mM$ e $10 mM$ . . . . .	107
5.26	Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato	108
5.27	Confronto tra retta di calibrazione del NADH (blu) e la quantità di NADH prodotto sperimentalmente in soluzione dal lattato (nero) . .	109
5.28	Cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il kit Megazyme. La baseline delle misure è misurata in aria ( <i>cuvetta</i> di quarzo vuota). Il campione è stato aggiunto dopo 3 minuti registrando nell'intervallo precedente l'assorbanza dovuta ai reagenti in <i>cuvetta</i> (A1). Mentre il parametro A2 è ricavato a fine cinetica, un esempio di A2 è mostrato per la curva relativa a $200 \mu M$ . . . . .	110
5.29	Differenze di assorbanza delle cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il kit Megazyme. . . . .	111
5.30	Curva di calibrazione del NADH prodotto dalla reazione del <i>kit Megazyme</i> in funzione della concentrazione di acido lattico iniziale. I parametri del fit sono riportati nel riquadro a destra. . . . .	112
5.31	Cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il protocollo BioDevices. La baseline delle misure è ottenuta in aria ( <i>cuvetta</i> di quarzo vuota). Il campione è stato aggiunto dopo 1 minuti registrando nell'intervallo precedente l'assorbanza dovuta ai reagenti in <i>cuvetta</i> . . . . .	113
5.32	Differenze di assorbanza delle cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il protocollo BioDevices. . . . .	113
5.33	Curva di calibrazione del NADH prodotto dal protocollo BioDevices in funzione della concentrazione di acido lattico iniziale. . . . .	114
5.34	Confronto tra le curve di calibrazione del NADH prodotto dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices per le concentrazioni di acido lattico considerate. . . . .	115
5.35	Confronto tra le curve di calibrazione del NADH prodotto dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices con le concentrazioni di acido lattico considerate. . . . .	115

5.36	Confronto tra l'efficienza della reazione enzimatica del kit Megazyme e del protocollo BioDevices . . . . .	116
5.37	Ciclovoltammogramma del lattato in HBRS ottenuto con il kit Megazyme. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi. . . . .	117
5.38	Ciclovoltammogramma del lattato in HBRS ottenuto con il protocollo BioDevices. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi. . . . .	118
5.39	Curva di calibrazione ciclovoltammetrica del kit Megazyme riferita alla corrente registrata a 600 mV in funzione della concentrazione di acido lattico. . . . .	119
5.40	Curva di calibrazione ciclovoltammetrica del protocollo BioDevices riferita alla corrente registrata a 456 mV in funzione della concentrazione di acido lattico. . . . .	120
5.41	Confronto tra le curve di calibrazione ciclovoltammetriche prodotte dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices per le concentrazioni di acido lattico considerate. . . . .	121
5.42	Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato prodotto dal kit Megazyme . . . . .	122
5.43	Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato prodotto dal protocollo BioDevices . . . . .	122
5.44	Confronto della quantità di NADH prodotto nei 5 esperimenti ripetuti con il kit Megazyme, utilizzando una soluzione lattato 100 $\mu$ M in HBRS.	123
5.45	Confronto della corrente registrata a 600 mV in 4 esperimenti ripetuti con il kit Megazyme, utilizzando una soluzione lattato 100 $\mu$ M in HBRS.	124
5.46	Valori di acido lattico in Milli-Q, LA Megazyme standard e campioni di sudore prelevati a 10', 40' e 60', ricavati mediante analisi spettrofotometrica. . . . .	126
5.47	Valori di acido lattico nei campioni di Milli-Q, LA Megazyme standard e campioni biologici considerati, ricavati mediante analisi ciclovoltammetrica . . . . .	127
5.48	Grafico di correlazione della concentrazione di acido lattico ricavata mediante analisi spettrofotometrica e ciclovoltammetrica, con il kit Megazyme e il protocollo BioDevices. . . . .	128





# Elenco delle tabelle

1.1	Sistema energetico coinvolto in relazione alla durata dell'attività fisica svolta . . . . .	19
4.1	Protocolli elettrochimici testati . . . . .	76
4.2	Diluizioni di LA Megazyme standard e dei campioni biologici in Milli-Q per effettuare le misure mediante kit Megazyme e protocollo Bio-Devices nei rispettivi range lineari. . . . .	80
5.1	Parametri elettrochimici ricavati dei voltammogrammi misurati . . .	90
5.2	Valori delle correnti registrate a differenti concentrazioni di NADH . .	99
5.3	Valori delle correnti registrate a differenti concentrazioni di NADH relative all'istante iniziale e finale dell'amperometria . . . . .	102
5.4	Fitting dei dati sperimentali relativi alle concentrazioni di lattato 2 mM, 5 mM e 10 mM. . . . .	104
5.5	Parametri del fit lineare dei delta di assorbanza rispetto alla concentrazione di acido lattico del kit Megazyme . . . . .	111
5.6	Parametri del fit lineare del protocollo BioDevices, relativi al delta di assorbanza e la concentrazione di acido lattico . . . . .	114
5.7	Parametri del fit lineare del kit Megazyme, relativi al picco di corrente registrato a 600 mV e la concentrazione di acido lattico . . . . .	119
5.8	Parametri del fit lineare del protocollo BioDevices, relativi ai picchi di corrente registrati a 456 mV e la concentrazione di acido lattico . .	120
5.9	Coefficienti di variazione ricavati dalle misure ripetute . . . . .	124
5.10	Coefficienti di variazione ricavati dalle misure ripetute . . . . .	125



# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 L'acido lattico

L'acido lattico è un sottoprodotto del metabolismo anaerobico che assume un ruolo fondamentale in numerosi processi biochimici e biologici. Si tratta di un acido carbossilico, con formula chimica  $C_3H_6O_3$  e peso molecolare pari a 90,08 Dalton. Gli acidi carbossilici sono composti di origine organica contenenti uno o più gruppi carbossilici (o carbossili,  $-COOH$ ) da cui ne prendono la denominazione. L'acido lattico è una molecola chirale, ne esistono quindi due enantiomeri, ovvero una coppia di molecole una l'immagine speculare dell'altra, ma non sovrapponibili. I due enantiomeri dell'acido lattico sono l'*acido L-(+)-lattico* e l'*acido D-(-)-lattico*, figura 1.1, e possiedono sia le medesime proprietà fisiche che lo stesso comportamento chimico[26]; tuttavia, solamente l'acido L-(+)-lattico è coinvolto nei cicli metabolici dei sistemi eucarioti.

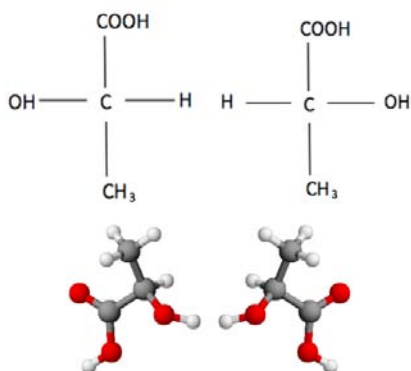


Figura 1.1: Rappresentazione delle molecole acido L-lattico (sinistra) e D-lattico (destra)

Nell'organismo umano, l'acido lattico è dissociato in lattato, ione che deriva dalla deprotonazione dell'acido lattico stesso, figura 1.2.

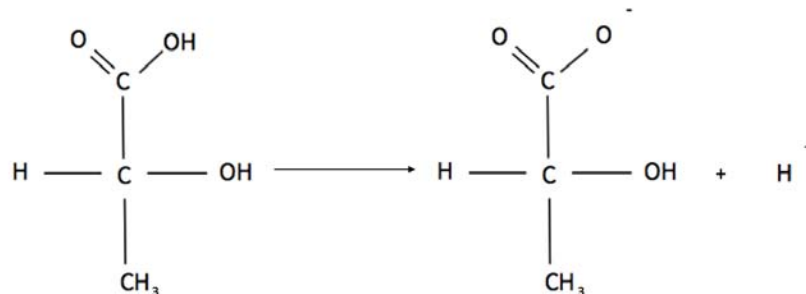


Figura 1.2: Processo di deprotonazione dell'acido lattico

### 1.1.1 Perché misurarlo?

La rilevazione dell'acido lattico ricopre un ruolo chiave sia in campo sanitario, nella medicina preventiva e in quella sportiva, sia in campo alimentare, in cui rappresenta uno dei principali parametri di valutazione qualitativa degli alimenti. Per questi motivi nel mondo della ricerca la rilevazione dell'acido lattico resta un'applicazione di grande importanza.

### 1.1.2 Settore sanitario

L'acido lattico ha un ruolo fondamentale nei processi energetici umani in quanto si tratta di un sottoprodotto del metabolismo anaerobico del glucosio nel muscolo. Il nostro corpo possiede tre differenti sistemi energetici attraverso i quali il sistema muscolare scheletrico è in grado di produrre e ricavare l'energia necessaria per svolgere un qualsiasi tipo di attività fisica. Questi sistemi possono essere suddivisi in *sistema anaerobico* e *sistema aerobico*, in base al procedimento di produzione di adenosina tri-fosfato (ATP), la molecola energetica di maggior rilevanza del corpo umano. L'attività aerobica avviene in presenza di ossigeno, a differenza di quella anaerobica che ha luogo senza il consumo di tale molecola. I meccanismi anaerobici sono a loro volta suddivisi in anaerobico alattacido e anaerobico lattacido, in base alla produzione o meno di acido lattico. I tre sistemi (aerobico, anaerobico alattacido e anaerobico lattacido) vengono attivati a seconda della durata dello sforzo fisico svolto[37], tabella 1.1.

<b>Sistema energetico</b>	<b>Durata attività fisica</b>
Aerobico	20 minuti
Anaerobico lattacido	15-120 secondi
Anaerobico alattacido	1-10 secondi

Tabella 1.1: Sistema energetico coinvolto in relazione alla durata dell'attività fisica svolta

Quando lo sforzo fisico ha una durata superiore a dieci secondi il solo contributo del sistema anaerobico alattacido non è sufficiente a produrre l'energia necessaria ai muscoli e, perciò, viene attivato anche il sistema anaerobico lattacido. Quest'ultimo fornisce l'ATP necessaria allo sforzo sfruttando il glicogeno presente nei depositi dei miociti (cellule muscolari) e degli epatociti (cellule del fegato). Il glicogeno è una molecola che svolge la funzione di riserva energetica e che, subendo un processo di degradazione definito glicogenolisi, porta alla creazione del glucosio. Tuttavia, questo processo ha una durata temporale limitata, pur permettendo un'attività molto intensa nel breve periodo, prima dell'attivazione del sistema aerobico. L'assenza di ossigeno nel processo anaerobico lattacido di formazione dell'ATP comporta la produzione, all'interno del muscolo, di acido piruvico o piruvato, il quale, se presente in quantità superiore alla capacità ossidativa dei muscoli per il suo smaltimento, si accumula e viene convertito in acido lattico[19]. Qualora lo sforzo perduri nel tempo si assiste ad un accumulo di lattato nelle cellule muscolari e nel sangue che comporta un incremento della concentrazione di protoni con conseguente diminuzione del pH cellulare. Ciò causa acidosi che porta ad una notevole riduzione della *performance* muscolare[38][35]. Quando si verifica un accumulo di acido lattico nei muscoli si attiva un ciclo metabolico noto come ciclo di Cori, figura 1.3, in grado di regolare il processo di conversione piruvato-lattato. Questo processo coinvolge essenzialmente tre molecole: glucosio, piruvato e lattato. Nello specifico permette di fornire in modo continuo nuovo glucosio alle cellule muscolari trasferendo al fegato, invece, l'acido lattico prodotto all'interno di esse. Qualora, durante un'attività fisica prolungata o di grande intensità, vi sia un accumulo di lattato all'interno delle fibre muscolari, si attiva il ciclo di Cori che trasporta l'acido lattico dalle cellule muscolari al fegato tramite il circolo sanguigno[4]. Una volta giunto al fegato, il lattato subisce due trasformazioni enzimatiche, prima di essere inviato nuovamente alle cellule: inizialmente viene convertito in piruvato dalla lattato deidrogenasi, e, in seguito, viene trasformato in glucosio attraverso la gluconeogenesi. Questa sequenza di processi metabolici ha come scopo quello di eliminare il lattato prodotto nei muscoli ritrasformandolo in glucosio così da poter essere rinvio ai muscoli.

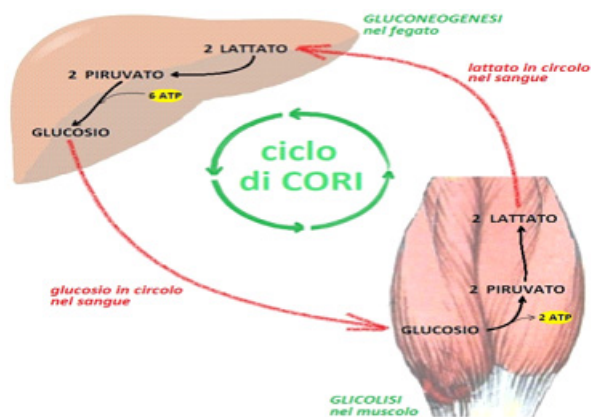


Figura 1.3: Descrizione del ciclo di Cori

La quantità di acido lattico in circolo in alcuni casi può essere superiore rispetto a quanto gli organi addetti in unione ai muscoli inattivi siano in grado di smaltire. L'accumulo di acido lattico nell'organismo porta ad una richiesta sempre maggiore di ossigeno da parte delle fibre muscolari, che vedranno ridotta la loro capacità di contrazione fino a giungere alla tetania, il comune crampo. Una volta che i muscoli hanno ripreso la loro normale attività aerobica, l'acido lattico presente nel circolo sanguigno viene eliminato rapidamente, mentre quello presente negli altri distretti dopo due o tre ore dall'interruzione dell'attività fisica.

La concentrazione di *L-lattato* nel sangue varia in base all'intensità di attività fisica svolta dal soggetto: la concentrazione di lattato in condizioni di riposo nell'uomo può variare da 0,5 a 1,5 mmol/L[34], mentre qualora sia in corso un'intensa attività fisica tale *range* si estende a 12-25 mmol/L[14]. Grazie alla definizione degli intervalli di concentrazione di acido lattico sia in condizioni di riposo che sotto sforzo è stato possibile utilizzare il lattato come analita *target* altamente informativo sia in ambito della medicina preventiva che sportiva, così da poter distinguere campioni sani e patologici. In ambito della medicina sportiva l'acido lattico è risultato essere uno dei parametri chiave per la valutazione del livello di preparazione atletica dei soggetti[12]. Infatti, monitorando la quantità di acido lattico prodotto in relazione all'attività fisica svolta, è possibile valutare e predire lo sviluppo della massa muscolare. Inoltre, è possibile anche definire diete e allenamenti specifici a seconda del livello di preparazione che si vuole raggiungere. In campo sanitario, invece, la capacità di monitorare la concentrazione plasmatica di lattato consente di fornire in modo tempestivo informazioni riguardo molte patologie, anche estremamente gravi. Un incremento della concentrazione ematica di tale molecola rispetto ai valori di riferimento è sintomo di uno sbilanciamento del processo di produzione e della *clearance* del lattato[50] e ciò potrebbe esser dovuto ad alcune patologie:

- ipossia, condizione patologica conseguente all'assenza di ossigenazione a tessuti o cellule[2, 40];
- embolismo polmonare, ostruzione acuta di uno o più rami dell'arteria polmonare[50];
- malattie tissutali e del fegato[50];
- shock, di tipo emorragico, polmonare o settico[50];
- insufficienza di alcuni organi (polmoni, reni, ventricolo...)[2, 40];
- presenza di cellule tumorali[52].

Inoltre, la conoscenza del livello di acido lattico in circolo risulta molto importante nei casi di pazienti ricoverati in terapia intensiva[46]: infatti, in questi casi, non potendo ricavare indicazioni direttamente dal paziente, è possibile ottenere importanti parametri sulla condizione fisica del paziente monitorando la concentrazione di lattato nel plasma e nella saliva, in modo da garantire un intervento tempestivo.

### 1.1.3 Settore alimentare

Nell'industria alimentare il lattato trova impiego sia come indice di qualità degli alimenti sia come regolatore di acidità e conservante in prodotti caseari[21, 47]; inoltre, esso permette di valutare lo stato di conservazione di frutta, verdura e bevande come ad esempio vino e birra[36]. Riguardo questi ultimi va sottolineato anche come l'acido lattico sia impiegato nel processo di fermentazione della birra per ridurre il pH del prodotto, e anche nel processo di fermentazione del vino, durante il quale, monitorando l'acidità, e, quindi, il contenuto di acido lattico, è possibile controllare la conversione dell'acido malico in lattato, fornendo così un indice di qualità del vino[16]. Il contenuto di acido lattico nel prodotto è indice anche della freschezza di carne e pesce. È possibile, ad esempio, discriminare il pescato proveniente da allevamenti intensivi, non a norma per quanto riguarda il processo produttivo e la qualità del prodotto, oppure ancora individuare livelli anomali di farmaci nell'animale[18]. Perciò, il valore di lattato nel sangue dei pesci può essere usato anche come parametro di valutazione delle acque marine da cui proviene.

## 1.2 I biosensori

### 1.2.1 Cos'è un biosensore?

La domanda sempre crescente per la determinazione quantitativa di molecole in campioni ha portato allo studio e allo sviluppo di nuove strategie e nuovi metodi di rilevazione di questi analiti. I biosensori sono dispositivi per la rilevazione di specie chimiche costituiti da un elemento di riconoscimento biologico mantenuto in contatto

diretto con un trasduttore (definizione IUPAC). Nel complesso, si può definire tale dispositivo come la combinazione di un biorecettore, rappresentato dalla componente biologica, e di un elemento trasduttore. Il principale scopo di un biosensore è quello di rilevare la presenza e la concentrazione di uno specifico analita all'interno di un sistema fisico attraverso la produzione di un segnale proporzionale alla concentrazione delle specie chimica in esame. I biosensori trovano impiego in un'ampia varietà di settori: essi vengono utilizzati, specialmente, in ambito medico, sportivo ed alimentare. Il loro successo e diffusione sono legati al fatto che, modificandone la componente biologica, è possibile ottenere strumenti differenti in grado di rilevare diverse specie chimiche, mantenendo pressoché invariato l'elemento trasduttore. Alcune caratteristiche che possono avere i biosensori sono:

- *range* dinamico tale da comprendere l'intera variabilità di ogni caso clinico, siano essi normali o patologici (infatti, ogni molecola è presente all'interno del nostro organismo in concentrazioni differenti);
- sistema di misura insensibile a variazioni esterne come quelle termiche, senza richiedere numerose fasi di ricalibrazione o interventi tecnici;
- dimensioni contenute, elevata velocità di analisi e ridotto volume di campione biologico necessario all'analisi.

I biorecettori sono responsabili del riconoscimento dell'analita di interesse, definendo il livello di selettività e sensibilità del sistema. Queste molecole biologiche interagiscono con le sostanze in esame in modo specifico modificando aspetti chimico-fisici dovuti al riconoscimento dell'analita. Tali interazioni producono variazioni di natura differente, come calore, massa, luce o flusso di elettroni, che a loro volta sono convertite dal trasduttore, e successivamente elaborate. La natura del segnale prodotto dal biosensore dipende dall'elemento trasduttore impiegato. Infine il trasduttore stesso può subire una fase di trattamento chimico, per aumentare la selettività nei confronti della specie di interesse, detta substrato o analita. Infatti, il biosensore deve reagire unicamente con l'analita di riferimento, senza interferenze dovute ad altri elementi presenti nel campione. Un tipico biosensore è schematizzato a blocchi in figura 1.4.

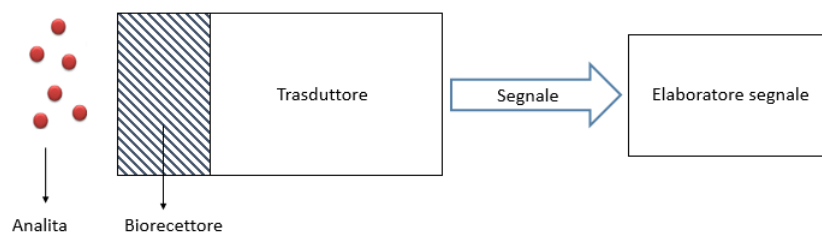


Figura 1.4: Schema a blocchi biosensore



## 1.2.2 Applicazioni biomediche

I biosensori sono stati sviluppati e hanno trovato fin da subito grande riscontro nella diagnostica clinica. Proprio in questo settore, infatti, è più marcata la necessità di eliminare o contenere i tempi e le complesse procedure di analisi clinica. Ad oggi la misura della concentrazione di specie chimiche in fluidi biologici, come ad esempio plasma e sangue viene tipicamente effettuata su volumi importanti di campione e con tempistiche che vanno da ore a giorni. A questo vanno aggiunti i tempi logistici e burocratici necessari per il trasferimento delle informazioni, sia per via telematica che per via tradizionale. Inoltre, tutte queste procedure richiedono l'intervento di personale esperto e qualificato in grado di utilizzare le specifiche strumentazioni, con conseguente aumento dei costi. Realizzando un sistema basato o almeno supportato dall'impiego di biosensori è possibile ottenere analisi cliniche più sostenibili ed ottimizzate, sia per quanto riguarda i costi che i tempi. I biosensori si prestano anche all'utilizzo in ambienti non strettamente collegati ad un laboratorio di analisi, come ad esempio abitazioni private, dove sarebbe possibile svolgere analisi *in loco* e *real time* con una più efficace gestione dei pazienti.

## 1.2.3 Classificazione dei biosensori

I biosensori possono essere classificati in base al principio di trasduzione del segnale, al tipo di analita, al tipo di misura effettuata, oppure ancora a seconda della tipologia di elemento biologico impiegato o della sua tecnica di immobilizzazione. Prendendo in considerazione la tipologia di biorecettore impiegato è possibile classificare i biosensori in due gruppi:

- biosensori enzimatici;
- biosensori ad affinità;

I biosensori enzimatici si basano su un fenomeno di catalisi che coinvolge l'analita, il quale viene trasformato in una specie secondaria, impiegata come riferimento per la misura. I sensori ad affinità, invece, sfruttano la capacità di riconoscimento dell'analita da parte di alcune molecole come: anticorpi, tessuti, DNA o RNA. Essi riescono a quantificare la presenza di un determinato substrato in base al legame venutosi a creare tra analita e biorecettore.

Una seconda classificazione altrettanto valida è correlata al metodo di trasduzione del segnale[25]:

- biosensori elettrochimici, basati su reazioni enzimatiche o altri recettori biologici e suddivisi in dispositivi amperometrici, potenziometrici, conduttimetrici e transistor ad effetto di campo (FETs);
- biosensori elettrici, basati sulla conducibilità elettrolitica;
- biosensori ottici, basati sui concetti di assorbanza e riflettanza;

- biosensori gravimetrici;
- biosensori termometrici, in grado di valutare gli effetti del calore prodotto da una reazione specifica;
- biosensori acustici.

Tra i gruppi di dispositivi citati, quelli che meglio si prestano ad un utilizzo in campo biomedicale sono quelli elettrochimici e quelli colorimetrici. Infatti, i vantaggi legati a questi tipi di dispositivi sono molteplici: essi risultano essere più facilmente miniaturizzabili, sono in grado di fornire un segnale di risposta in tempi estremamente ridotti, comportano costi di produzione relativamente bassi e non necessitano di campioni biologici limpidi (come, invece, necessario per i biosensori ottici). Ciò li differenzia è però l'oggettività e l'analiticità della risposta che rende i biosensori elettrochimici maggiormente affidabili in numerose applicazioni. Una descrizione dettagliata di questo tipo di dispositivo è fornita nel Capitolo 2.

#### 1.2.4 Biosensori per l'acido lattico: storia e stato dell'arte

Data la grande importanza del lattato, quindi, numerose sono state le ricerche per svilupparne il miglior sistema di rilevazione. Nel corso degli anni sono stati studiati e realizzati numerosi biosensori specifici per la rilevazione dell'acido lattico, e si è potuto osservare come i sensori elettrochimici siano particolarmente performanti per questo tipo di analisi. Tali dispositivi si differenziavano sia per l'elemento biologico utilizzato che per tecnica di indagine impiegata nell'analisi. In seguito, sono stati descritti nel dettaglio alcuni dei dispositivi ideati in passato, di cui si riportano titolo ed autori delle relative pubblicazioni.

#### **Electrochemical-Enzymatic Analysis of Blood Glucose and Lactate**

**David L. Williams,<sup>1</sup> Alfred R. Doig, Jr.,<sup>1</sup> and Alexander Korosi<sup>1</sup>**

*Monsanto Company, New Enterprise Division, Everett, Mass. 02149* ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 42, NO. 1, JANUARY 1970

Questo articolo, pubblicato nel 1970, rappresenta di fatto il primo biosensore per il lattato. Il sistema è nato come alternativa alle misure spettrofotometriche della concentrazione di glucosio e lattato nel sangue. L'obbiettivo era di utilizzare tecniche elettrochimiche per analizzare i campioni di sangue così come prelevati, evitando quindi processi di diluizione necessari per rendere la soluzione compatibile con le misure ottiche. Il dispositivo prevedeva l'utilizzo dell'enzima *lattato ossidasi b2* (LOD) che è in grado, in presenza di ferricianuro, di ossidare l'acido lattico in piruvato. In seguito il ferrocianuro prodotto, a contatto con l'elettrodo in platino, veniva ossidato e riconvertito in ferricianuro liberando 2 elettroni, in grado di produrre una corrente proporzionale alla concentrazione del lattato nel campione.

CATALYTIC ASSAY OF L-LACTATE OR PYRUVATE WITH AN ENZYME ELECTRODE  
BASED ON IMMOBILIZED LACTATE OXIDASE AND LACTATE DEHYDROGENASE

Fumio MIZUTANI,\* Yukio SHIMURA, and Keishiro TSUDA  
Research Institute for Polymers and Textiles,  
1-1-4 Yatabe-Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305  
© The Chemical Society of Japan 1984

Il secondo lavoro riportato, datato 1984, è stato realizzato da un gruppo di ricerca giapponese, che per primo ha rilevato il lattato utilizzando una coppia di enzimi. Il dispositivo, infatti, utilizzava sia la lattato ossidasi (LOD) che la lattato deidrogenasi (LDH) con la struttura di figura 1.5.

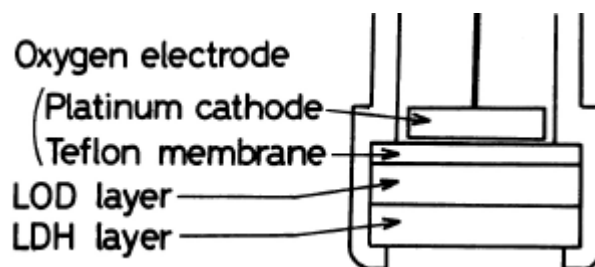


Figura 1.5: Schema del biosensore utilizzato da Mizutani et al. 1984

Il biosensore era basato su due reazioni concatenate: prima l'azione della LOD convertiva l'ossigeno disciolto in soluzione ( $O_2$ ) in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e il lattato in piruvato, in seguito veniva attivata la LDH che riconvertiva il piruvato prodotto in lattato e il NADH in  $NAD^+$ . Anche in questo caso, monitorando la corrente prodotta in soluzione era possibile ricavare la concentrazione di substrato. Con questo meccanismo è stata aumentata notevolmente l'efficienza e la velocità della reazione del sensore, sfruttando l'affinità dell'enzima LDH per la conversione lattato-piruvato.

### **A fully reversible fiber optic lactate biosensor based on the intrinsic fluorescence of lactate monoxygenase**

Wolfgang Trettnak and Otto S. Wolfbeis Fresenius Z Anal Chem (1989) 334:427–430  
Analytical Division, Institute of Organic Chemistry, Karl-Franzens-University, A-8010 Graz, Austria

Nel 1989 un gruppo di ricerca austriaco ideò, invece, uno dei primi biosensori per la rilevazione del lattato utilizzando misure ottiche. In particolare, veniva sfruttata la fluorescenza naturale dell'enzima *lattato monoossigenasi*, che varia durante l'interazione con il lattato. Il dispositivo era composto dalla soluzione enzimatica intrappolata all'estremità di una fibra ottica posta a contatto con una membrana

selettiva alla *lattato monoossigenasi* stessa. In questo modo le misure ottiche svolte attraverso la fibra era possibile monitorare la concentrazione del lattato nel campione in modo molto rapido. In figura 1.6 è riportata una sezione della struttura del biosensore.

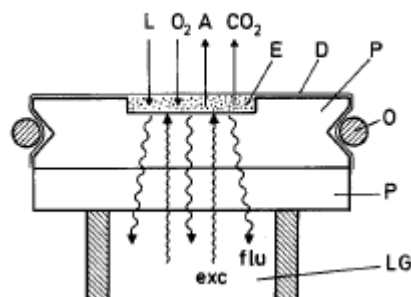


Figura 1.6: Schema del biosensore utilizzato

### Sol-gel encapsulation of lactate dehydrogenase for optical sensing of L-lactate

Chia-I. Li, Yi-Hua Lin, Cheng-Ling Shih, Jeng-Pyng Tsaur, Lai-Kwan Chau \*

*Department of Chemistry, National Chung Cheng University, Ming-Hsiung, Chia-Yi 621, Taiwan, ROC*

Received 11 September 2000; accepted 13 September 2001

Il lavoro di Li et al. del 2001 è una testimonianza di come lo sviluppo tecnologico abbia permesso di definire nuove architetture di biosensori. Il lavoro riportato utilizza come metodo di immobilizzazione dell'enzima l'incapsulamento in sol-gel. Questa tecnica di immobilizzazione, al posto del semplice *adsorbimento* tipico dei primi dispositivi, ha reso possibile superare molte limitazioni che riducevano le performances dei biosensori per il lattato. Con questa tecnica infatti è possibile verificare il corretto posizionamento dell'enzima attraverso rilevazioni al SEM (microscopio elettronico a scansione). Un esempio delle immagini ottenute al SEM è riportato in figura 1.7.

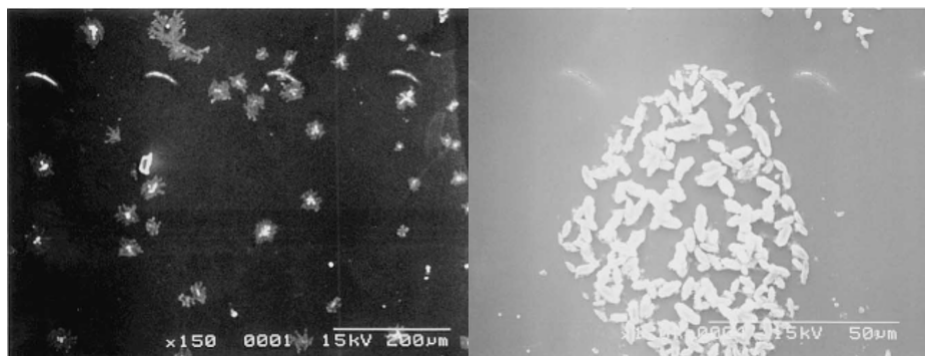


Figura 1.7: Immagini al SEM degli enzimi adsorbiti sulla superficie dell'elettrodo, Li et al. del 2001.

Attualmente in commercio non sono presenti veri e propri biosensori atti alla rilevazione dell'acido lattico, ma solo *kit* diagnostici colorimetrici o spettrofotometrici. Uno degli enzimi più utilizzati per questo tipo di test è la lattato deidrogenasi, LDH, che è in grado di convertire il lattato in piruvato e viceversa, figura 1.8.

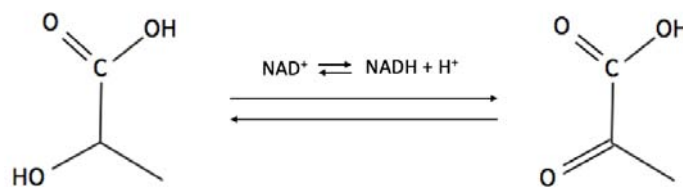


Figura 1.8: Catalisi enzimatica (LDH) lattato-piruvato

I *kit* commerciali rappresentano ad oggi i sistemi maggiormente diffusi per la misura dell'acido lattico, ma sono anche i più complessi. Questi sistemi hanno un'elevata efficienza di reazione e sono in grado di rilevare anche quantità molto contenute di analita. Tuttavia, richiedono strumentazione costosa e personale qualificato. Concetto distante dai biosensori in cui è sufficiente depositare una goccia di campione sulla superficie dell'elettrodo per ottenere il risultato finale.

### 1.2.5 L'importanza dei biosensori per la rilevazione dell'acido lattico

Le nuove tecniche di produzione, le nuove tipologie di analisi, lo studio di nuovi materiali e anche di nuove nozioni in campo fisico e biotecnologico hanno reso possibile un *upgrade* dei biosensori. Nel solo 2016 sono stati pubblicati su giornali scientifici oltre 700 nuovi lavori riguardanti i biosensori per la rilevazione dell'acido lattico. Questo dato è ancora più significativo se confrontato con le 366 pubblicazioni del

2006 e le 199 del 1996, figura 1.9. Questo *trend* sottolinea come la ricerca scientifica in questo campo sia tuttora in crescita e porta ad attendersi che un numero sempre maggiore di risorse siano destinate a queste applicazioni.

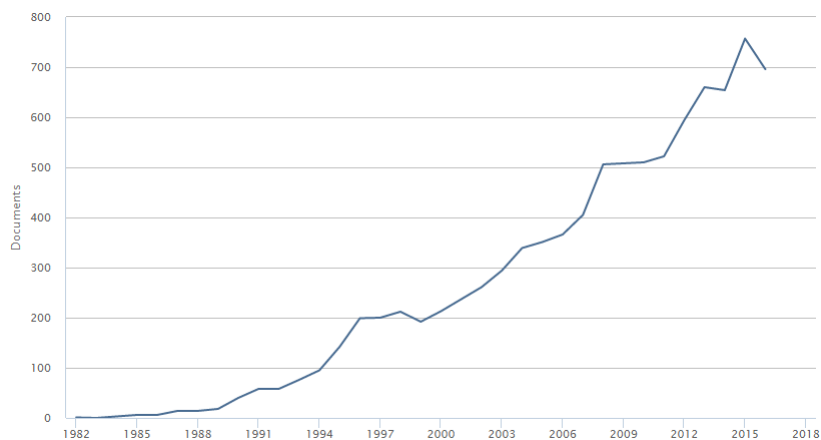


Figura 1.9: Numero di pubblicazioni per anno inerenti biosensori per la rilevazione del lattato

Il grande successo dei biosensori specifici per l'acido lattico, ma anche per i biosensori in generale, è da attribuirsi alla loro versatilità, che li rende adattabili a differenti applicazioni e quindi a più aree di ricerca, come illustrato dal grafico di figura 1.10.

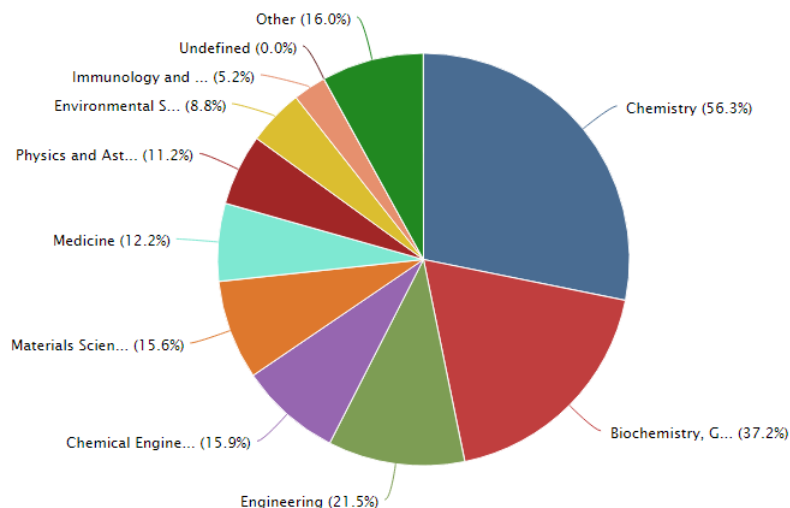


Figura 1.10: Distribuzione dei settori di applicazione dei biosensori per la rilevazione del lattato

### 1.2.6 Esempi di biosensori noti

Alcuni esempi dei biosensori che maggiormente si sono distinti per le innovazioni introdotte, sia in campo scientifico che nel miglioramento delle tecniche di cura dei pazienti, sono elencati di seguito.

#### *Sensori Glicemia*

Ottenere e mantenere ottimale il controllo glicemico è fondamentale per la prevenzione delle complicanze croniche del diabete. Il monitoraggio delle variazioni individuali della glicemia è condizione indispensabile per il raggiungimento degli obiettivi glicemici. L'esigenza di intensificare i controlli ha portato alla messa a punto di *Sistemi di Monitoraggio Continuo del Glucosio* (CGMS, dall'inglese Continuous Glucose Monitoring System). Questi sistemi sono strumenti portatili in grado di misurare, in ogni momento, 24 ore su 24, i livelli di glucosio nell'organismo. I CGMS si basano sull'impiego di biosensori specifici per il glucosio, in grado di misurare la concentrazione dell'analita nel liquido interstiziale sottocutaneo. Questi biosensori utilizzano un sistema enzimatico (enzima glucosio ossidasi GOX) per la conversione delle variazioni dei livelli di glucosio nell'organismo in segnali elettrici, proporzionali alla concentrazione della molecola stessa. Attualmente esistono due differenti tecnologie di funzionamento: i sensori ad *ago-cannula* e i sensori esterni. I più comuni sono sicuramente i sensori ad *ago-cannula*, i quali in modo minimamente invasivo permettono di rilevare la concentrazione di glucosio sottocutanea. Mentre i sensori esterni funzionano sulla base di un processo di microdialisi ed analizzano il liquido di interesse. Entrambi i sistemi hanno rivoluzionato la cura dei pazienti fornendo un'informazione *real time* dei valori di glucosio nel sangue.



Figura 1.11: Esempio di dispositivo per il monitoraggio ed il controllo del glucosio nel sangue

### *Test gravidanza*

Il test di gravidanza è il metodo più veloce ed economico per verificare con buona probabilità ( $> 99,9\%$ ) se una donna è incinta. I test immediati, ovvero quelli acquistabili in farmacia, si basano sulla rilevazione della gonadotropina corionica nelle urine. La gonadotropina corionica, detta anche HGC, è una glicoproteina prodotta dalla placenta, ed è presente nel sangue materno a partire dal decimo giorno dopo la fecondazione. Per questo motivo la rilevazione dell'analita nel siero o nelle urine viene utilizzata come indicatore di gravidanza. Il dispositivo è molto semplice da utilizzare: è sufficiente trasferire un campione di urina nell'apposito tampone e dopo qualche minuto di attesa verificare visivamente il numero di bande colorate comparse. Il biosensore si basa su un sistema di anticorpi accoppiato che è in grado di rilevare se nelle urine è presente il  $\beta$ -HGC[27]. I test sono composti da uno *stick* di materiale plastico al cui interno è presente una striscia assorbente reattiva alla gonadotropina corionica. Nel tampone esposto all'urina sono presenti anticorpi specifici per l'analita, che, essendo liberi di muoversi, per capillarità seguono l'urina e salgono fino alle due strisce che inizialmente sono invisibili. La prima banda contiene anch'essa anticorpi specifici per il  $\beta$ -HGC, ma fissati al supporto. Nella seconda banda, invece, sono presenti solamente anticorpi specifici per gli anticorpi provenienti nel tampone iniziale. In questo modo, se la seconda striscia, che possiede una funzione di controllo, si colora significa che gli anticorpi trasportati dall'urina, e quindi l'urina stessa, hanno attraversato correttamente la prima banda. La prima striscia, invece, se colorata, segnala la presenza di  $\beta$ -HGC nell'urina e, quindi, lo stato di gravidanza.



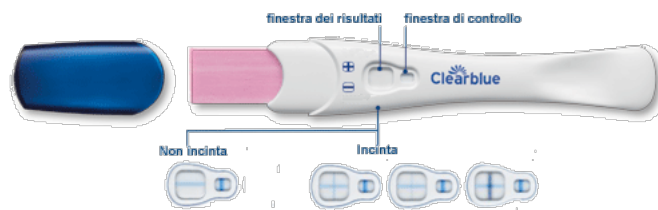


Figura 1.12: Esempio di test di gravidanza commerciale

### *Etilometro*

L'etilometro è uno strumento di misurazione utilizzato per determinare i valori di alcool, cioè di etanolo contenuto nel sangue, attraverso l'analisi dell'aria alveolare espirata[15]. L'etanolo, dopo esser stato ingerito, viene rapidamente assorbito dallo stomaco e dall'intestino tenue e si distribuisce in tutta l'acqua corporea. Oltre il 90% dell'etanolo viene metabolizzato nell'organismo, mentre la restante parte viene eliminata tramite urine, sudore e aria espirata. Essendo il rapporto tra etanolemia e aria alveolare costante, è possibile valutare la concentrazione di alcool nel sangue a partire dall'aria espirata. L'etilometro è composto da un corpo macchina, un bocchaglio e un *display*. I biosensori di gas sono collocati alla fine del bocchaglio in modo che tutta l'aria soffiata al suo interno colpisca il biorecettore. All'interno del biosensore è presente un elemento semiconduttore in grado di reagire con l'aria espirata, andando a modificare la barriera di potenziale formatasi dagli elettroni messi in comune. In condizione normale, ad esempio con solo ossigeno, questa barriera è molto alta impedendo così il passaggio della corrente, ma con la presenza di un gas riducente, come per l'appunto l'etanolo, l'ossigeno non reagisce con il semiconduttore e quindi si ha una diminuzione del potenziale della barriera e di conseguenza del numero di elettroni in grado di attraversarla. Questa corrente risulta esser quindi correlata alla concentrazione di alcool nel sangue, la quale verrà mostrata sul display dell'etilometro. L'innovazione introdotta dall'etilometro è stata quella di esser un dispositivo portatile. Prima della sua invenzione l'alcool nel sangue veniva misurato unicamente tramite le analisi del sangue. Il risultato, quindi, era una procedura invasiva che non permetteva l'applicazione *real time* e *in loco*; perciò, veniva meno la sua utilità di prevenzione.



Figura 1.13: Esempio di etilometro

# Capitolo 2

## I biosensori elettrochimici

### 2.1 Sensori voltammetrici e amperometrici

I sensori voltammetrici e amperometrici possono essere sia di tipo catalitico, che ad affinità. In particolare nel lavoro proposto, d'ora in avanti, si farà riferimento unicamente a biosensori elettrochimici basati sugli enzimi. Le misure voltammetriche e amperometriche, svolte in laboratorio utilizzando il potenziostato, possono essere schematizzate con il circuito elettrico equivalente di figura 2.1.

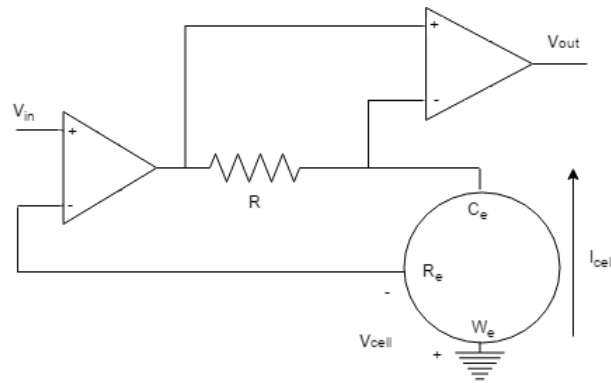


Figura 2.1: Circuito potenziostato

Come si può osservare, con lo strumento siamo in grado di applicare un potenziale  $V_{in}$  al polo positivo dell'amplificatore d'ingresso, che è trasferito all'elettrodo *counter* attraverso un secondo amplificatore. Essendo l'elettrodo di lavoro *working* posto a massa, risulta definita una differenza di potenziale  $\Delta V = V_c - V_w$ . Inoltre, l'alta impedenza dell'amplificatore iniziale, non permette il passaggio di corrente al terzo elettrodo *reference*, rendendolo quindi non polarizzato. Infine, il potenziale  $V_{in}$  in ingresso, è trasmesso al *working* attraverso la resistenza R, generando una differenza di potenziale tra *reference* e *working*,  $V_{cell}$ , in grado di produrre una corrente  $I_{cell}$

tra il *working* e il *counter*. Quest'ultima, infine, permette di definire il potenziale  $V_{out}$  registrato tramite voltammetria, pari a:

$$V_{out} = K \cdot I_{cell}$$

dove  $K$  rappresenta il parametro di resistività del circuito.

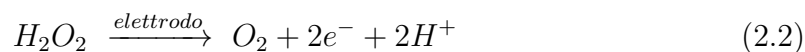
In questo modo è possibile misurare la concentrazione del substrato all'interno di una soluzione attraverso la corrente generata nel campione in seguito ad una reazione redox. Quest'ultima è legata ai fenomeni di ossidazione o riduzione dell'analita stesso o di una sostanza la cui concentrazione è ad esso correlata. I sensori voltammetrici si sono evoluti nel tempo dal punto di vista sia dell'interazione con il recettore biologico che della modalità di trasferimento elettronico tra sito attivo del recettore ed elettrodo. In letteratura i biosensori vengono suddivisi in prima, seconda e terza generazione, a seconda proprio del meccanismo di trasferimento elettronico su cui si basano.

### 2.1.1 Biosensori di prima generazione

Nei dispositivi di prima generazione gli enzimi sono fisicamente intrappolati in una regione limitrofa alla superficie dell'elettrodo. I dispositivi di prima generazione sono caratterizzati da un funzionamento indiretto, in quanto il substrato non entra in contatto direttamente con l'elettrodo: l'enzima, dopo il riconoscimento dell'analita, produce una seconda specie chimica in grado di interagire con l'elettrodo che misura la corrente prodotta dal composto secondario, proporzionale a quella del substrato di riferimento, figura 2.2. Questi biosensori si basano sull'ossigeno molecolare e hanno come scopo quello di rilevare il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) generato durante l'ossidazione del substrato per mezzo di una categoria di enzimi specifici, le ossidasi:



La fase di rigenerazione dell'ossigeno dovuta all'ossidazione del perossido di idrogeno, una volta in contatto con l'elettrodo, è alla base del funzionamento di queste tipologie di dispositivi.



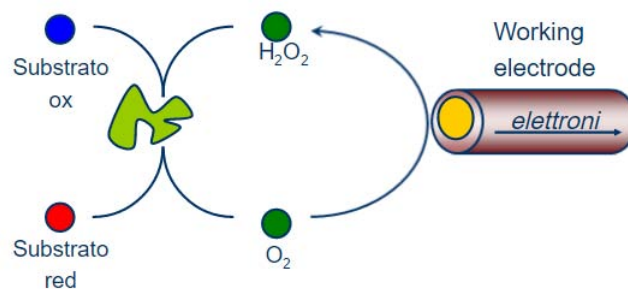
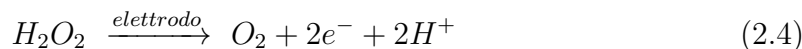


Figura 2.2: Schema di funzionamento dei biosensori di prima generazione

Il successo di tali dispositivi è dovuto al fatto che le misurazioni voltammetriche e amperometriche relative alla formazione di perossido di idrogeno sono molto semplici. Il primo biosensore basato su questa architettura è stato quello per la rilevazione del glucosio nel sangue, fondamentale per il controllo e il trattamento del diabete. In questo caso, è stato utilizzato l'enzima glucosio ossidasi ( $GO_x$ ), in grado di ossidare il glucosio in acido gluconico e produrre perossido di idrogeno in presenza di ossigeno. Il perossido viene monitorato amperometricamente sulla superficie dell'elettrodo:

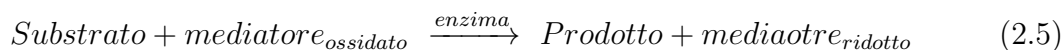


I biosensori di prima generazione hanno dimostrato, nel tempo, alcuni limiti: un grande problema è legato al fatto che la misura del perossido di idrogeno richiede l'utilizzo di un potenziale elevato, al quale molte altre specie costituenti i fluidi biologici sono attive. Ciò è in grado di compromettere la selettività dello strumento, aumentando l'interferenza e riducendo inevitabilmente l'accuratezza e l'affidabilità delle misure. Un ulteriore limite riguarda la stechiometria dell'ossigeno: le concentrazioni normali di tale molecola disciolta nel campione possono infatti risultare non sufficienti per la reazione con il substrato. Al fine di superare queste limitazioni, negli anni sono state apportate alcune modifiche, come ad esempio l'introduzione di una membrana selettiva in modo che solamente la specie di interesse possa entrare in contatto con l'elettrodo, riducendo così l'interferenza.

### 2.1.2 Biosensori di seconda generazione

Con l'utilizzo dei biosensori di prima generazione è apparso evidente come l'interazione biorecettore-elettrodo in modo indiretto fosse soggetta molte limitazioni. Sono stati quindi sviluppati biosensori basati su un principio di interazione differente: la specie chimica secondaria (l'ossigeno) è stata sostituita da sostanze sintetiche, con la funzione di accettori di elettroni, dette mediatori redox, in grado d'esser ossidate

all'elettrodo a potenziale più basso, riducendo così l'interferenza delle sostanze presenti nel campione biologico. Quest'ultime sono state incorporate nella struttura del dispositivo e permettono il trasferimento di elettroni.



I mediatori redox sono liberi di muoversi nello spazio compreso fra enzimi e superficie dell'elettrodo e sono in grado di «traghettare» la carica negativa coinvolta nella reazione.

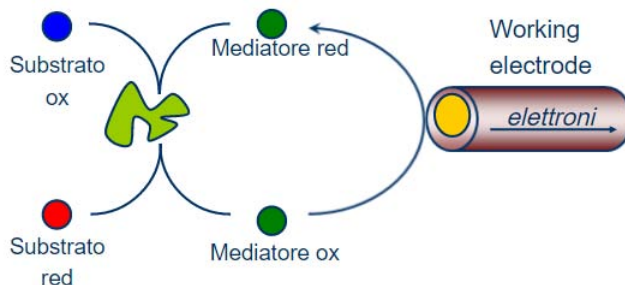
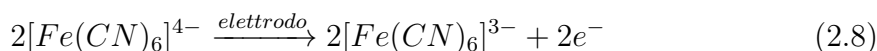
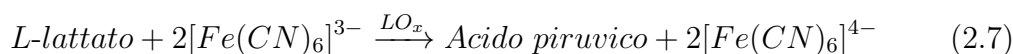


Figura 2.3: Schema di funzionamento dei biosensori di seconda generazione

Il ciclo di trasferimento di carica è composto da due fasi: prima l'elettrone viene trasferito dal biorecettore al mediatore redox, il quale passa alla sua forma ridotta che poi verrà nella seconda fase riossidato una volta entrato in contatto con l'elettrodo. Il processo di mediazione produce una corrente direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita, misurata e quantificata dalla componente elettronica. I mediatori redox sono composti organici o organo-metallici, come ferrocene e derivati, esacianoferrato, sali organici conduttivi (tetrafulvalene) e composti di chinone[1]. Grazie al loro utilizzo è stato possibile ottenere la corrente di ossidazione senza l'impiego dell'ossigeno, rendendo il funzionamento del sensore indipendente da esso. Uno dei primi biosensori di seconda generazione è stato creato per la rilevazione dell'acido lattico ed è basato sull'enzima lattato ossidasi ( $LO_x$ ) e sul mediatore redox ferrocianuro ( $[Fe(CN)_6]^{4-}$ ):



### 2.1.3 Biosensori di terza generazione

Nei biosensori di terza generazione la superficie dei dispositivi è nanostrutturata consentendo agli enzimi immobilizzati il trasferimento elettronico senza necessità di alcun mediatore per effetto tunnel. Nei biosensori di terza generazione, quindi, l'elemento biologico e la componente elettronica diventano un tutt'uno, definendo una nuova architettura del biosensore. La fase di ancoraggio di questi elementi all'elettrodo può essere realizzata attraverso differenti meccanismi di immobilizzazione:

- *adsorbimento*;
- *intrappolamento in matrice a base di gel*;
- *microincapsulamento*;
- *legame covalente*;
- *cross-linking*.

Grazie all'ottimizzazione delle tecniche di immobilizzazione, ed alle tecniche di nanofabbricazione delle superfici elettrodiche, è stato possibile realizzare dispositivi in grado di eseguire misure *real time* e in modo ripetuto senza l'impiego di mediatori redox, in quanto non è più necessario un tramite per il trasporto degli elettroni dalla reazione dal sito redox alla superficie dell'elettrodo[5]. Inoltre, perfezionando la tecnica di immobilizzazione della componente biologica, si sono abbassati notevolmente i costi di produzione.

Grazie all'utilizzo dei dispositivi di terza generazione è stato possibile testare biorecettori differenti dagli enzimi. In particolare, in alcune circostanze, tessuti cellulari vegetali o cellule di origine batterica si sono dimostrati più performanti rispetto agli enzimi isolati. Infatti, gli enzimi dei tessuti provenienti da tali cellule sono meno soggetti a degradazione in quanto collocati nel loro *habitat*; ciò permette un notevole aumento della vita dell'enzima e, di conseguenza, dell'intero dispositivo. Gli enzimi vengono protetti dal loro involucro cellulare da variazioni biologiche e fisiche come temperatura e pH, a differenza degli enzimi immobilizzati direttamente sull'elettrodo che risultano maggiormente esposti a questi fattori di degradazione. Nonostante i numerosi vantaggi, l'utilizzo di tali enzimi comporta alcuni svantaggi: si assiste ad una forte riduzione della selettività del biorecettore e, di conseguenza, del dispositivo stesso, in quanto nei tessuti non è presente un unico tipo di enzima. Inoltre, nei tessuti cellulari sono presenti composti biologici in grado inevitabilmente di ostacolare e rallentare il trasferimento elettronico producendo così un ritardo nella trasmissione del segnale, oltre che una riduzione dell'effetto catalitico dell'enzima.

## 2.2 Componente biologica

I biosensori elettrochimici di tipo catalitico, come sottolineato in precedenza, sono in gran parte costituiti da enzimi come elementi biologici di riconoscimento. Ogni tipo

di enzima è in grado di rilevare in modo altamente selettivo un substrato differente, caratteristica di fondamentale importanza per un biorecettore.

### 2.2.1 Cos'è un enzima?

Gli enzimi sono proteine complesse, con il ruolo di velocizzare una determinata reazione chimica senza aumentare la richiesta energetica necessaria allo svolgimento della reazione stessa. Gli enzimi vengono infatti definiti anche come catalizzatori biologici[44]. Il processo catalitico degli enzimi permette alla reazione di raggiungere in modo più rapido lo stato di equilibrio termodinamico grazie al fatto che l'enzima è in grado di abbassare l'energia richiesta per l'attivazione della reazione, figura 2.4.

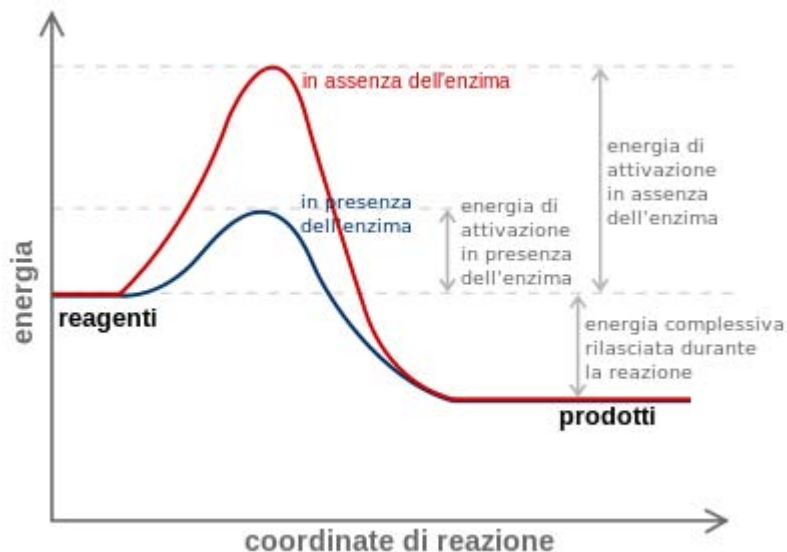


Figura 2.4: Variazione del livello energetico di attivazione della reazione in presenza e assenza dell'enzima

Una delle principali caratteristiche degli enzimi è sicuramente la grande selettività nei confronti dell'analisita. Tale caratteristica è correlata a diversi fattori che sono coinvolti nel processo di riconoscimento enzima-substrato, come ad esempio l'affinità strutturale morfologica, la polarità o ancora la natura idrofobica o idrofilica dell'enzima. In alcuni tipi di enzimi, inoltre, sono presenti regioni particolari, dette siti allosterici, che funzionano come un vero e proprio interruttore per il funzionamento dell'enzima[32]. Tuttavia, va sottolineato che gli enzimi non sono in grado di alterare l'equilibrio chimico di una reazione, ma solamente di modificarne la velocità. L'attività enzimatica può essere influenzata anche da alcuni fattori esterni come temperatura, pH e concentrazioni del substrato e dei cofattori. Gli enzimi possono essere classificati in sei differenti gruppi sulla base del tipo di catalisi:



- *ossidoreduttasi*, enzimi che favoriscono i processi di ossidoriduzione;
- *idrolasi*, enzimi che catalizzano l'idrolisi di alcuni tipi di legami chimici;
- *transferasi*, enzimi legati al trasferimento di un gruppo funzionale specifico;
- *ligasi*, ovvero enzimi che consentono la formazione di un legame covalente tra due molecole;
- *isomerasi*, enzimi coinvolti nell'organizzazione a livello intramolecolare;
- *liasi*, alternativa a idrolisi e ossidoriduzione, per rompere i legami covalenti.

Gli enzimi sono caratterizzati da strutture a differenti livelli che ne definiscono le principali caratteristiche identificative, figura 2.5. La struttura primaria è costituita dalla sequenza degli amminoacidi che compongono l'enzima, definendo quindi la sua natura e funzione biologica. La struttura secondaria, invece, descrive la formazione di legami idrogeno tra gruppi CO e NH dello scheletro polipeptidico degli amminoacidi adiacenti nella struttura primaria. In questo modo è possibile ricavare informazioni inerenti la conformazione locale della proteina. La struttura terziaria identifica i legami e le interazioni tra i gruppi R degli amminoacidi stessi, definendo quindi la conformazione spaziale assunta dall'enzima. Infine la quaternaria fa riferimento all'organizzazione degli enzimi formati da più sub-unità., caratterizzando, di conseguenza, l'attività dell'enzima stesso[9]. Della totalità dell'enzima solo una piccola regione, detta sito attivo, è direttamente coinvolta nell'attività catalitica; il compito principale di questa regione è quello di riconoscere il substrato, entrare in contatto con esso e completare la reazione. Nella struttura dell'enzima possono esser presenti anche regioni dedicate ai prodotti della reazione, che hanno la funzione di inibire o incrementare l'attività dell'enzima stesso[7].

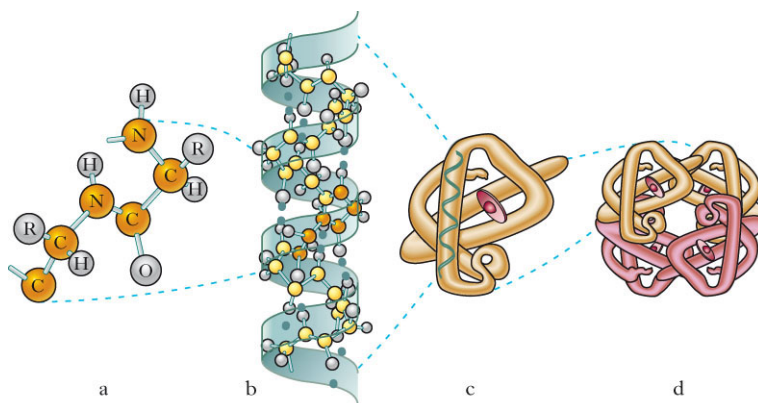


Figura 2.5: Rappresentazione dei 4 livelli delle strutture enzimatiche: a) s. primaria b) s. secondaria c) s. terziaria d) s. quaternaria

## 2.2.2 Cinetica degli enzimi

Gli enzimi, come descritto in precedenza, sono caratterizzati dall'esser estremamente specifici per un determinato substrato. Ciò è garantito sia a livello chimico che strutturale, in quanto l'articolata configurazione di queste macromolecole è tale da renderle fisicamente compatibili con un unico tipo di substrato, che risulta complementare al sito di legame. In figura 2.6 è riportata la struttura morfologica di un enzima in presenza e in assenza del *matching* morfologico tra sito attivo e substrato.

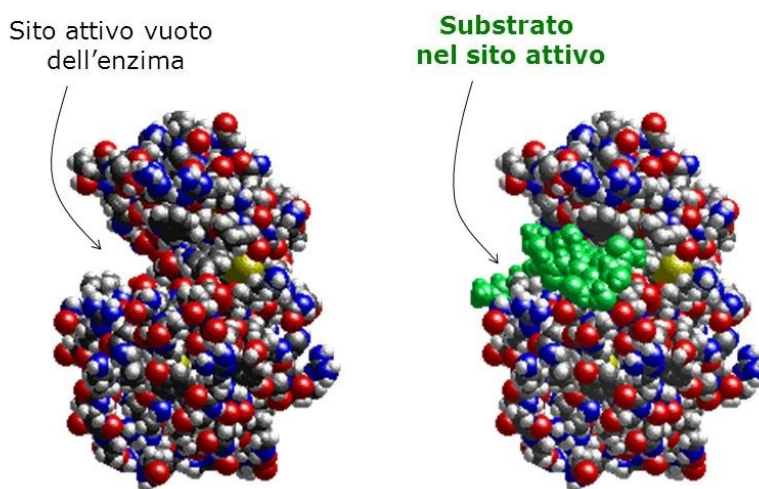
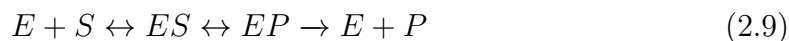


Figura 2.6: Morfologia dell'enzima in assenza e presenza del substrato

La cinetica enzimatica è il processo che descrive la velocità della reazione di catalisi, al variare della concentrazione di substrato ed enzima; essa definisce il legame enzima-substrato caratterizzando il processo di formazione del prodotto finale. Agli inizi del '900 Leonor Michaelis e Maud Menten svilupparono una teoria, la cosiddetta *cinetica di Michaelis-Menten*, in grado di quantificare questo processo e ancora oggi riconosciuta ed utilizzata per spiegare la cinetica enzimatica[22]. Questa teoria si basa essenzialmente su tre componenti: substrato, enzima e prodotto. In particolare, in fase iniziale, il substrato (S) dopo esser stato riconosciuto dall'enzima (E), vi si lega in modo reversibile, andando a definire un nuovo composto, il complesso enzima-substrato (ES). Successivamente il substrato, confinato nel complesso appena generato, viene convertito in prodotto (P) che verrà liberato dal sito attivo dell'enzima[43], figura 2.7:



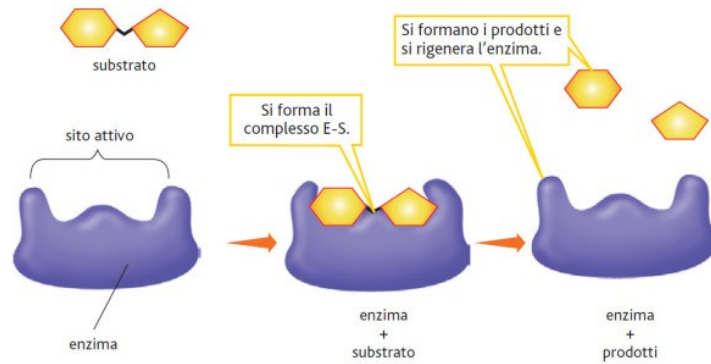
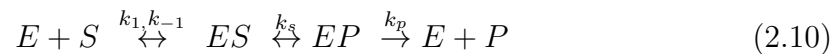


Figura 2.7: Rappresentazione grafica del meccanismo di Michaelis-Menten

In particolare ognuna di queste reazioni è caratterizzata da una propria costante di velocità ( $k_i$ , dove  $i$  rappresenta la reazione  $i$ -esima):



La velocità di reazione, figura 2.8, rappresenta uno dei parametri più importanti e può essere influenzata da diversi fattori, come la quantità di substrato presente o le condizioni di temperatura e pH della soluzione. La velocità di reazione è proporzionale alla quantità di substrato presente. Incrementando la quantità di analita si raggiunge la velocità massima di reazione ( $V_{max}$ )[31]. Tale valore rappresenta un asintoto per il parametro cinetico. L'esistenza di un limite superiore nella velocità di reazione è dovuta al fatto che tutti i siti attivi dell'enzima in grado di ospitare un determinato substrato sono stati saturati. Un secondo parametro utilizzato per caratterizzare la cinetica enzimatica è la costante di *Michaelis-Menten* ( $K_m$ )[49]. Quest'ultima è ricavata a partire dalla velocità di saturazione e rappresenta la quantità di substrato necessaria per raggiungere una velocità pari alla metà di  $V_{max}$ . I parametri  $K_m$  e  $V_{max}$  sono caratteristici di ogni enzima in condizione *standard*.

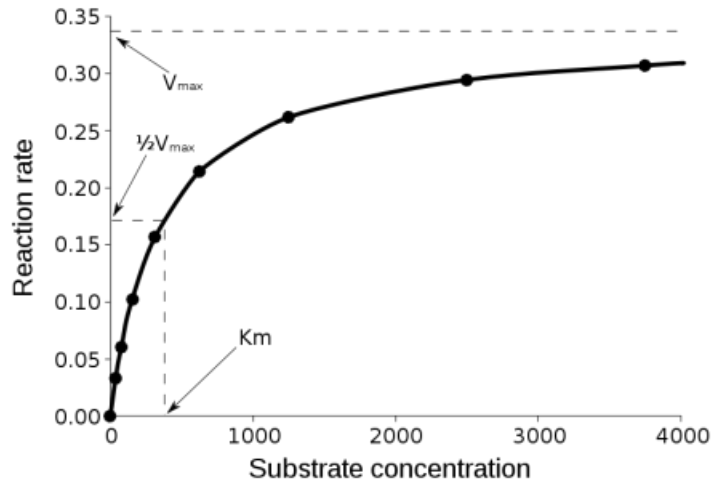


Figura 2.8: Andamento tipico della cinetica di Michaelis-Menten

Per quantificare la cinetica di *Michaelis-Menten* si fa riferimento ai parametri, descritti in equazione (2.10),  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_p$ , mentre il parametro  $k_s$  viene generalmente trascurato in quanto rappresenta un passaggio transitorio nella trasformazione substrato-prodotto e non costituisce il collo di bottiglia della reazione. In fase iniziale, come descritto in precedenza, la catalisi enzimatica è caratterizzata dal riconoscimento del substrato da parte dell'analita e la trasformazione in complesso ES.

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_p)[ES] \quad (2.11)$$

L'equazione (2.11) rappresenta la formazione del complesso enzima-substrato in una situazione di equilibrio dinamico, detta stato stazionario, che si mantiene costante nel tempo[45]. La somma della quantità di enzima libero  $[E]$  e del complesso  $[ES]$  rappresenta la concentrazione totale dell'enzima stesso e viene indicata con  $[E_0]$ :

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.12)$$

Ricavando la formula dell'enzima libero e sostituendola in equazione (2.11) si ottiene:

$$k_1([E_0] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_p)[ES] \quad (2.13)$$

Attraverso l'equazione (2.13) è possibile ricavare la concentrazione di  $[ES]$  in funzione della concentrazione del substrato  $[S]$  e di  $[E_0]$ :

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_p} \quad (2.14)$$

Dall'equazione (2.14) è possibile ottenere la velocità di formazione del prodotto finale, ricavato come variazione della concentrazione molare del composto ES nel tempo:

$$v = -\frac{d[ES]}{dt} = k_p[ES] = k_p \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_p} \quad (2.15)$$

Da cui:

$$v = \frac{k_p[E_0][S]}{k_m + [S]} \quad (2.16)$$

Infine, considerando che si fa riferimento allo stato stazionario, il valore  $k_p E_0$  rappresenta la velocità massima  $V_{max}$  e, quindi, l'equazione della velocità si può semplificare nel seguente modo:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.17)$$

Quest'ultima equazione prende il nome di *equazione di Michaelis-Menten* e permette di mettere in relazione la velocità di formazione della specie prodotta con la quantità di substrato iniziale attraverso la costante di velocità  $K_m$  e il valore di velocità a saturazione ( $V_{max}$ ). Come descritto in precedenza la costante  $K_m$  rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione avvenga con una velocità pari alla metà di quella massima, e vale:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \quad (2.18)$$

Questo parametro esprime in modo quantitativo l'affinità enzima-substrato: più  $K_m$  è basso maggiore sarà l'affinità tra i due e, perciò, minore sarà la concentrazione di analita necessaria per raggiungere la  $V_{max}$ . In molti casi utilizzando il grafico di *Michaelis-Menten*, figura 2.9, risulta difficile quantificare i parametri cinetici di interesse; per questo motivo spesso si fa riferimento al grafico di *Lineweaver-Burk*. Tale grafico riporta in ascissa il reciproco della concentrazione del substrato, mentre in ordinata il reciproco della velocità di reazione misurata all'istante iniziale, rispettivamente  $\frac{1}{[S]}$  e  $\frac{1}{[v]}$ . Il grafico è basato sulla seguente equazione:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.19)$$

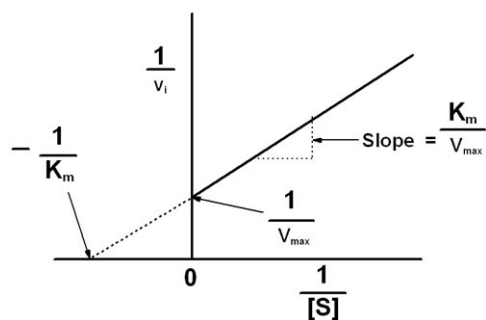


Figura 2.9: Esempio di grafico di Lineweaver-Burk

Dunque, utilizzando questo grafico come riferimento, la cinetica di *Michaelis-Menten* si riduce a una retta che intercetta l'asse delle ascisse in  $-\frac{1}{K_m}$  e in ordinata  $\frac{1}{V_{max}}$  e che possiede un coefficiente angolare pari a  $\frac{K_m}{V_{max}}$ .

### 2.2.3 Esempi di enzimi utilizzati nei biosensori per la rilevazione del lattato

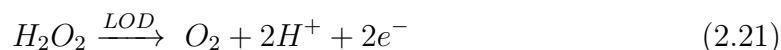
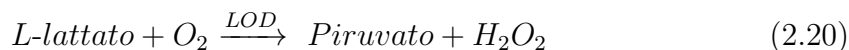
Le caratteristiche degli enzimi che ne hanno segnato il successo come biorecettori, sono l'elevata selettività, la velocità di reazione e l'effetto catalitico, il quale garantisce un incremento di sensibilità del biosensore.

Per la fabbricazione di biosensori per la rilevazione del lattato negli anni sono stati utilizzati principalmente due tipologie di enzimi[24, 33]:

- *lattato ossidasi (LOD)*;
- *lattato deidrogenasi (LDH)*.

#### 2.2.3.1 Lattato ossidasi

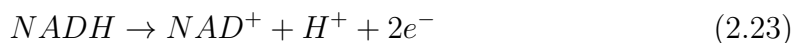
L'enzima lattato ossidasi (LOD) è una proteina che può esser ricavata da determinate tipologie di specie batteriche, come *Pediococcus*, *Aerococcus viridans* e *Mycobacterium smegmatis*[13][39]. Questo enzima è in grado di catalizzare il processo di ossidazione del L-lattato e generare piruvato e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) in presenza di ossigeno ( $O_2$ ) disciolto in soluzione. Il perossido di idrogeno è un composto elettrochimicamente attivo, che può essere ossidato producendo una corrente. I biosensori caratterizzati dalla lattato ossidasi si basano sulle seguenti reazioni nel caso di biosensori di prima generazione:



Oppure sulle reazioni (2.7) e (2.8) nel caso di biosensori di seconda reazione.

### 2.2.3.2 Lattato deidrogenasi

Un altro enzima molto utilizzato, la cui efficienza non dipende dall'ossigeno disciolto in soluzione è la lattato deidrogenasi (LDH). Si tratta di una proteina quaternaria presente in svariati organismi, come animali, piante e cellule procariote[23, 17]. Questo enzima rappresenta un fondamentale parametro in campo medico poiché è presente in numerosi tessuti, nel sangue e nei muscoli cardiaci. La sua importanza risiede nel fatto che esso viene prodotto in situazioni di danneggiamento tissutale e, perciò, rappresenta un indicatore correlato a lesioni o malattie comuni dei tessuti. La catalisi del LDH è basata sul cofattore  $NAD^+$ , un coenzima redox in grado anche di trasportare gli elettroni dall'enzima alla superficie dell'elettrodo. L'enzima, infatti, è in grado di convertire la L-lattato, in presenza del mediatore, in piruvato, NADH e  $H^+$ . Successivamente il NADH prodotto, a contatto con l'elettrodo, viene ri-ossidato in  $NAD^+$ , grazie al potenziale applicato alla superficie. La corrente così prodotta risulta proporzionale alla concentrazione di L-lattato in soluzione.



Anche utilizzando l'enzima LDH, l'ossidazione del NADH richiede un potenziale di ossidazione tale da produrre interferenza in soluzioni biologiche, ma esistono particolari tipologie di elettrodo, come quello in carbonio, in grado di abbassare la soglia di tensione. Questo aspetto ha fatto sì che nel tempo l'enzima LDH fosse preferito alla LOD, caratterizzando la maggior parte dei lavori scientifici.

### 2.2.4 Processo di immobilizzazione

L'immobilizzazione dell'elemento biologico sulla superficie dell'elettrodo, ha un ruolo chiave nella realizzazione di un biosensore. Negli anni non è stato solo perfezionato il processo di ancoraggio dell'enzima, ma anche il meccanismo di produzione è stato reso tale da permetterne l'isolamento e la purificazione senza ridurne la funzionalità. Prendendo in esame sia gli enzimi isolati che quelli tissutali è chiaro come l'immobilizzazione rappresenti un elemento chiave che influenza la *performance* del dispositivo finale. Per tale motivo un ramo specializzato del settore della ricerca biosensoristica si è incentrato sullo studio della biocompatibilità dell'elettrodo. In questo senso sono stati fondamentali i grandi passi in avanti fatti nello studio dei materiali, che hanno permesso di realizzare superfici elettrodiche sempre più simili all'ambiente cellulare, una condizione fondamentale per la sopravvivenza dell'enzima[30]. Le tecniche di immobilizzazione possono essere classificate in base alla natura del legame: si parla quindi di immobilizzazioni chimiche e fisiche.

#### 2.2.4.1 Immobilizzazione fisica

Il processo di ancoraggio di natura fisica è il più semplice da effettuare e consiste nel trattenere l'enzima a contatto con la superficie dell'elettrodo nel modo meno invasivo possibile. Le principali tecniche di immobilizzazione di natura fisica sono:

- *adsorbimento*;
- *intrappolamento in matrice gel*;
- *incapsulamento*.

L'*adsorbimento* è la tecnica di immobilizzazione meno complessa, in quanto si basa su interazioni di tipo reversibile tra enzima e superficie dell'elettrodo. Sfruttando la naturale affinità chimica tra determinati materiali utilizzati come supporto e gli enzimi è possibile generare interazioni reversibili tra di essi. Questa tecnica non richiede, perciò, alcuna attivazione o modifica chimica dell'enzima; inoltre, non prevede uno specifico pretrattamento superficiale del supporto. Ne consegue che i principali vantaggi legati all'adsorbimento sono sicuramente la facilità di realizzazione e i contenuti i costi di produzione. Per quanto riguarda, invece, gli aspetti negativi è importante ricordare l'instabilità del legame che si viene a formare, in quanto si tratta di un legame debole.

L'*intrappolamento*, invece, è una tecnica che si basa sull'immobilizzazione dell'enzima all'interno di una matrice a base di gel polimerico. La proteina viene prima inserita all'interno del gel e, in seguito, confinata grazie alla polimerizzazione[6]. In questo modo viene a formarsi un reticolo in grado di confinare gli enzimi. Questo metodo è relativamente semplice ed adattabile ad ogni tipo di enzima; inoltre, i costi di realizzazione sono molto contenuti. Gli svantaggi, invece, sono correlati principalmente alla possibile perdita di attività enzimatica.

L'*incapsulamento* è una tecnica che prevede l'immobilizzazione dell'enzima sulla superficie dell'elettrodo attraverso l'utilizzo di membrane semipermeabili al substrato e al prodotto, composte da microcapsule di polimeri organici. Tra le più diffuse tipologie di membrana ricordiamo quelle a base di acetato di cellulosa, collagene, nafion e teflon. Sfruttando questa tecnica è possibile immobilizzare l'enzima all'elettrodo in modo forte senza alterare l'efficienza e la stabilità dell'enzima stesso; infatti, la matrice è in grado di proteggerlo da fattori interferenti esterni come agenti chimici e variazioni di temperatura o pH. Tuttavia, esistono alcuni svantaggi legati al processo di diffusione, in quanto un accumulo repentino della sostanza prodotta dalla reazione è in grado di danneggiare la membrana stessa[3].

#### 2.2.4.2 Immobilizzazione chimica

I processi di immobilizzazione chimica sfruttano i gruppi funzionali dell'enzima per creare legami chimici tra enzima e elettrodo[25]. Il processo di ancoraggio richiede tipicamente due fasi: prima viene attivata la superficie del supporto utilizzando



molecole polifunzionali e, successivamente, quest'ultime interagiscono con i gruppi funzionali dell'enzima stesso. Le principali tecniche di immobilizzazione chimica sono le seguenti:

- *legame covalente*;
- *cross-linking*.

Il *legame covalente* è sicuramente la tecnica più diffusa per l'immobilizzazione dell'enzima al supporto. Esso coinvolge alcuni gruppi funzionali non essenziali dell'enzima che vengono legati in modo covalente a siti di legame presenti sul supporto[48][28, 29]. Ai fini di ottimizzare la creazione dei legami tra enzima e supporto, risulta fondamentale inserire, a contatto con la superficie dell'elettrodo, dei gruppi reattivi con la funzione di precursori del legame covalente. La principale caratteristica dell'unione covalente è legata all'estrema stabilità del sistema dovuta alla forza del legame stesso.

Il *cross-linking* si basa sulla creazione di legami covalenti tra diversi enzimi così da creare degli aggregati tridimensionali tali da non poter esser disciolti in acqua. A questo scopo vengono utilizzati agenti bifunzionali, come ad esempio la glutaraldeide[41][53]. Questa tecnica di immobilizzazione si distingue per la semplicità di realizzazione e per via dei forti legami che si creano, di tipo covalente. Gli aspetti negativi, invece, sono legati soprattutto al fatto che la formazione dei legami può danneggiare gli enzimi o limitarne l'efficienza[25].

## 2.3 Performance dei biosensori

I biosensori vengono valutati utilizzando alcuni parametri che consentono di eseguire confronti tra differenti prodotti. Essi sono fondamentali per la scelta della corretta tecnologia da utilizzare in base alle *performances* richieste. Tra i parametri più importanti ricordiamo:

- *selettività*;
- *limite di rilevabilità*;
- *limite di quantificazione*;
- *range di sensibilità*;
- *stabilità nel tempo*;
- *tempo di risposta e di recupero*;
- *riproducibilità delle misure*.

La *selettività* è la capacità del biosensore di riconoscere un determinato analita in presenza di altri elementi biologici e rappresenta forse la caratteristica più importante del dispositivo. Questa caratteristica viene definita principalmente dal biorecettore utilizzato e in parte anche dalla componente elettronica.

Il *limite di rilevabilità* (LOD, *limit of detection*) è la più bassa concentrazione di substrato in un campione che può essere rilevata dal biosensore e, perciò, equivale alla più bassa concentrazione di substrato in grado di produrre un segnale differente dalla *baseline*, il segnale prodotto in assenza di analita. La definizione analitica di LOD, in accordo con la definizione IUPAC, risulta essere:

$$LOD = \mu_{blank} + 3\sigma_{blank}$$

dove  $\mu_{blank}$  è il segnale medio prodotto dalla baseline, mentre  $\sigma_{blank}$  è la deviazione standard della medesima misura.

Il *limite di quantificazione* (LOQ, *limit of quantification*), invece, è la più bassa concentrazione di analita all'interno di un campione che il sistema è in grado di determinare in modo quantitativo:

$$LOQ = \mu_{blank} + 5\sigma_{blank}$$

Il *range di sensibilità* rappresenta l'intervallo di concentrazione compreso fra il limite di rilevabilità e la concentrazione massima di analita rilevabile; perciò, tale parametro definisce un *range* di concentrazione dell'analita in modo che esso possa essere rilevato. Strettamente correlato a tale parametro viene definito l'intervallo di linearità, ovvero il *range* in cui la risposta elettrochimica del dispositivo ha una dipendenza lineare con l'analita.

La *stabilità* è la capacità di mantenere il corretto funzionamento del sistema per un certo periodo di tempo.

Con *tempo di risposta* e di *recupero* vengono definiti l'intervallo temporale necessario per ottenere una risposta quantificata in modo certo e stabile ed il periodo necessario affinché il sistema sia in grado di effettuare una nuova misura sul campione successivo.

Infine, con *riproducibilità* delle misurazioni si fa riferimento all'accuratezza ed alla precisione delle misurazioni, nonché alle deviazioni *standard* assolute e relative ottenute dalla ripetizione delle misure sugli stessi campioni.

# Capitolo 3

## Tecniche di misura

Per la caratterizzazione dei biosensori, in particolare per quanto concerne quelli catalitici, utilizzando gli enzimi come biorecettori, esistono diverse tecniche. Queste possono essere utilizzate per verificare le proprietà degli enzimi, quelle chimico-morfologiche degli elettrodi e quelle elettrochimiche dei dispositivi funzionalizzati o meno. Tra quelle più diffuse ed affermate vi sono:

- *ciclovoltammetria (CV)*;
- *amperometria*;
- *spettrofotometria UV-Vis*;
- *spettroscopia elettrochimica di impedenza (EIS)*.

### 3.1 Ciclovoltammetria

La ciclovoltammetria, o voltammetria ciclica, rappresenta una delle tecniche di misura più diffusa legata ai biosensori enzimatici amperometrici. Essa è forse la tecnica più utilizzata per ricavare informazioni sulle reazioni elettrochimiche che avvengono sulla superficie dell'elettrodo. Gli aspetti che maggiormente ne hanno segnato il successo riguardano principalmente la capacità di fornire importanti indicazioni sulla dinamica dei principali processi del biosensore, come reazioni ossido-riduzione, cinetica delle reazioni di trasferimento elettronico e da diffusione. Inoltre, con questa tecnica è possibile valutare i potenziali di ossido-riduzione caratteristici delle specie elettroattive in soluzione, nonché gli effetti dei mediatori su processi *redox*. La ciclovoltammetria consiste nella misurazione della corrente prodotta all'interno del sistema elettrochimico in esame in corrispondenza di una scansione lineare ripetuta del potenziale di un elettrodo di lavoro stazionario dal suo valore massimo al minimo e viceversa. Il potenziale applicato è definito da una forma d'onda triangolare, come indicato in figura 3.1.

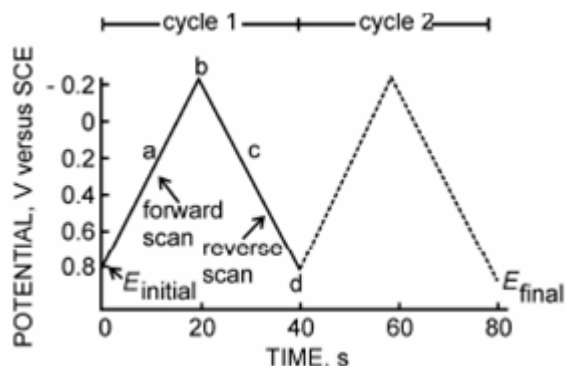


Figura 3.1: Esempio di forma d'onda di potenziale tipico della ciclovoltammetria

Il potenziale applicato è caratterizzato da alcuni parametri che ne definiscono l'andamento nel tempo. Ogni periodo detto *sweep*, è composto da una fase di crescita lineare seguita da una fase di decrescita. La pendenza dei tratti lineari è detta *scan rate*. Altri parametri specifici legati alla tensione sono  $E_0, E_{low}$  e  $E_{high}$ , rispettivamente i valori di tensione iniziale, minima e massima. Lo strumento che consente di applicare la tensione e di misurare la corrente prodotta durante la scansione del potenziale, è detto potenziostato, ed ha uno schema elettrico che può essere descritto in modo semplificato da quello riportato in figura 2.1. La rappresentazione della corrente misurata rispetto al potenziale applicato è chiamata ciclovoltammogramma. Un esempio di ciclovoltammogramma è riportato in figura 3.2.

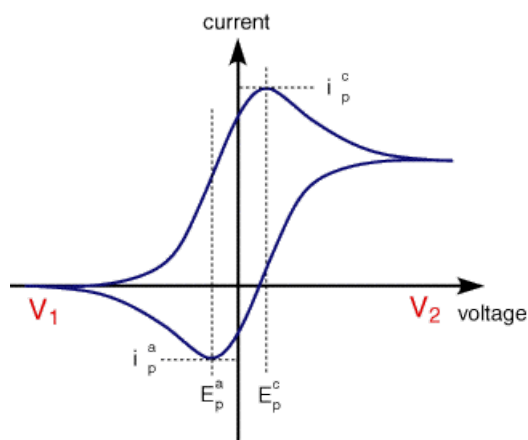


Figura 3.2: Esempio di un tipico voltammogramma

Il grafico mostra l'andamento tipico della corrente in un sistema reversibile, da cui si possono ricavare fondamentali indicazioni riguardo il passaggio di stato da ossidato a ridotto, e viceversa, da parte del substrato o del mediatore utilizzato. Tipicamente i voltammogrammi presentano due tipi di risposta, una anodica e una catodica, che dipendono dal potenziale applicato e dal segno della pendenza della

rampa di tensione. Finché la tensione in *input* è in fase di crescita lineare, e si avvicina, quindi, al valore di tensione di riduzione elettrochimica, verrà prodotta in risposta una corrente catodica. Questa tende ad aumentare fino al raggiungimento di un valore massimo ( $i_p^c$ ) in corrispondenza della quale si individua il potenziale di riduzione ( $E_p^c$ ). Successivamente la corrente catodica in risposta è caratterizzata da una fase decrescente, dando luogo al caratteristico picco catodico del ciclo voltammogramma. Successivamente avviene l'inversione della tensione applicata, in modo da completare la *sweep* della voltammometria ciclica. Il potenziale, quindi, partendo dal valore di  $E_{high}$  diminuisce fino al raggiungimento della tensione minima applicata  $E_{low}$ . Ne consegue che la specie ridotta, generata in fase catodica, subisce un processo di ossidazione all'elettrodo, caratterizzato da una corrente di segno opposto. La corrente anodica è caratterizzata da un aumento in modulo del valore registrato, verso valori sempre più negativi, fino al raggiungimento del picco di corrente anodico ( $i_p^a$ ), in corrispondenza del quale si individua la tensione di ossidazione ( $E_p^a$ ). Successivamente la corrente crescerà fino al valore con cui era iniziata la fase catodica. L'alternanza dei picchi caratteristici del ciclo voltammogramma sono conseguenza della formazione di uno strato diffusivo in prossimità della superficie dell'elettrodo. In particolare, l'intensità della corrente registrata è strettamente correlata all'andamento del gradiente di concentrazione nel tempo. La presenza di picchi di corrente corrisponde al raggiungimento del controllo diffusivo (anodico e catodico). La fase di decrescita successiva al picco di corrente, invece, è caratterizzata da un andamento proporzionale a  $t^{-\frac{1}{2}}$  e dipende dalla tensione applicata.

### 3.1.1 Interpretazione del voltammogramma

Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo della ciclo voltammometria come tecnica per la caratterizzazione di un processo consiste nel fatto che la maggior parte dei parametri di interesse sono direttamente osservabili dal ciclo voltammogramma; risulta estremamente semplice e immediato ricavare informazioni riguardo le correnti di picco anodico e catodico e i relativi potenziali di riferimento. Conoscendo questi quattro parametri è possibile stabilire ad esempio la reversibilità del sistema in cui si sta svolgendo la reazione di ossido-riduzione.

### 3.1.2 Sistemi reversibili o Nerstiani

Un sistema viene definito reversibile qualora, in seguito all'inversione del potenziale applicato in input, all'interno della cella elettrochimica avviene unicamente l'inversione della reazione *redox*, senza la comparsa di altre reazioni. Tipicamente affinché una reazione sia di tipo reversibile la cinetica di reazione dev'essere estremamente veloce, il processo alla base di quest'ultima dev'essere governato dalla diffusione e, infine, i fenomeni di trasporto di massa devono essere molto lenti se confrontati con le cinetiche di reazione. I sistemi reversibili sono caratterizzati da alcuni aspetti molto importanti:

- il rapporto tra corrente di picco anodico e catodico è unitario in modulo:

$$\frac{|i_p^c|}{|i_p^a|} = 1$$

- il valore di corrente di picco  $i_p$  (che corrisponde a  $i_p^c$  e  $i_p^a$  dalla considerazione precedente) è espresso in forma analitica dall'*equazione di Randles-Sevcik*:

$$i_p = 0.4463 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{\frac{z \cdot F \cdot v \cdot D}{R \cdot T}} \quad (3.1)$$

che può essere semplificata, qualora la reazione avvenga a temperatura ambiente (25 °C), nel seguente modo:

$$i_p = 2.686 \cdot 10^5 \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{n^3 \cdot D \cdot v} \quad (3.2)$$

dove  $n$  è il numero di elettroni scambiati durante la reazione,  $F$  la costante di Faraday (96485,336  $\frac{C}{mol}$ ),  $A$  l'area esposta dell'elettrodo ( $cm^2$ ),  $C$  la concentrazione della specie di interesse,  $v$  lo scan rate,  $D$  il coefficiente di diffusione ( $\frac{cm^2}{s}$ ),  $R$  la costante universale dei gas ( $\frac{J}{mol \cdot K}$ ) e  $T$  la temperatura (K).

Dall'*equazione di Randles-Sevcik* risulta che l'intensità della corrente di picco è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato e dipende dalla radice quadrata dello *scan rate*, figura 3.3.

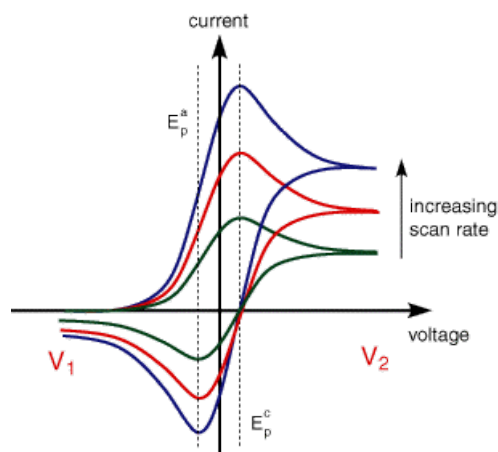


Figura 3.3: Dipendenza del voltammogramma dallo scan rate utilizzato

- il potenziale standard caratteristico della reazione,  $E^0$ , equivale alla media aritmetica dei potenziali di riferimento anodico e catodico:

$$E^0 = \frac{E_p^a + E_p^c}{2} \quad (3.3)$$

- la posizione dei picchi di ossidazione e riduzione sull'asse delle tensioni dipende unicamente dal numero di elettroni coinvolti nella reazione *redox* all'elettrodo; in particolare a 25 °C la loro distanza  $\Delta E_p$  è pari a:

$$\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = \frac{59mV}{n} \quad (3.4)$$

Inoltre, data la difficoltà nell'individuazione esatta del potenziale anodico o catodico, è stato definito un metodo per verificare la reversibilità del sistema. Poiché il picco non è puntuale, ma possiede una certa larghezza sull'asse delle tensioni, spesso risulta più semplice calcolare il potenziale  $E_{\frac{p}{2}}$  corrispondente alla tensione relativa a metà della corrente di picco. In conclusione, si dice reversibile un sistema in cui vale, a temperatura ambiente, la seguente relazione:

$$|E_p - E_{\frac{p}{2}}| = \frac{56.5mV}{n} \quad (3.5)$$

### 3.1.3 Sistemi totalmente irreversibili

I sistemi irreversibili sono caratterizzati da un trasferimento degli elettroni molto più lento rispetto ai fenomeni diffusivi con ciclovoltammogrammi molto differenti rispetto a quelli presentati in precedenza. Le principali proprietà dei sistemi irreversibili sono le seguenti:

- il rapporto tra corrente di picco anodico e catodico non è unitario:

$$\frac{i_p^c}{i_p^a} \neq 1 \quad (3.6)$$

- il valore di corrente di picco  $i_p$  è espresso in forma analitica dalla seguente equazione:

$$i_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{\alpha \cdot D \cdot v} \quad (3.7)$$

con  $\alpha$  coefficiente di trasferimento dell'elettrodo.

La corrente prodotta risulta possedere in parte alcune delle caratteristiche evidenziate per i sistemi reversibili: infatti, risulta essere direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione (C) e alla radice quadrata dello *scan rate* (v). L'equazione mostra, però, anche alcune differenze come il coefficiente di proporzionalità, tale da rendere il picco di corrente circa il 10% superiore a quella reversibile e la dipendenza dal coefficiente di trasferimento  $\alpha$ .

- il potenziale di picco  $E_p$  dipende dallo *scan rate* e il loro legame è espresso dalla seguente relazione:

$$E_p = E^{0'} - \frac{R \cdot T}{\alpha \cdot F} \cdot \left[ 0.78 + \ln \left( \frac{\sqrt{D_0}}{k^0} \right) + \ln \left( \sqrt{\frac{\alpha \cdot F \cdot v}{R \cdot T}} \right) \right] \quad (3.8)$$

in cui  $E^{0'}$  è il potenziale standard della coppia redox,  $k^0$  la costante di velocità standard e  $D_0$  il coefficiente diffusivo della specie ossidata.

- la differenza tra il potenziale di picco  $E_p$  e quello di mezzo picco  $E_{\frac{p}{2}}$  per i sistemi irreversibili a 25 °C equivale a:

$$|E_p - E_{\frac{p}{2}}| = \frac{47.7mV}{\alpha}$$

### 3.1.4 Sistemi quasi reversibili

Esistono, infine, sistemi definiti quasi reversibili in quanto rappresentano una via di mezzo tra le due categorie di sistemi finora presentati, con proprietà e ciclovoltammogrammi intermedi. In questo tipo di sistema la corrente prodotta risulta esser controllata sia dalla componente di trasferimento di carica che di massa.

## 3.2 Amperometria e cronoamperometria

L'amperometria rappresenta uno dei metodi di analisi elettrochimica più semplici, sia dal punto di vista teorico che pratico. La tecnica consiste nella registrazione di una corrente in funzione del tempo, generata dall'applicazione di un potenziale a scalino all'elettrodo di lavoro. Generalmente il potenziale esterno è definito da una forma d'onda caratteristica  $E(t)$ , la quale esprime l'andamento della tensione applicata nel tempo. In base a  $E(t)$  è possibile distinguere tra due tecniche di indagine basate sullo stesso principio: la *cronoamperometria* e l'*amperometria*. Per descrivere queste due tecniche è opportuno prima definire la funzione d'onda della cronoamperometria, figura 3.4.



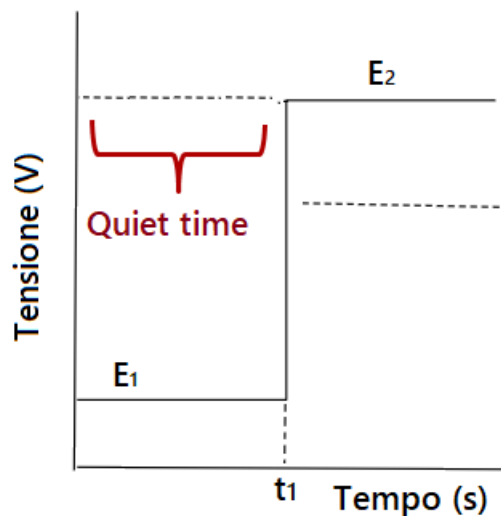


Figura 3.4: Esempio di potenziale applicato in amperometria

Come si può notare in figura esistono tre parametri caratterizzanti la funzione:

- $E_1$ : potenziale applicato all'inizio della misura;
- $E_2$ : potenziale a cui avviene la reazione d'interesse;
- $t_1$ : *quiet time*, che rappresenta l'intervallo temporale in cui è applicato il potenziale  $E_1$ .

L'amperometria è a tutti gli effetti un caso particolare della cronoamperometria, in quanto presenta la medesima forma d'onda caratterizzata da *quiet time* nullo. Le due tecniche sono basate sui medesimi concetti teorici. Considerando, ad esempio, un generico processo di riduzione e ipotizzando che in fase iniziale sia presente unicamente la specie ossidata, la reazione può essere rappresentata nel seguente modo:



Dove  $O$  è la specie ossidata,  $n$  il numero di elettroni coinvolti nella reazione e  $R$  la specie ridotta.

Prima di applicare il potenziale  $E_2$ , come sottolineato in precedenza, in soluzione vi è solo un lieve passaggio di corrente dovuto alla condizione ionica in soluzione. Successivamente, in seguito alla variazione di potenziale, la reazione di riduzione si attiva, convertendo la specie ossidata vicina alla superficie dell'elettrodo. Questo fenomeno genera un gradiente di concentrazione in funzione del tempo, e, quindi, comporta anche una densità di corrente variabile all'interno della soluzione. La corrente prodotta risulta proporzionale al gradiente di concentrazione alla superficie dell'elettrodo.

### 3.2.1 L'equazione di Cottrel

L'espressione analitica della corrente prodotta in soluzione con la tecnica amperometrica, o cronoamperometrica, è ricavata a partire dalla *seconda legge di Fick*, che descrive i fenomeni di diffusione molecolare tramite equazioni differenziali[25]:

$$D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (3.9)$$

dove  $D$  è la diffusività ( $\frac{L^2}{T}$ ),  $c$  la concentrazione della molecola,  $x$  la distanza dalla superficie dell'elettrodo e  $t$  il tempo.

Integrando questa legge, con le condizioni al contorno:

$$c(x, t) = \begin{cases} c(x, t) = C_{bulk} & t \leq t_1 \\ c(0, t) = 0 & t > t_1 \end{cases} \quad (3.10)$$

dove  $C_{bulk}$  è la concentrazione iniziale della soluzione, si ottiene l'*equazione di Cottrel* e quindi l'espressione della corrente in funzione della concentrazione del substrato, del tempo e della distanza dalla superficie dell'elettrodo.

$$i = \frac{A \cdot n \cdot F \cdot \sqrt{D} \cdot C_{bulk}}{\sqrt{\pi \cdot t}} \quad (3.11)$$

dove  $A$  è l'area esposta dell'elettrodo ( $cm^2$ ),  $F$  la costante di Faraday (96485.336  $\frac{C}{mol}$ ),  $n$  il numero di elettroni scambiati durante la reazione e  $D$  il coefficiente di diffusione dell'analita.

In figura 3.5 è riportato l'andamento caratteristico della corrente prodotta in soluzione nel tempo.

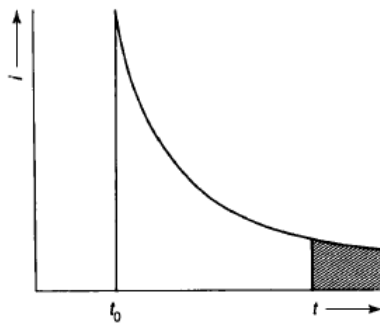


Figura 3.5: Andamento tipico della corrente registrata durante l'amperometria

## 3.3 Spettrofotometria UV-Visibile

La spettrofotometria UV-Visibile è una tecnica di misura di tipo ottico. Essa si basa sullo scambio selettivo di energia, sotto forma di radiazioni elettromagnetiche, tra

onda radiante e materia. In particolare, la spettrofotometria di assorbimento UV-Vis è incentrata sui fenomeni di interazione delle radiazioni luminose in una specifica regione dello spettro elettromagnetico:

- *campo ultra violetto (200-350 nm);*
- *campo del visibile (350-700 nm).*

L'assorbimento delle radiazioni luminose è in grado di produrre delle transazioni energetiche legate agli elettroni esterni delle molecole in base alla loro lunghezza d'onda. Ciascuna molecola ha quindi una propria firma ed assorbe le radiazioni in modo diverso alle varie lunghezze d'onda.

### 3.3.1 Applicazioni misure ottiche

La spettrofotometria trova grande impiego nei casi in cui è richiesta una determinazione quantitativa di sostanze organiche o inorganiche. Questa tecnica rappresenta il *gold standard* per la misura del lattato e dell'attività enzimatica dell'LDH, mediante la quantificazione specifica del cofattore NADH, coinvolto direttamente nella catalisi mediata dall'enzima. In campo farmaceutico, la spettrofotometria viene impiegata in diversi processi, per:

- determinare la solubilità dei farmaci;
- monitorare la cinetica di degradazione di un farmaco nell'organismo;
- quantificare la velocità di rilascio di un farmaco da una formulazione (test di dissoluzione);
- osservare il pKa dei farmaci<sup>1</sup>.

Inoltre trova numerose applicazioni anche nei campi ambientale e alimentare.

### 3.3.2 Strumentazione impiegata

Gli strumenti utilizzati per un'analisi spettrofotometrica UV-Vis sono essenzialmente due:

- *spettrofotometri;*
- *colorimetri.*

Essi si differenziano tra loro principalmente per l'ampiezza della banda passante del raggio incidente. Nello specifico gli strumenti colorimetrici hanno tipicamente una banda passante pari a 40 nm, molto superiore se confrontata con quella degli spettrofotometri, i quali possono arrivare ad avere bande perfino inferiori ai nm. Questa è una delle motivazioni per cui lo spettrofotometro viene preferito al colorimetro.

---

<sup>1</sup>Il pKa della molecola corrisponde al valore di pH a cui il farmaco si trova al 50% in forma dissociata ed in forma indissociata.

### 3.3.2.1 Struttura generale di uno spettrofotometro

Lo spettrofotometro è composto dalle seguenti componenti base disposte in serie tra loro, come raffigurato in figura 3.6:

- *sorgente di radiazione;*
- *monocromatore;*
- *cella;*
- *rilevatore;*
- *sistema di elaborazione e display.*

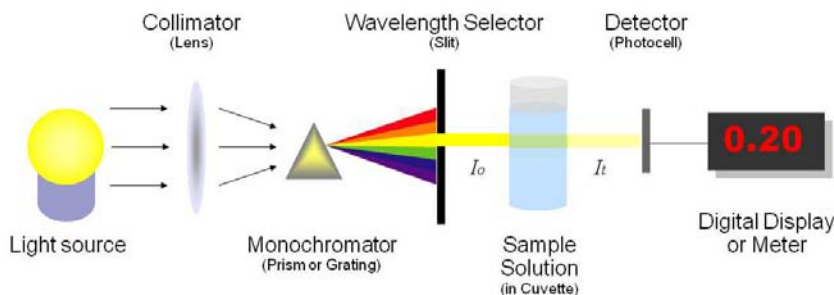


Figura 3.6: Elementi che compongono lo spettrofotometro

La *sorgente* è la parte dello strumento da cui ha origine la radiazione policromatica, che viene inviata al monocromatore. La radiazione contiene tutte le lunghezze d'onda del campo richiesto. A questo scopo sono necessarie due differenti sorgenti. La prima è una lampada ad incandescenza dedicata alla regione del visibile mentre la seconda a deuterio, specifica per la regione UV. A valle della sorgente è presente una fenditura con lo scopo di selezionare in un fascio i raggi emessi, riducendo così i fenomeni di diffusione.

Il *monocromatore*, o *collimatore*, è il sistema con cui lo spettrofotometro è in grado di selezionare dalla luce policromatica il fascio monocromatico, che verrà inviato al campione. Esistono due tipologie di monocromatori:

- i *filtri* (ottici o interferenziali), che bloccano parte della luce lasciando passare solo la parte selezionata;
- gli *elementi di dispersione* (prisma o *grating*), in grado di separare le varie componenti della radiazione in base all'angolo d'incidenza del fascio.

Una seconda fenditura fa sì che solo il fascio alla lunghezza d'onda desiderata raggiunga la cella.

La *cella* è di fatto la sezione che contiene il campione da esaminare, che generalmente si trova disciolto in soluzione e inserito in una *cuvetta* (di vetro, plastica o quarzo). Questi contenitori devono essere costituiti da un materiale trasparente alla radiazione a cui si vuole misurare ed avere una dimensione laterale ben definita, detta cammino ottico.

Il *rilevatore* è un trasduttore in grado di convertire l'intensità dell'energia della radiazione incidente in un segnale elettrico. Successivamente questa risposta viene inviata a un sistema di elaborazione per l'estrazione delle informazioni d'interesse e, infine, ad un display.

Il *rilevatore* definisce il livello di sensibilità e accuratezza dello strumento.

### 3.3.3 Metodi di analisi

Le determinazioni di tipo quantitativo sono basate sulla *legge di Lambert-Beer* (vedi paragrafo 3.3.3.1), che definisce il legame tra assorbimento prodotto dalla soluzione, ad una specifica lunghezza d'onda, e la sua concentrazione. Impostando, quindi, lo strumento in modo da registrare l'assorbanza prodotta ad una specifica lunghezza d'onda è possibile ricavare la concentrazione della soluzione. Per spiegare la *legge di Lambert-Beer* è necessario prima introdurre i concetti di *trasmissione* ( $T$ ) e *assorbanza* ( $A$ ).

Quando una soluzione a concentrazione incognita viene attraversata da una radiazione monocromatica di intensità  $I_0$ , il fascio uscente dalla *cuvetta* sarà caratterizzato da un'intensità  $I$ . La *trasmissione* rappresenta la frazione di luce trasmessa, rispetto a quella incidente.

La *trasmissione* rappresenta la frazione di luce trasmessa dal campione ( $I$ ), rispetto a quella incidente ( $I_0$ ).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.12)$$

La *trasmissione* può assumere solo valori compresi tra zero e uno. Viene definita trasmissione percentuale, %T, la quantità:

$$(3.13)$$

Mentre l'*assorbanza* ( $A$ ), rappresenta l'entità della radiazione assorbita ed è definita come:

$$A = \log \left( \frac{1}{T} \right) = \log \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

### 3.3.3.1 La legge di Lambert-Beer

La *legge di Lambert-Berr* mette in relazione la concentrazione del campione con l'assorbimento prodotto ed è espressa dalla seguente relazione:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3.14)$$

dove  $A$  è l'assorbanza registrata (Abs),  $\varepsilon$  il coefficiente di estinzione molare ( $\frac{Abs}{cm \cdot M}$ ),  $c$  la concentrazione ( $M$ ) e  $l$  il cammino ottico del fascio (cm).

Il coefficiente di estinzione molare indica il valore dell'assorbanza caratteristica della molecola per un cammino ottico di 1 cm e una concentrazione pari a 1  $M$ . I fattori che più influenzano il coefficiente di estinzione sono la lunghezza d'onda della radiazione assorbita, il pH e il solvente.

## 3.4 Spettroscopia elettrochimica di impedenza

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) è una tecnica di grande rilevanza, in quanto consente lo studio non distruttivo delle superfici elettrodiche. In campo biosensoristico permette di identificare i vari fenomeni elettrochimici che avvengono nel sistema in esame. Con questo tipo di analisi è, infatti, possibile investigare fenomeni come la formazione di legami chimici o cambiamenti delle proprietà o della morfologia della superficie. La tecnica, figura 3.7, è basata sul concetto di funzione di trasferimento e di impedenza. Nello specifico prevede l'applicazione di un segnale di *input* per perturbare il sistema analizzato, rispetto alla condizione di equilibrio. Il sistema produce quindi un segnale di risposta che viene registrato e analizzato. Il segnale applicato è di tipo sinusoidale e tipicamente viene considerata una variazione di tensione  $\delta V(\omega)$  alla tensione continua  $V_0$ , definendo quindi un segnale perturbante pari a:

$$V_{in} = V_0 + \delta V(\omega) \quad (3.15)$$

In risposta alla tensione  $V_{in}$  applicata si registra una corrente  $I_{out}$  che per  $\delta V$  piccola sarà ancora sinusoidale. Quest'assunzione, verificata dalla pratica, si basa sul fatto che se il segnale ha un'ampiezza ridotta il sistema è linearizzabile attorno al punto di lavoro ( $V_0, I_0$ ).

$$I = I_0 + \delta i(\omega) \quad (3.16)$$

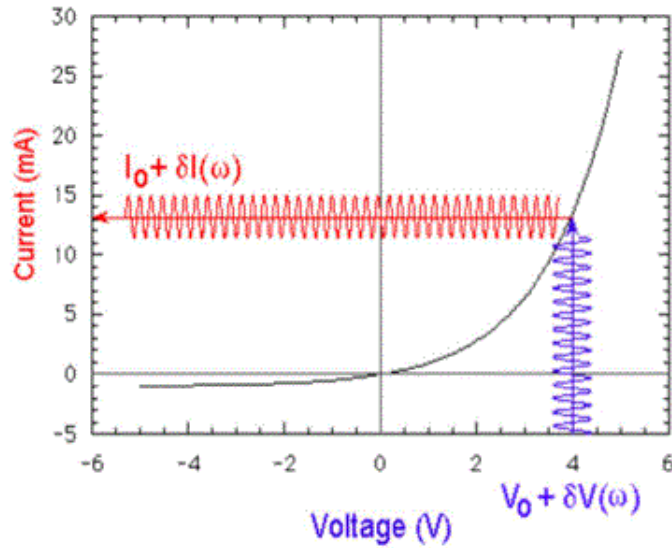


Figura 3.7: Rappresentazione segnale input/output caratteristica dell'EIS

La funzione di trasferimento in campo complesso è quindi definita come l'impedenza del sistema:

$$Z(\omega) = \frac{V_{in}(\omega)}{I_{out}(\omega)} \quad (3.17)$$

con  $\omega$  la frequenza a cui viene valutata l'impedenza ( $Z$ ) del sistema.

La funzione di trasferimento così ottenuta viene tipicamente rappresentata in due modi differenti: il *diagramma di Bode* e il *diagramma di Nyquist*.

Il *diagramma di Bode* è una rappresentazione della risposta in frequenza del sistema e consiste in due grafici che ne rappresentano l'ampiezza, o modulo, e la fase. La loro rappresentazione avviene in due distinti piani cartesiani, i quali hanno entrambi in ascissa, come variabile indipendente, la frequenza e in ordinata appunto il modulo dell'ampiezza usualmente espressa in *decibel* o la fase espressa in gradi.

Il *diagramma di Nyquist*, invece, è una rappresentazione grafica della funzione di trasferimento in coordinate polari, in cui ne sono considerate la parte immaginaria e quella reale, al variare della pulsazione o frequenza angolare  $\omega$ . Questo diagramma utilizza un solo piano di riferimento ed è uno dei metodi classici per valutare la stabilità di un sistema lineare.

### 3.4.1 Modelli interpretativi dell'EIS

Il vantaggio di questo tipo di analisi è la possibilità di separare i contributi dei singoli processi che avvengono all'interno del sistema. Tuttavia, queste informazioni non sono sempre direttamente utilizzabili e richiedono una fase di analisi che risulta esser uno degli aspetti più critici. Infatti, per associare ogni singolo effetto al relativo

contributo è necessario avere un modello elettrico del sistema. L'obiettivo dell'analisi è proprio quello di creare un modello in cui ogni elemento è in grado di descrivere un determinato processo fisico del sistema analizzato. Esistono due approcci di lavoro per l'identificazione del modello:

- identificazione teorica;
- identificazione sperimentale.

Nel primo caso, chiamato anche modellizzazione classica, la struttura del circuito elettrico è nota a priori, grazie ad alcune considerazioni fatte sui processi che avvengono all'interfaccia dell'elettrodo. Con l'approccio teorico, quindi, si identificano i parametri *fittando* i dati ottenuti. La modellizzazione classica è più semplice e computazionalmente meno complessa, in quanto si è già in possesso del modello del sistema. Questo aspetto, però, rappresenta anche il principale problema di questo metodo in quanto non sempre è possibile conoscere a priori il modello, come ad esempio durante l'indagine di un nuovo sistema. Il secondo approccio, invece, quello sperimentale, prevede una fase di modellizzazione strutturale. In particolare, si fa riferimento ad una costruzione utilizzando diversi elementi circuitali seguendo il comportamento del sistema studiato. In entrambi i tipi di analisi il modello equivalente, noto a priori o ricavato dai dati, esprime attraverso componenti elettriche, come ad esempio resistenze, capacità o induttanze, il circuito che meglio si appresta a rappresentare la risposta del sistema.

### 3.4.2 Modelli elettrici equivalenti

I modelli impiegati come circuiti equivalenti possiedono due caratteristiche principali:

- struttura;
- elementi.

Per quanto riguarda le strutture più diffuse per la definizione del modello ricordiamo la *struttura di Maxwell* e quella di *Voigt*.

La *struttura di Maxwell* è costituita essenzialmente da elementi disposti in parallelo e, di conseguenza, sono presenti un numero di correnti additive pari al numero dei differenti rami del modello.

La *struttura di Voigt*, al contrario, prevede elementi disposti in serie tra loro, in cui scorre la medesima corrente. Questo tipo di modello è adatto a descrivere sistemi in cui i fenomeni caratterizzanti iniziano nel medesimo istante, con velocità che dipendono dalle relative costanti temporali.

Gli elementi che possono essere utilizzati per comporre il modello, una volta nota la relativa funzione di trasferimento, trovano origine dal mondo elettronico. Ogni componente possiede un particolare comportamento in frequenza e questo può essere sfruttato per comporre numerosissimi modelli differenti tra loro. Gli elementi



principali impiegati sono sia i classici componenti circuitali dell'ingegneria elettronica come resistenza (R), capacità (C) e induttanza (L), ma anche elementi dipendenti dalla frequenza in grado di rappresentare aspetti elettrochimici, come l'elemento i Warburg (W) e l'elemento a fase costante (CPE). Di seguito viene riportata per ognuno di essi una breve descrizione:

- la resistenza (R) è caratterizzata da un'impedenza con parte immaginaria nulla e parte reale pari al proprio valore nominale:

$$Z_R(\omega) = R \quad (3.18)$$

La *resistenza*, o resistore, rappresenta fisicamente un elemento in grado di dissipare energia o creare cadute di potenziale. Generalmente è vista come una grandezza fisica scalare in grado di misurare la tendenza di un corpo ad opporsi al passaggio di corrente in presenza di una tensione elettrica. La resistenza espressa dipende da alcuni fattori, come ad esempio il materiale con cui è realizzato il resistore, le sue dimensioni e la temperatura. Il legame tra il valore di resistenza opposta da un corpo e la sua geometria è rappresentato dalla seguente relazione:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (3.19)$$

dove  $\rho$  è la resistività elettrica media tra i capi caratterizzanti il materiale impiegato, mentre i parametri  $l$  e  $A$  sono legati alla geometria del resistore, figura 3.8.

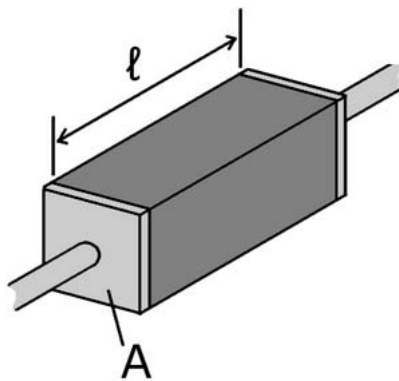


Figura 3.8: Parametri specifici della resistenza

In figura 3.9 è riportato il diagramma di Nyquist dell'elemento resistore.

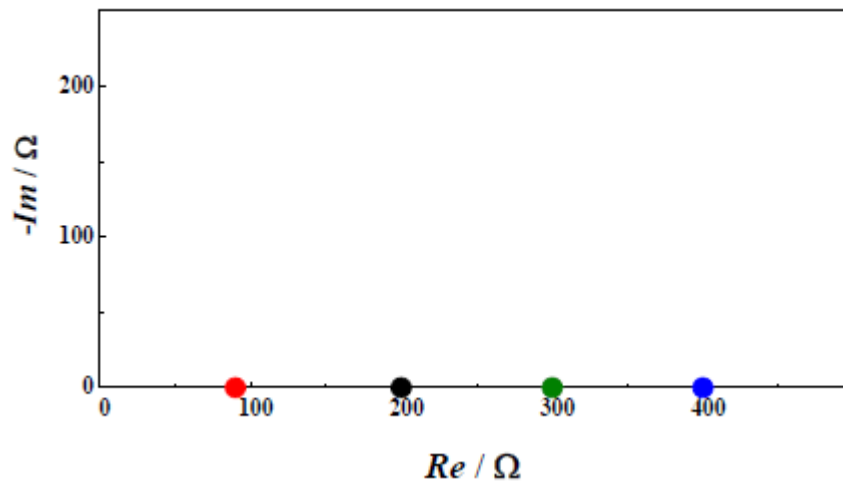


Figura 3.9: Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da una sola resistenza ( $R = 100\Omega, 200\Omega, 300\Omega, 400\Omega$ )

- la *capacità* (C) è caratterizzata da un'impedenza puramente immaginaria:

$$Z_C(j\omega) = \frac{1}{j\omega c} \quad (3.20)$$

La capacità è una grandezza fisica scalare che esprime l'attitudine di un conduttore isolato ad accumulare carica elettrica se soggetto ad una differenza di potenziale elettrico. L'elemento più rappresentativo della capacità è il condensatore, un dispositivo puramente capacitivo. In figura 3.10 è riportato il diagramma di Nyquist dell'elemento capacitivo.

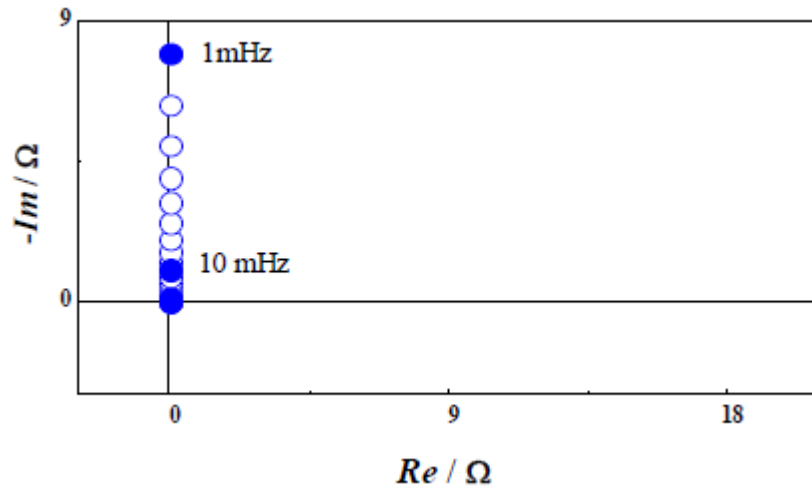


Figura 3.10: Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un condensatore nell'intervallo di frequenze  $10^{-3} - 10^3$  Hz ( $C = 1$  mF)

- l'induttanza (L) è caratterizzata da un'impedenza puramente immaginaria direttamente proporzionale alla frequenza ed al valore dell'induttanza:

$$Z_L(j\omega) = j\omega L \quad (3.21)$$

In figura 3.11 è riportato il diagramma di Nyquist dell'elemento induttore.

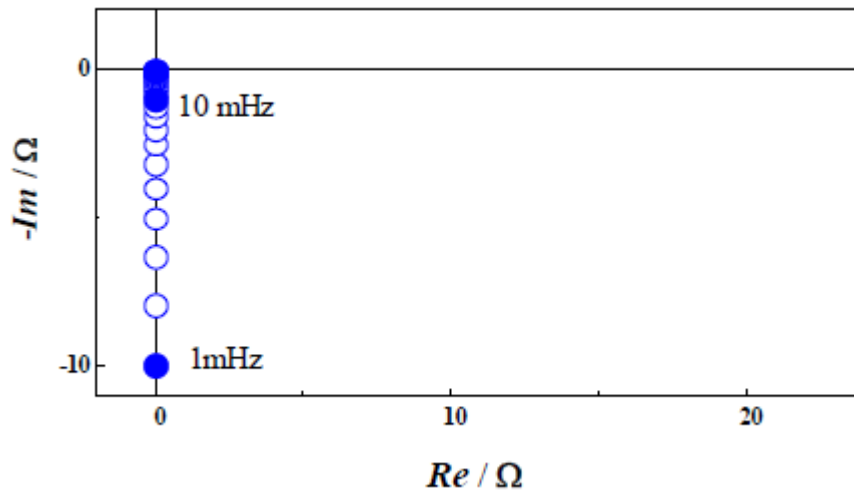


Figura 3.11: Simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un elemento induttore nell'intervallo di frequenze  $10^{-3} - 10^3$  Hz ( $L = 1$  mH)

- l'*elemento di Warburg* (W) viene utilizzato nella fase di modellizzazione per descrivere fenomeni diffusivi legati alle specie in soluzione. Questa componente è caratterizzata da una impedenza inversamente proporzionale alla frequenza. Infatti, a bassa frequenza, le particelle cariche in soluzione sono in grado di muoversi seguendo il campo elettrico, e rendendo la diffusione dominante rispetto l'impedenza complessiva. L'*elemento di Warburg* è caratterizzato da un'impedenza con parte reale e parte immaginaria uguali ma di segno opposto:

$$Z_W(j\omega) = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \cdot (1 - j) \quad (3.22)$$

dove  $\sigma$  ( $\frac{\Omega}{\sqrt{s}}$ ) è il coefficiente di Warburg così definito:

$$\sigma = \frac{R \cdot T}{n \cdot F \cdot A \cdot \sqrt{2}} \cdot \left( \frac{1}{C_0^* \cdot \sqrt{D_0}} + \frac{1}{C_R^* \cdot \sqrt{D_0}} \right) \quad (3.23)$$

dove  $D_0$  e  $D_R$  sono rispettivamente i coefficienti diffusivi della specie ossidante e riducente ( $\frac{cm^2}{s}$ ),  $C_0^*$  e  $C_R^*$  la concentrazione nel *bulk* della specie ossidante e riducente,  $T$  la temperatura (K),  $R$  la costante universale dei gas ( $\frac{J}{mol \cdot K}$ ),  $F$  la costante di Faraday ( $96485,336 \frac{C}{mol}$ ),  $A$  l'area dell'elettrodo ( $cm^2$ ) e  $n$  il numero di elettroni scambiati durante la reazione.

La relazione tra parte reale e immaginaria dell'*elemento di Warburg* comporta uno sfasamento di  $45^\circ$  costanti in frequenza, come riportato in figura 3.12.

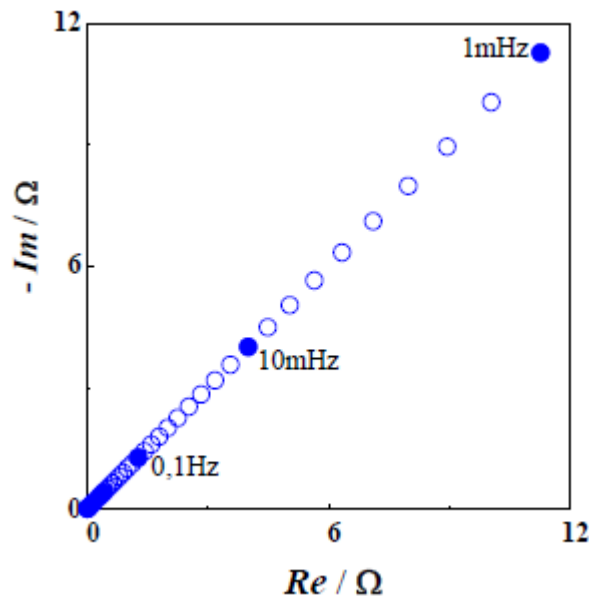


Figura 3.12: Simulazione del diagramma di Nyquist nel range di frequenze  $10^{-3} - 10^3$  Hz per l'elemento di Warburg ideale (grafico blu,  $= 400 \frac{\Omega}{\sqrt{s}}$ )

- l'elemento a fase costante (CPE) è utilizzato per descrivere sistemi capacitivi che presentano *leakage* di corrente. L'elemento a fase costante è caratterizzato dall'impedenza:

$$Z_{CPE}(j\omega) = \frac{1}{A \cdot (j\omega)^n} \quad (3.24)$$

Dove  $A$  è il fattore di proporzionalità, e  $n$  il parametro che definisce lo sfasamento ( $0 < n < 1$ ).

L'elemento a fase costante fisicamente rappresenta uno strato di separazione di carica, quindi modella un condensatore non ideale. Infatti, nel caso  $n$  sia uguale a 1 la CPE si comporta come una capacità ideale, mentre nel caso  $n$  sia uguale a 0 si ottiene una resistenza. In figura 3.13 è riportato il diagramma di Nyquist dell'elemento a fase costante, per alcuni valori di  $n$ .

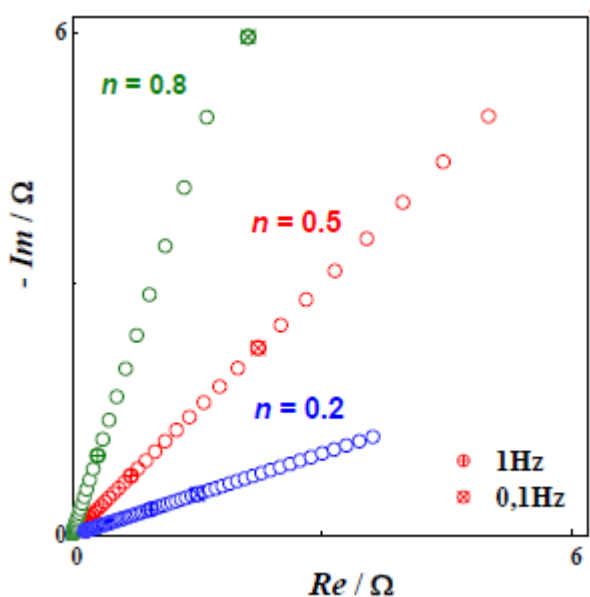


Figura 3.13: Diagramma di Nyquist nel range di frequenze  $10^{-3} - 10^3$  Hz per l'elemento a fase costante a differenti valori di  $n$

### 3.4.3 Modelli elettrici noti

La modellizzazione si pone come obiettivo quello di ottenere un circuito equivalente caratterizzato da diagrammi di Nyquist e di Bode il più simili possibile all'andamento dei dati sperimentali ottenuti tramite EIS. In questo modo, quindi, si semplifica la comprensione dei dati ottenuti per confronto con curve note[51]. Tra i principali modelli di sistemi elettrochimici presenti in letteratura tra i più rilevanti sono:

l'elettrodo a polarizzazione ideale, l'elettrodo a polarizzazione non ideale e la cella di Randles.

- il *modello elettrodo a polarizzazione ideale* è uno dei primi tentativi di rappresentazione dell'interfaccia soluzione-elettrodo. È forse il modello più semplice attuabile in quanto assume la completa assenza di processi *redox* sulla superficie dell'elettrodo. Il modello è caratterizzato da una *struttura Voigt*, poichè è composto unicamente da elementi disposti in serie:



Figura 3.14: Modello dell'elettrodo a polarizzazione ideale

Con questo modello l'interfaccia viene rappresentata come la serie tra una componente resistiva  $R_s$  legata alla soluzione elettrolitica e una capacitiva  $C_{dl}$  rappresentante il doppio strato. Calcolando l'impedenza complessiva del sistema si ottiene:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{1}{j\omega \cdot C_{dl}} \quad (3.25)$$

- il *modello elettrodo polarizzabile non ideale*, invece, assume l'esistenza di un processo di trasferimento di carica attraverso la superficie dell'elettrodo. Questo implica la definizione di un modello più complesso rispetto alla controparte ideale. In particolare, a partire dal circuito equivalente relativo alla situazione di idealità, viene inserito in parallelo alla capacità  $C_{dl}$  il contributo dell'impedenza faradica ( $R_t$ ). Il modello risultante è, quindi, il seguente:

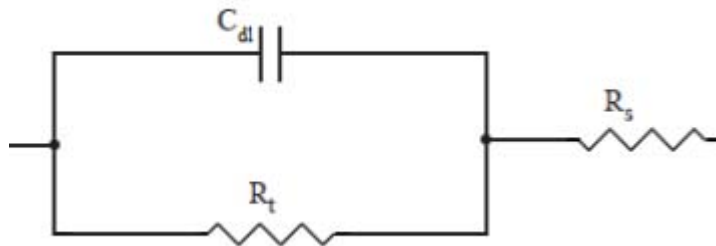


Figura 3.15: Modello dell'elettrodo a polarizzazione non ideale

L'impedenza totale del sistema risulta:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{R_t \cdot \frac{1}{j\omega \cdot C_{dl}}}{R_t + \frac{1}{j\omega \cdot C_{dl}}}$$

In figura 3.16 è riportato il diagramma di Nyquist del circuito descritto.

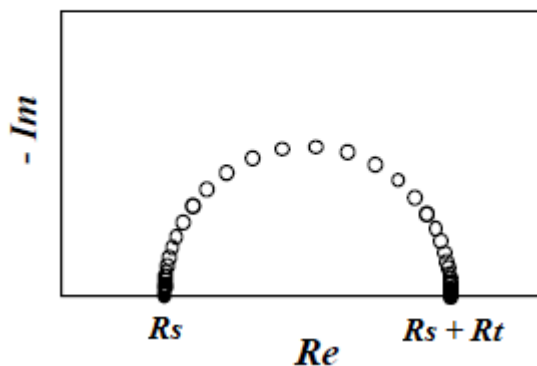


Figura 3.16: Diagramma di Nyquist ricavato dal modello elettrodo a polarizzazione non ideale

- la *cella di Randles* è il circuito più complesso tra quelli presentati, in quanto a partire dal modello di elettrodo polarizzabile non ideale, considera la presenza di una reazione elettrochimica limitata dalla diffusione alle basse frequenze. Dal punto di vista circuitale questo effetto viene rappresentato tramite l'inserimento di un *elemento di Warburg* in serie alla resistenza  $R_t$ . Ne consegue il modello finale riportato in figura 3.17:

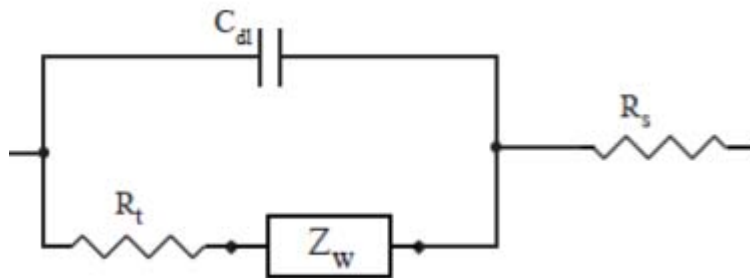


Figura 3.17: Circuitio elettrico della cella di Randles

Le componenti resistive presenti nell'interfaccia elettrodo-soluzione possono essere suddivise in due gruppi: la resistenza puramente *ohmica* della soluzione elettrolitica ( $R_s$ ) e quella *faradica* dovuta al trasferimento elettronico ( $R_{ct}$ ). La resistenza della soluzione è un parametro chiave nel modello, poiché la corrente prodotta e, quindi, registrata deve necessariamente attraversare tale soluzione elettrolitica, detta anche *bulk*. Ne consegue che il parametro  $R_s$  non viene alterato da fenomeni o trasformazioni chimiche che avvengono a livello superficiale sull'elettrodo. La resistenza  $R_{ct}$ , invece, dipende dalle caratteristiche dielettriche e isolanti dell'interfaccia e, perciò, viene influenzata dalle reazioni tra elettrolita ed elettrodo. Infatti, l'elettrodo inserito in una soluzione elettrolitica sviluppa uno strato isolante, che comporta un ritardo nella cinetica del trasferimento elettronico sulla superficie. In una situazione ideale questa resistenza è formata da due principali componenti: una parte costante dovuta alla natura del materiale dell'elettrodo stesso ( $R_{mat}$ ) e una parte variabile dovuta alle modifiche superficiali ( $R_{mod}$ ).

$$R_{ct} = R_{mat} + R_{mod} \quad (3.26)$$

Questa definizione è valida unicamente ipotizzando che lo strato isolante generato dai fenomeni superficiali sia distribuito omogeneamente e che ricopra la totalità della superficie dell'elettrodo.

L'utilizzo della componente capacitiva all'interno del modello dell'interfaccia elettrodo-soluzione è legata fondamentalmente al doppio strato elettronico formatosi in prossimità della superficie dell'elettrodo. Questo contributo viene rappresentato da un condensatore  $C_{dl}$ , il cui valore di capacità dipende dalla permittività elettrica dovuta dalle molecole costituenti il doppio strato carico. La permittività elettrica,  $\varepsilon_{dl} \left(\frac{F}{m}\right)$ , è una grandezza fisica che descrive il comportamento di un materiale dielettrico in presenza di un campo elettrico. In particolare, quantifica la tendenza del materiale a contrastare l'intensità di tale campo presente al suo interno. Analogamente a quanto visto per la resistenza, anche la componente  $C_{dl}$  può essere rappresentata come somma di due contributi separati:  $C_{mat}$  e  $C_{mod}$ . La componente  $C_{mat}$  è legata all'elettrodo non modificato, quindi mostra una dipendenza solamente dal potenziale applicato e dal materiale di cui è composto l'elettrodo. Mentre  $C_{mod}$  è una variabile dipendente dalle modifiche effettuate sulla superficie elettrodica, le quali tendono generalmente a far diminuire la capacità di doppio strato[20].

L'impedenza corrispondente a questo circuito è espressa dalla relazione:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{\frac{1}{j\omega \cdot C_{dl}} \cdot \left( R_t + \frac{\sigma \cdot (1-j)}{\sqrt{\omega}} \right)}{\frac{1}{j\omega \cdot C_{dl}} \cdot \left( R_t + \frac{\sigma \cdot (1-j)}{\sqrt{\omega}} \right)}$$



In figura 3.18 è riportato il diagramma di Nyquist del circuito relativo alla *cella di Randles*.

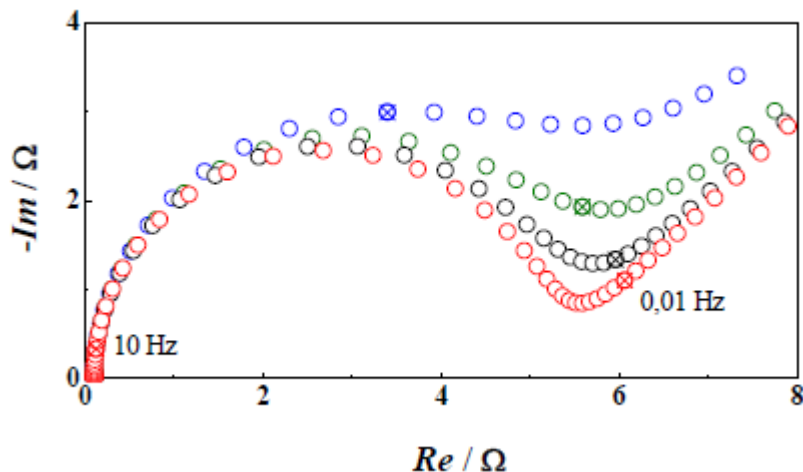


Figura 3.18: Simulazione del diagramma di Nyquist per il circuito in figura 5.9 nell'intervallo di frequenze  $10^{-3} - 10^3$  Hz a diversi valori di  $C_{dl}$ : 300  $\mu$ F (in rosso), 1 mF (in nero), 3 mF (in verde), 10 mF (in blu) con valori fissi degli altri componenti ( $R_s = 100\Omega$ ,  $R_{ct} = 5000\Omega$ ,  $\omega = 100\Omega$ )

### 3.5 Misurazioni SEM

Il microscopio elettronico a scansione, comunemente indicato con l'acronimo SEM sfrutta un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione[11]. Il fascio primario non è fisso, ma viene pilotato in sequenza, punto dopo punto, su una piccola zona rettangolare del campione. Nell'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione, vengono emesse numerose particelle, fra cui gli elettroni secondari. Questi elettroni sono catturati da un particolare rivelatore e convertiti in impulsi elettrici inviati in *real time* ad uno schermo. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo. Il potere di risoluzione di un normale microscopio elettronico SEM a catodo di tungsteno si aggira intorno ai 5 nm, ma alcuni modelli arrivano fino a 1 nm. Il campione è posto sotto alto vuoto ( $10^{-5}$  Torr) poiché l'aria impedirebbe la produzione del fascio (data la bassa energia degli elettroni), e deve essere conduttivo oppure metallizzato, per evitare cariche elettrostatiche in grado di disturbare la rivelazione degli elettrodi secondari. Un secondo tipo di segnale emesso dal campione in seguito all'eccitazione del fascio, sono gli elettroni retrodiffusi (elettroni *backscattered*). Questi vengono utilizzati per caratterizzare dal punto di vista chimico la superficie studiata. Infatti, questi elettroni sono particelle in grado di interagire con gli atomi che compongono

la superficie analizzata, e permettono quindi di definirne la composizione chimica. In figura 3.19 è riportata un'immagine del dispositivo SEM utilizzato.



Figura 3.19: Microscopio a scansione elettronico utilizzato per effettuare le misure SEM

In figura 3.20 è inoltre mostrata un'immagine del tamburo su cui sono stati caricati e fissati i dispositivi campione. In particolare è possibile apprezzare come quest'ultimi siano stati collegati a massa mediante del nastro conduttivo.



Figura 3.20: Immagine del tamburo su cui sono fissati i dispositivi campione ricoperti da del nastro conduttivo

Le immagine SEM sono infine state analizzate utilizzando il *software Gwyddion*, il quale ha permesso di visualizzarle nel dettaglio e di valutarne i principali parametri

morfologici, come ad esempio rugosità e area effettiva. In questo modo è stato quindi possibile ricavare importanti informazioni sulle modifiche superficiali introdotte dai pretrattamenti e, soprattutto, poter confrontare in modo analitico le tecniche.



# Capitolo 4

## Materiali e metodi

In questo capitolo sono descritti gli strumenti utilizzati per le analisi, i materiali biologici e chimici impiegati e gli esperimenti condotti per caratterizzare, investigare e valutare il biosensore per acido lattico oggetto di questa tesi.

### 4.1 Caratterizzazione svolte

L'obiettivo del lavoro proposto è stato quello di ottenere un dispositivo in grado di rilevare la presenza di acido lattico in campioni biologici. Per farlo ci si è basati sulla reazione enzimatica dell'*LDH*, la quale consente di convertire il lattato in soluzione in NADH con un rapporto costante pari 1:1. In questo modo, quindi, è possibile monitorare la presenza, o la formazione di nuovo analita, attraverso il cofattore NADH. Quest'ultimo è più facilmente rilevabile in soluzione sia con tecniche elettrochimiche che ottiche, le quali rappresentano la misura *gold standard* per l'acido lattico. In letteratura i sensori maggiormente utilizzati per questo tipo di misure appartengono al gruppo SPCE, ed è per questo motivo che si è deciso di utilizzare proprio i dispositivi SPCE DropSense. Con questi sensori le tecniche elettrochimiche maggiormente utilizzate per la rilevazione del NADH sono ciclovoltammetria e amperometria, perciò è stato svolto un *set* sperimentale apposito per individuare la miglior tecnica tra le due.

#### 4.1.1 Pretrattamenti elettrochimici

L'obiettivo del primo esperimento è stato quello di testare trattamenti superficiali atti a ottimizzare la rilevazione di NADH da parte dei dispositivi *Screen Printed Carbon Electrodes* tramite indagine voltammetrica. Il potenziamento nella rilevazione del NADH è riferito alla possibilità di amplificare la risposta in corrente correlata alla presenza del substrato e di ridurre il potenziale di ossido/riduzione. In questo modo, quindi, è possibile ridurre l'interferenza dovuta al potenziale applicato e aumentare la sensibilità della misura. I trattamenti elettrochimici individuati consistono nell'applicazione di un potenziale anodico (range compreso tra 1.2 e 1.3 V), in

presenza di varie soluzioni elettrolitiche (1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaOH), per periodi temporali differenti, compresi tra 20 secondi e 5 minuti. I dispositivi sono stati caratterizzati tramite misure di ciclovoltammetria e di spettroscopia elettrochimica di impedenza prima e dopo la fase di trattamento elettrochimico. Il riepilogo dei pretrattamenti elettrochimici considerati è riportato in tabella 4.1.

Protocollo	Tipo molecola	Concentrazione	$\Delta V$	Durata	Bibliografia
Protocollo - 1	NaHCO <sub>3</sub>	1 M in H <sub>2</sub> O	1,3 V	5 min.	Cui et al. (2001)[8]
Protocollo - 2	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 M in H <sub>2</sub> O	1,2 V	5 min.	Dock et al., (2003)[10]; Cui et al.(2001)[8]
Protocollo - 3	NaOH	0,5 M in H <sub>2</sub> O	1,2 V	20 sec.	Wei et al.(2007)[54]

Tabella 4.1: Protocolli elettrochimici testati

In questo esperimento sono stati utilizzati 12 dispositivi, suddivisi equamente in 4 gruppi:

- non trattati (gruppo di controllo);
- gruppo NaHCO<sub>3</sub>;
- gruppo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
- gruppo NaOH.

Il set sperimentale è composto da 7 caratterizzazioni elettrochimiche o EIS, con un ordine definito:

1. EIS in  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$
2. CV in  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$
3. Pretrattamento elettrochimico superficiale
4. EIS in  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$
5. CV in  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$
6. CV in *NADH* in *Tris - HCl*
7. CV in *Tris - HCl*

Inizialmente, quindi, si sono svolte analisi di spettroscopia elettrochimica di impedenza in una soluzione 1 mM  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ . La tensione AC utilizzata è 5 mV, in un intervallo di frequenze compreso fra 100 mHz e 100 kHz, misurando 5 punti per decade. Successivamente con la medesima soluzione sono state effettuate misure di ciclovoltammetria da -0.5 a 0.8 V con *scan rate* pari a  $100 \frac{mV}{s}$ , ed una sensibilità di  $10 \frac{\mu A}{V}$ . In seguito sono stati effettuati i pretrattamenti elettrochimici

precedentemente descritti e ripetute le misure EIS e CV utilizzando una soluzione 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  senza variare il *setup* sperimentale. Infine le prestazioni dei sensori sono state valutate tramite analisi ciclovoltammetrica utilizzando prima una soluzione 100 $\mu M$  NADH in Tris-HCl e successivamente solo Tris-HCl. Quest'ultime misure sono state effettuate con il medesimo *setup* sperimentale, applicando una tensione compresa fra -0.4 a 0.8 V con *scan rate* pari a 100  $\frac{mV}{s}$ , ed una sensibilità di 10  $\frac{\mu A}{V}$ .

### 4.1.2 Calibrazione NADH

Una volta individuato il trattamento più efficace per la rilevazione del NADH si è passati a studiare le *performances* di *detection* mediante CV e Amperometria i-t, ottenendo e confrontando le relative curve di calibrazione. Per ognuna di queste tecniche è stato utilizzato un *set* sperimentale differente: nelle misure di amperometria sono state scelte cinque soluzioni dell'analita a concentrazione nota: 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 1 mM e 10 mM, mentre per la ciclovoltammetria si è scelto di infittire il numero di campioni ottenendo nove concentrazioni: 1  $\mu M$ , 2  $\mu M$ , 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 1 mM e 10 mM. Tutte le soluzioni sono state realizzate in 50 mM Tris-HCl (pH=8.8), che è quindi stata impiegata come *baseline* nelle misure.

Il potenziale applicato durante la calibrazione amperometrica, pari a 600 mV, è stato scelto in seguito a uno studio specifico che ha confrontato le correnti prodotte da una soluzione 1 mM NADH in Tris-HCl a differenti potenziali (da -0.4 a 0.8 V). In questo studio sono stati utilizzati 100 $\mu l$  di soluzione, depositati sul dispositivo DropSense a cui è stata applicata una tensione appartenente all'intervallo precedentemente evidenziato per 300 secondi. Individuato il potenziale ottimo, si è quindi proceduto con la fase di calibrazione amperometrica, utilizzando le concentrazioni scelte e un tempo di misura pari a 300 secondi.

La calibrazione tramite ciclovoltammetria, invece, utilizza il medesimo volume di campione, ed è stata effettuata tra -0.4 e 0.8 V con *scan rate* pari a 100  $\frac{mV}{s}$ , ed una sensibilità di 10  $\frac{\mu A}{V}$ .

### 4.1.3 Calibrazione Lattato in matrice ideale

Successivamente si è deciso di valutare la capacità di rilevazione del lattato da parte del dispositivo utilizzato, così da poterne confrontare le *performances* rispetto la calibrazione del NADH. Questa procedura è stata realizzata utilizzando nove concentrazioni realizzate in *buffer* HBRS (pH=7.4): 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 200  $\mu M$ , 500  $\mu M$ , 1 mM, 2 mM, 5 mM e 10 mM. L'HBRS è stato impiegato anche come *baseline* delle misure. Per effettuare le misure è stato utilizzato un protocollo, che abbiamo chiamato *BioDevices* dal nome del laboratorio in cui è stata svolta la ricerca, che definisce ordine e modalità di realizzazione dei campioni da testare. In particolare, esso prevede l'aggiunta dei componenti della soluzione finale direttamente nella *cuvetta* di quarzo inserita all'interno dello spettrofotometro. Il protocollo è il seguente:

aggiunta di 1,6 mL di  $NAD^+$  in Tris-HCl (pH=8.8), inserimento di 0,2 mL di enzima LDH in PBS (pH=7.4) e, infine, introduzione di 0,2 mL di campione (soluzione lattato a concentrazione nota o HBRS nel caso del *blank*). La misura ottica di cinetica, con lunghezza d'onda specifica  $\lambda$  pari a 340 nm, ha inizio esattamente 20 secondi dopo l'aggiunta del campione e ha una durata di 5 minuti. L'intervallo temporale tra l'aggiunta del campione e l'avvio della misura ottica è necessario affinché l'operatore abbia modo di effettuare un accurato mescolamento della soluzione.

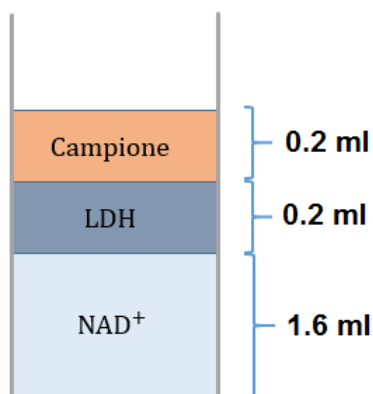


Figura 4.1: Rappresentazione grafica della soluzione utilizzata nel protocollo BioDevices

Al termine di ogni misura ottica, su aliquote di  $100\mu l$  della medesima soluzione, vengono effettuate le misure di ciclo voltammetria tra  $-0.4$  e  $0.8$  V con *scan rate* pari a  $100 \frac{mV}{s}$ , ed una sensibilità di  $10 \frac{\mu A}{V}$ .

#### 4.1.4 Confronto protocollo BioDevices e kit commerciale

Il quarto set sperimentale si è incentrato sull'analisi e valutazione del *kit* commerciale *L-Lactic Acid*. In particolare, è stato confrontato con il protocollo *BioDevices*. Le due tecniche sono state valutate sulla base della riproducibilità delle misure ottiche e sull'efficienza della catalisi enzimatica, di conseguenza sulla quantità di NADH prodotta in soluzione. Inoltre esse sono state confrontate anche dal punto di vista della rilevazione elettrochimica dell'analita, tramite ciclo voltammetria. I campioni utilizzati per il confronto sono stati:

- Milli-Q;
- HBRS;
- lattato ( $1 \mu M$ ,  $5 \mu M$ ,  $10 \mu M$ ,  $20 \mu M$ ,  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $500 \mu M$ ,  $1 mM$ , *Standard-1,6 mM*).



Il *kit Megazyme* prevede la formazione della soluzione da analizzare direttamente nella cuvetta inserita nello spettrofotometro. La realizzazione di quest'ultima prevede: aggiunta di 0.1 ml di Milli-Q, inserimento di 1.2 ml di campione e successivamente 0.5 ml di buffer, 0.1 ml di soluzione  $NAD^+ + PVP$  e infine, 0.02 ml di enzima D-Glutammato. A questo punto la soluzione così composta viene mescolata accuratamente e viene fatta iniziare la misura spettrofotometrica di cinetica, con  $\lambda$  pari a 340 nm e della durata totale di 14 minuti. Dopo i primi 3 minuti di misura ottica, viene registrato il valore di assorbanza  $A_1$ , e successivamente in soluzione è aggiunto l'ultimo composto per attivare la reazione, ovvero 0.02 ml di enzima LDH. La misura ottica della reazione prosegue per i successivi 10 minuti, al termine della quale viene registrato il valore di assorbanza finale ( $A_2$ ). I due valori spettrofotometrici registrati ( $A_1$  e  $A_2$ ) sono quindi utilizzati per la misura del delta di assorbanza su cui è basato il *kit Megazyme* ( $\Delta A = A_2 - A_1$ ).

Ogni esperimento ottico è stato seguito da una misura ciclovoltammetrica, utilizzando un volume di campione pari a  $100\mu l$ , tensioni comprese tra -0.4 e 0.8 V con *scan rate* pari a  $100 \frac{mV}{s}$ , ed una sensibilità di  $10 \frac{\mu A}{V}$ . È stato così possibile una calibrazione sia di natura ottica che elettrochimica del processo.

Infine, per testare la riproducibilità delle misure e quindi del *kit*, si è deciso di ripetere l'analisi ottica ed elettrochimica con il medesimo *setup* sperimentale, concentrandosi su un'unica soluzione, lattato  $100 \mu M$  in HBRS. Le misure sono state eseguite in 4 giorni differenti, in particolare dopo 0, 6, 7 e 14 giorni dall'apertura del *kit Megazyme*, in modo da poterne valutare la stabilità dell'efficienza nel tempo. Per ogni esperimento si è deciso di effettuare 6 ripetizioni di misure sul campione lattato  $100 \mu M$  in HBRS, precedute e seguite da una misura unicamente in HBRS, per valutarne la stabilità all'inizio e fine del lavoro.

#### 4.1.5 Rilevazione del lattato in matrice reale

Il protocollo *BioDevices* è stato validato in matrice reale, confrontando i risultati ottenuti con il *kit Megazyme*, attraverso misure di spettrofotometria e di ciclovoltammetria. I campioni testati sono costituiti da sudore prelevato in momenti diversi di un esercizio fisico a forza costante prolungato nel tempo, vedi paragrafo 4.3. I test con i due protocolli sono stati condotti su:

- Milli-Q;
- LA Megazyme standard (1.667 mM), vedi paragrafo 4.3;
- campioni di sudore prelevati a 10', 40' e 60' dall'inizio dell'attività fisica.

Gli esperimenti di spettrofotometria e ciclovoltammetria effettuati per analizzare i campioni fanno riferimento a quanto descritto nel paragrafo 4.1.4 e 4.1.3. Infine, va ricordato che per poter effettuare i test sui campioni di sudore descritti, è stato

	LA Megazyme standard	10'	40'	60'
Megazyme	1:32	1:800	1:800	1:800
BioDevices	1:10	1:100	1:100	1:100

Tabella 4.2: Diluizioni di LA Megazyme standard e dei campioni biologici in Milli-Q per effettuare le misure mediante kit Megazyme e protocollo BioDevices nei rispettivi range lineari.

necessario effettuare delle diluizioni in Milli-Q in modo che la concentrazione finale dei campioni rientrasse nel range lineare dei due metodi. Le diluizioni effettuate sulla soluzione LA Megazyme standard e sui 3 campioni di sudore (riportate in tabella 4.2) sono state definite sulla base di studi precedenti individuati in letteratura, in modo che risultassero a metà del range di *linearità*.

Le concentrazioni di lattato misurate sui campioni sono state poi confrontate con i valori di lattato ematico capillare misurati nel momento di prelievo dei campioni di sudore, con un sistema di misura elettrochimico commerciale (*Lactate Scout*, vedi paragrafo 4.2).

## 4.2 Strumentazione e dispositivi

Lo *Spectrometer Mapada PC1600* è stato utilizzato sia per le misure di assorbanza al variare della lunghezza d'onda (spettri) che per la misura nel tempo a lunghezza d'onda fissata (cinetiche). Lo strumento ha un *range* di misura tra 190 e 1100 nm e misura assorbanze comprese tra -0.1 e 3 Abs. Tutte le misure sono state eseguite utilizzando *cuvette* in quarzo con *pathlength* di 1 cm. I dati relativi all'analisi spettrale e della cinetica sono stati analizzati con *M. Wave Professional*.

Il potenziostato utilizzato nelle misure di ciclovoltammetria e amperometria è il *CH440A* della *CH Instrument Inc.* Le misure di ciclovoltammetria sono state effettuate da -0.4 a 0.8 V con uno scan rate di  $100 \frac{mV}{s}$  ed una sensibilità di  $10 \frac{\mu A}{V}$ . Le misure di amperometria sono state invece condotte fissando diversi potenziali ma utilizzando la stessa sensibilità. I dati ottenuti con il potenziostato sono stati analizzati con il software *CH440A*.

Le misure di impedenza sono state effettuate con un analizzatore d'impedenza *Solartron SI1260* della *Solartron Analytica* con una configurazione a due elettrodi (*working* e *reference*). La tensione AC utilizzata è 5 mVpp, in un range di frequenze da 100 mHz a 1 MHz, misurando 5 punti per decade. Il dispositivo è stato connesso allo strumento per mezzo di cavi BNC e dell'apposito adattatore DropSense. I dati sperimentali EIS sono stati analizzati mediante il *software* dedicato *Smart-VieW* e sono stati modellizzati con il programma *ZVieW*.

La rilevazione della concentrazione di acido lattico nel sangue capillare è stata effettuata con il dispositivo *Lactate Scout*. Lo strumento si basa su un processo di rilevazione enzimatica amperometrica, in grado di produrre la misura in 10 secondi.

La precisione dello strumento dichiarata è di  $\pm 3\%$  ad una temperatura compresa fra  $5-45^{\circ}\text{C}$ .

Il pH-metro impiegato per valutare l'acidità delle soluzioni nella fase preliminare degli esperimenti è il *Sension-pH3 con elettrodo 5010t* della *Vetrotecnica*. Lo strumento è costituito da un elettrodo a vetro collegato ad un dispositivo elettronico in grado di raccogliere il segnale da una sonda, ricavarne il valore del pH e, infine, mostrarlo su un *display*. Il dispositivo è in grado di misurare un pH compreso fra  $-2$  e  $+16$ , con una risoluzione di  $0.01$  pH; inoltre permette misure con una scala in temperatura tra  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $+150^{\circ}\text{C}$ .

I sensori impiegati per le analisi elettrochimiche sono i modelli *c110* e *110* della *DropSense*. Questi dispositivi appartengono alla categoria degli *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) e sono costituiti da tre elettrodi: *working* (W), *reference* (R) e *counter* (C). I due modelli di dispositivi utilizzati si differenziano principalmente per il posizionamento dei tre elettrodi all'interno del dispositivo, come mostrato in figura 4.2.

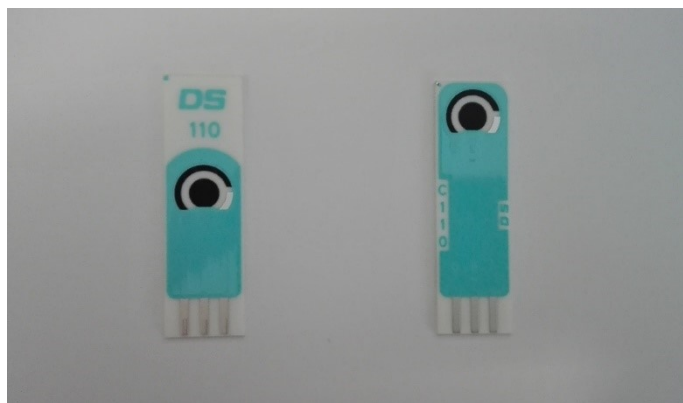


Figura 4.2: Confronto tra dispositivi DropSense 110 (sinistra) e c110 (destra)

Il *layout* specifico di questi dispositivi è riportato in figura 4.3.

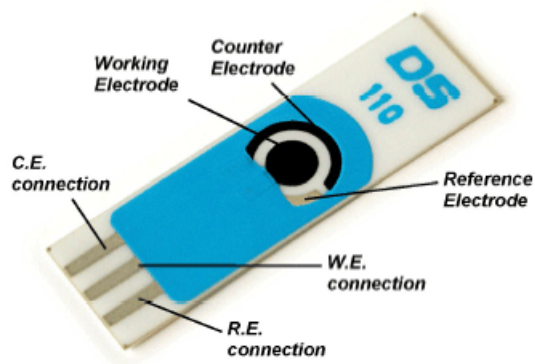


Figura 4.3: Descrizione dei principali componenti del dispositivo DropSense (modello 110)

Il dispositivo è costituito essenzialmente da quattro parti: il substrato ceramico, i contatti e il *reference*, gli elettrodi in carbonio e il *layer* isolante. La goccia di soluzione da analizzare dovrà esser posta a contatto con gli elettrodi, mentre la parte isolante circostante serve per confinarla all'interno della regione sensibile riducendo in questo modo l'interferenza prodotta. I materiali impiegati variano a seconda dell'elettrodo:

- *working*: inchiostro a base di carbonio;
- *reference*: inchiostro a base di argento;
- *counter*: inchiostro a base di carbonio.

In figura 4.4 è riportato un dettaglio al microscopio della regione del dispositivo contenente i 3 elettrodi.

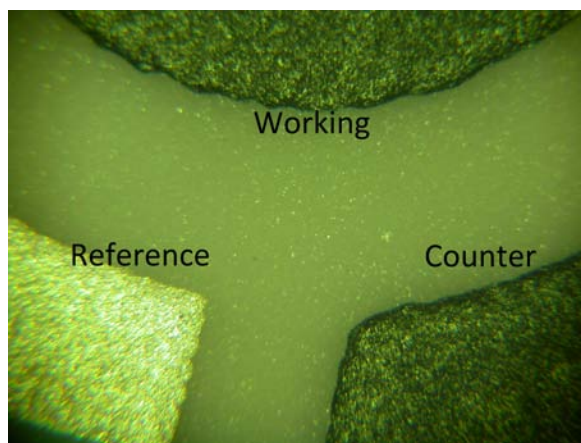


Figura 4.4: Immagine al microscopio della superficie degli elettrodi (ingrandimento 125x)

Mentre in figura 4.5 è riportata una porzione della superficie del *working* ottenuta tramite il SEM.

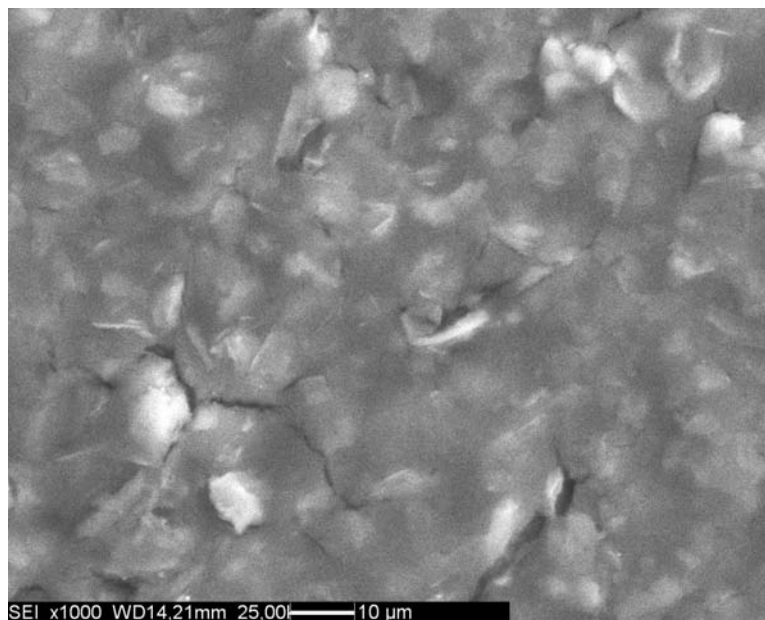


Figura 4.5: Immagine al SEM relativa una porzione della superficie del working

### 4.3 Reagenti e materiali biologici

I materiali e i reagenti chimici utilizzati negli esperimenti sono stati ottenuti tutti da *Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA)*:  $NAD^+$  ( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, cod. N7004),  $NADH$  ( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt hydrate, cod. N8129), lattato (L-(+) Lactic acid cod.L6402-1G), LDH (L-Lactic dehydrogenase from rabbit muscle, cod. L1254-5KU), ferrocianuro, ferricianuro, carbonato di Sodio ( $Na_2CO_3$ ), bicarbonato di Sodio ( $NaHCO_3$ ), idrossido di Sodio (NaOH), Tris-HCl (pH=8.8), HBRS <sup>1</sup>(pH=7.4). Tutte le soluzioni acquose sono state realizzate utilizzando i sopracitati reagenti disciolti in acqua ultra pura Milli-Q caratterizzata da una resistività pari a  $18.2 M\Omega cm$ . Inoltre va ricordato come la Milli-Q è stata impiegata anche per pulire sia dispositivi che la *cuvetta* in quarzo (insieme ad etanolo).

Il *kit* commerciale utilizzato per la rilevazione del lattato è stato acquistato presso la casa produttrice *Megazyme*. Esso è composto da quattro soluzioni necessarie per la realizzazione della misura, figura 4.6:

---

<sup>1</sup>L'HBRS è stato realizzato in laboratorio con la seguente composizione chimica: *Calcium Chloride Anhydrate* 2.65 mM, *Potassium Chloride* 4.96 mM, *Sodium Chloride* 155 mM, *Sodium Phosphate Monobasic* 2.3 mM, *D-Glucose* 9.99 mM e *Hepes* 10.35 mM

- soluzione 1: *Buffer*;
- soluzione 2:  $NAD^+ + PVP^2$ ;
- soluzione 3: *D-Glutamate*;
- soluzione 4: *LDH*.

Quindi risulta evidente come il *kit* utilizzi una doppia reazione per ottimizzare il processo andando a convertire il piruvato prodotto in soluzione. Questo è permesso grazie all'azione combinata dei due enzimi *LDH* e *D-Glutamate*, i quali definiscono la seguente reazione:

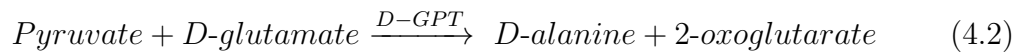
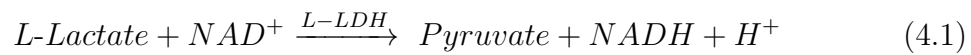
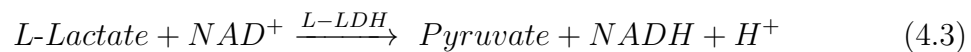


Figura 4.6: L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit

Questo prodotto commerciale per la rilevazione dell'acido lattico, infine, è stato confrontato con il protocollo sperimentale *BioDevices* che ha la medesima funzione. Quest'ultimo utilizza unicamente l'enzima *LDH*, lasciando quindi il piruvato libero in soluzione:



I campioni biologici utilizzati sono stati ottenuti da prelievi di sudore dal gomito di un atleta di sesso maschile (24 anni, 71 kg e 178 cm) praticante attività agonista di triathlon presso il Centro Universitario Sportivo di Padova (CUS)[55]. Il soggetto è stato sottoposto ad un test massimale al cicloergometro, misurando il *Peak Power Output (PPO)*, che definisce l'intensità dell'esercizio fisico. Successivamente il

<sup>2</sup>Polyvinylpyrrolidone, è un polimero solubile in acqua, ed è utilizzato per

soggetto è stato sottoposto ad un'ora di cicloergometro a sforzo costante (45 % del PPO). L'acquisizione dei campioni di sudore, 300  $\mu$ l ognuno, è stata eseguita mediante microcapillari *Reflotron* <sup>®</sup> *PST 32  $\mu$ l*, dal gomito dell'atleta in 3 momenti dall'inizio dell'esercizio. Allo stesso tempo sono state eseguite misure di concentrazione ematica di acido lattico mediante il dispositivo *Lactate Scout* su sangue capillare proveniente dal lobo destro dell'orecchio del soggetto. I campioni di sudore e le misure ematiche sono state effettuate dopo 10, 40 e 60 minuti dall'inizio dell'esercizio.





# Capitolo 5

## Risultati ottenuti

### 5.1 Pretrattamento elettrochimico

#### 5.1.1 Caratterizzazione preliminare dispositivi

I dispositivi *DropSense 110* sono stati caratterizzati mediante misure di spettroscopia elettrochimica di impedenza (EIS) e di Ciclovoltammetria (CV), utilizzando una soluzione 1 mM ferri/ferrocianuro in PBS. In figura 5.1 sono riportati i diagrammi di Bode dei 12 sensori analizzati in media e deviazione standard.

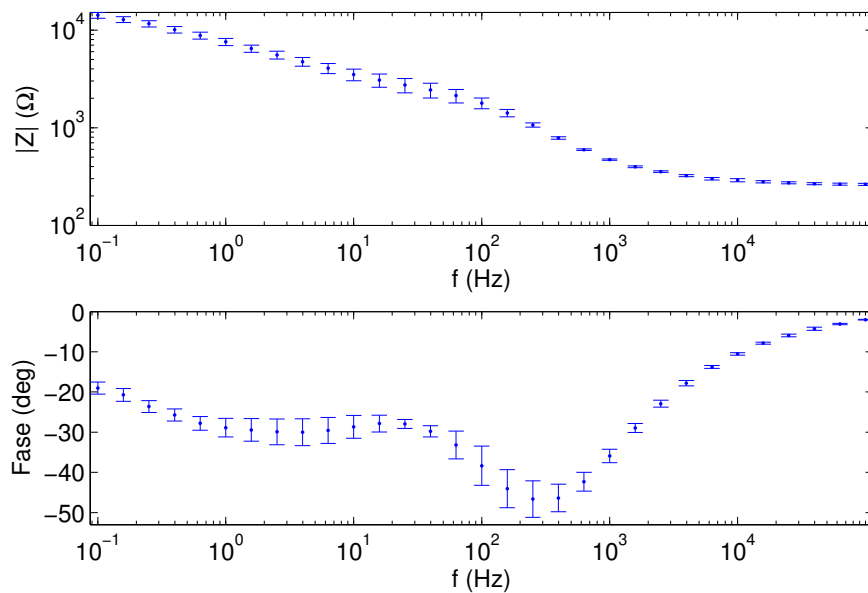


Figura 5.1: Diagramma di Bode delle misure EIS in ferri/ferrocianuro 1 mM in media e deviazione standard su 12 sensori

Dal diagramma di Bode si evince come i dispositivi siano caratterizzati da un comportamento elettrico differente a seconda della frequenza considerata. In particolare alle alte frequenze ( $10^4 - 10^5$  Hz) si può osservare un chiaro comportamento resistivo correlato alla conducibilità della soluzione. Questo fenomeno è ben rappresentato dal parametro  $R_s$  della *cella di Randles*. A frequenze inferiori, comprese fra  $10^2$  e  $10^4$  Hz, invece si può riconoscere una decrescita marcata della fase dell'impedenza, ed un incremento lineare del modulo. Ciò è compatibile con l'elemento a fase costante utilizzato nel modello di riferimento. Inoltre, sempre grazie a questo elemento circuitale, è possibile spiegare l'appiattimento della fase intorno ad un valore di  $-28^\circ$ , registrato tra 30 e 1 Hz. Infine, al di sotto di 1 Hz, si può osservare un'incremento nel valore della fase, la quale raggiunge un valore di  $-20^\circ$  alla più bassa frequenza considerata, 100 mHz. Nel medesimo intervallo in frequenza è possibile notare un appiattimento del valore del modulo ad un valore di  $10^4 \Omega$ . Il voltammogramma ottenuto è riportato in figura 5.2.

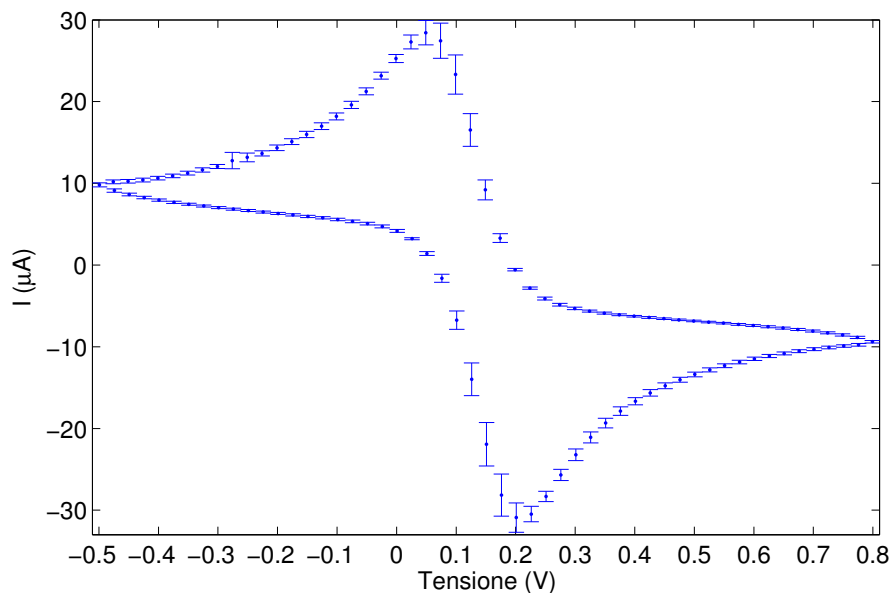


Figura 5.2: Ciclovoltammogramma relativo a misure in ferro/ferricianuro 1 mM in Tris-HCl con dispositivi *fresh*. Media e deviazione standard calcolate su 12 sensori

La risposta voltammetrica dei dispositivi in ferro/ferricianuro 1 mM presenta invece un comportamento quasi reversibile. Infatti dal grafico si può individuare il picco di corrente anodico a un potenziale di 201 mV e una corrente pari a  $-30,9 \mu\text{A}$ , ed il picco catodico a 49 mV con un'ampiezza di  $28,43 \mu\text{A}$ . La quasi reversibilità del sistema trova conferma nei dati mostrati in quanto: il rapporto in modulo tra le correnti di picco risulta esser pari 1.086 ( $\sim 1$ ), mentre la differenza tra i potenziali di ossidazione e riduzione è pari a 152 mV, di molto superiore rispetto la condizione di reversibilità di 59 mV.

### 5.1.2 Effetti dei pretrattamenti

Al termine della caratterizzazione preliminare di tutti i dispositivi (*fresh*), essi sono stati suddivisi in 4 gruppi di cui 3 sono stati trattati elettrochimicamente con i protocolli descritti nel paragrafo 4.1.1, mentre 1 è stato mantenuto come gruppo di controllo (non trattati). I risultati ottenuti sono rappresentati nei diagrammi di Bode in figura 5.3 in media e deviazione standard.

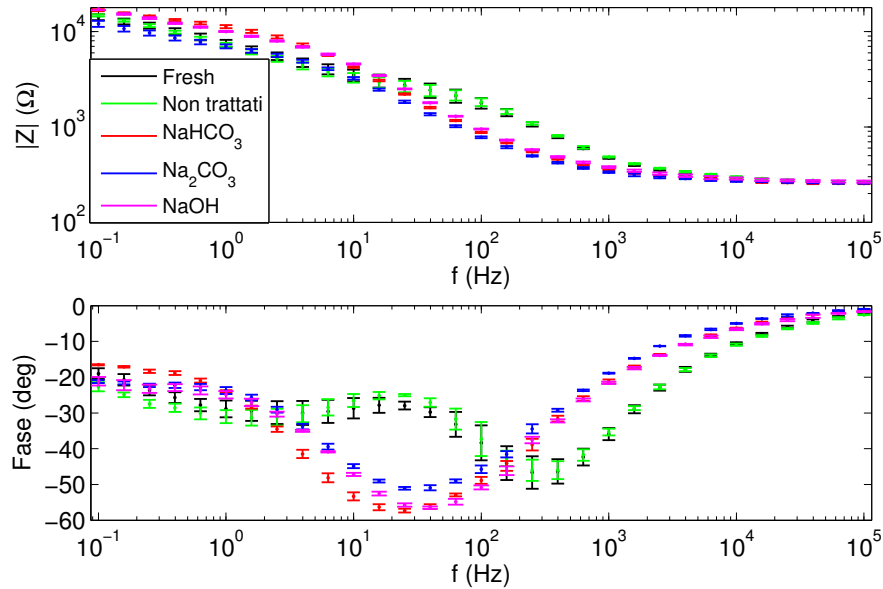


Figura 5.3: Diagrammi di Bode delle misure EIS in ferro/ferricianuro 1 mM in Tris-HCl sui dispositivi non trattati e trattati con  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$ . Le misure preliminari su tutti e 12 i dispositivi sono raggruppate nella curva «fresh».

Osservando i dati, come ci si aspettava, le curve *fresh* e non trattati risultano sovrapposte. Viceversa, tutti i trattamenti hanno notevolmente alterato lo spettro, introducendo uno *shift* del minimo della fase ed eliminando la porzione di spettro a fase costante in bassa frequenza. Inoltre, considerando l'ampiezza del picco di fase i gruppi  $NaHCO_3$  e  $NaOH$  presentano una netta diminuzione in modulo. Si osserva che il gruppo trattato con  $NaHCO_3$  è quello il cui spettro più si avvicina a quello di un sistema ideale con trasferimento di carica all'interfaccia.

Al contrario, i dati ottenuti dalle CV, rappresentati in figura 5.4, mostrano lievi variazioni, con un allargamento della differenza delle tensioni di picco per i gruppi  $NaHCO_3$  e  $NaOH$ , come evidenziato in tabella 5.1.

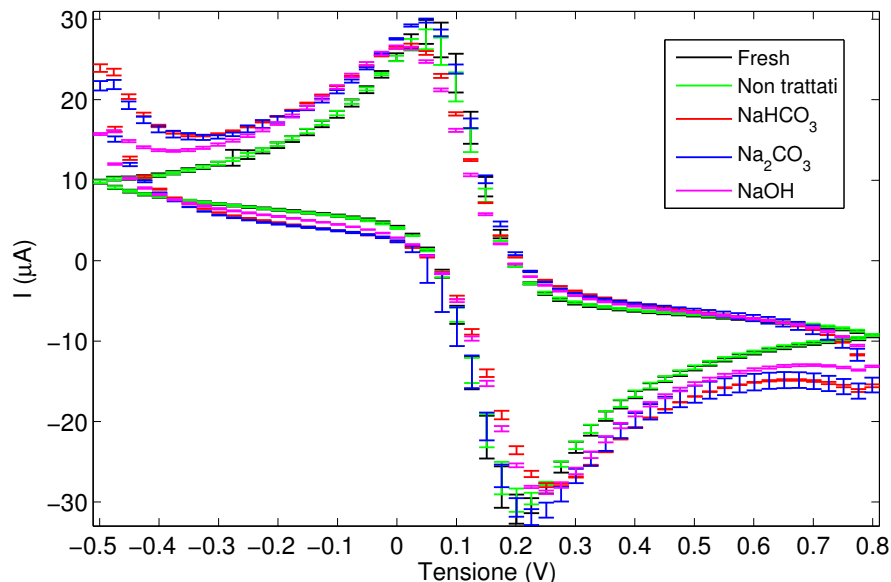


Figura 5.4: Ciclovoltammogramma relativo a misure in ferro/ferricianuro 1 mM su dispositivi non trattati e trattati con  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$

Un aspetto comune ai pretrattamenti elettrochimici, invece, è la diminuzione del rapporto tra picco di corrente anodico e catodico, che si ricorda esser condizione necessaria per una reazione *Nernstiana*. Tutti i trattamenti hanno anche prodotto degli effetti anomali agli estremi del voltammogramma che però non sono stati ulteriormente analizzati essendo al di fuori del *range* di tensione di interesse.

<b>Elettrodo</b>	$i_p^a/i_p^c$	$\sigma_i$	$E_p^a - E_p^c$	$\sigma_E$
Fresh	1,086	0,002	0,152	0,009
Non trattati	1,091	0,006	0,164	0,014
$NaHCO_3$	1,036	0,013	0,252	0,029
$Na_2CO_3$	1,045	0,055	0,177	0,024
$NaOH$	1,082	0,003	0,250	0,002

Tabella 5.1: Parametri elettrochimici ricavati dei voltammogrammi misurati

A conclusione di questa parte del lavoro è stata valutata la capacità dei dispositivi, trattati e non, di rilevare una concentrazione di NADH disciolto in Tris-HCl. Per farlo sono state effettuate due misure di ciclovoltammetria su ogni dispositivo: la prima in Tris-HCl, mentre la seconda in NADH  $100\mu M$ . In questo modo è stato possibile valutare l'efficacia dei trattamenti testati per la rilevazione del NADH. I risultati ottenuti sono riportati in figura 5.5.

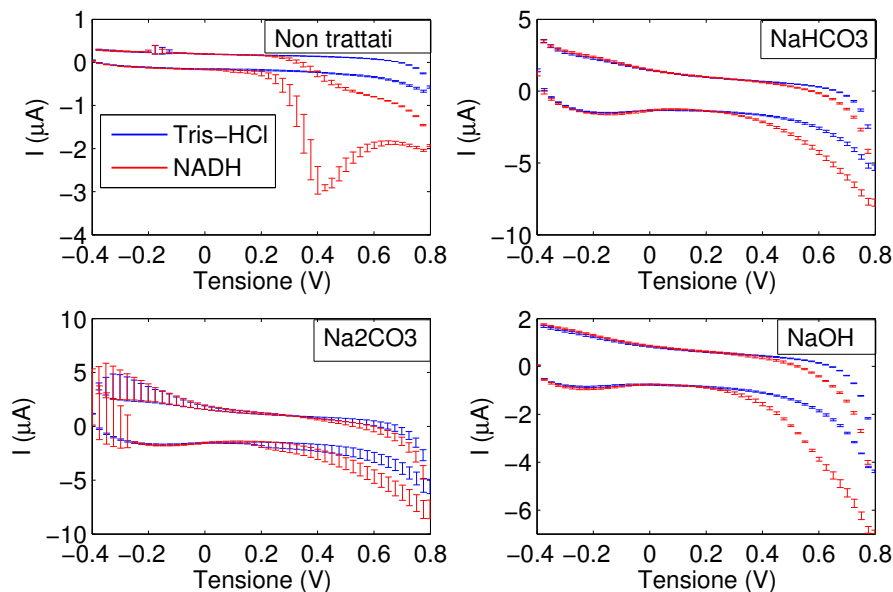


Figura 5.5: Ciclovoltammogrammi relativi a misure in NADH  $100 \mu\text{M}$  in Tris-HCl (rosso) e Tris-HCl (blu) utilizzando i gruppi di dispositivi non trattati,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{NaOH}$ . Media e deviazione standard calcolate su 3 sensori

È evidente come solamente il gruppo di sensori non trattati mostri un picco significativo di corrente a tensioni relativamente basse, distaccandosi nettamente dalla *baseline*. Questo significa che i pretrattamenti non sono stati in grado di migliorare la risposta del dispositivo alla presenza del NADH rispetto alla *baseline* in Tris-HCl. Infine, osservando l'andamento complessivo del voltammogramma dei gruppi trattati non è da escludere che ampliando il *range* dei potenziali considerati, quest'ultimi possano mostrare variazioni di correnti più significative rispetto al gruppo di riferimento. Questo, però, comporterebbe interferenze importanti testando il sistema in campioni reali come fluidi biologici.

### 5.1.3 Modellizzazione

Per completare la caratterizzazione dei dispositivi si è deciso di *fittare* i dati sperimentali EIS utilizzando come circuito elettrico equivalente la *cella di Randles*, vedi Sezione 3.4.3. In questo modo è possibile ricavare i valori sperimentali dei parametri circuitali definiti dalla *cella di Randles* ( $R_s, R_{ct}, CPE-T, CPE-P$ ), per i 4 gruppi di dispositivi. Il confronto dei valori ottenuti è riportato nelle figure 5.6-5.7-5.8 e 5.9, nelle quali sono anche mostrate le deviazioni standard calcolate sulle misure (*error-bar*) e le medie delle incertezze relative ai *fit* (*Err %*), fornite dal *software* utilizzato per le analisi *ZvieW*.

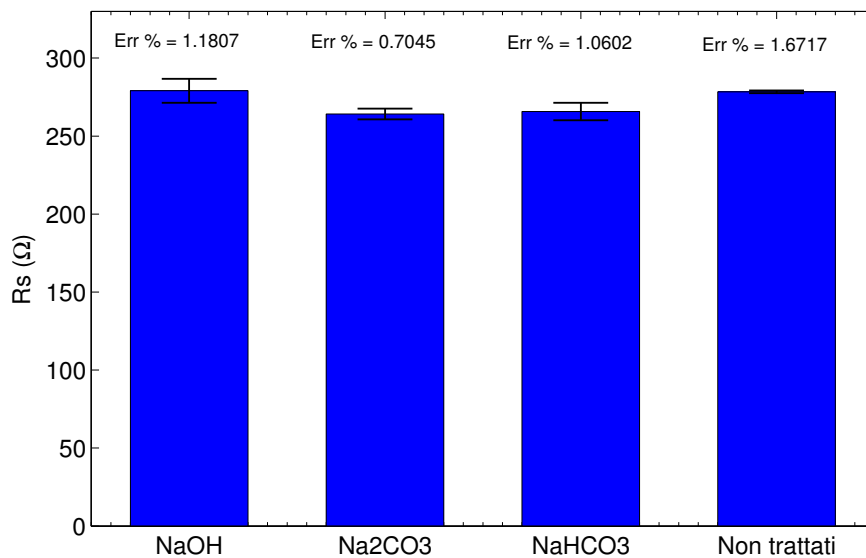


Figura 5.6: Confronto del parametro  $R_s$  nei gruppi di dispositivi non trattati,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$

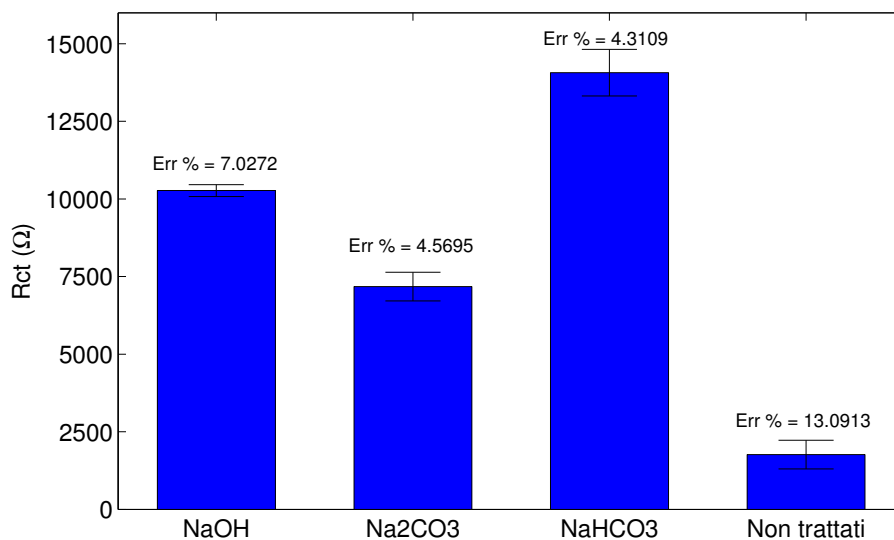


Figura 5.7: Confronto del parametro  $R_{ct}$  nei gruppi di dispositivi non trattati,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$

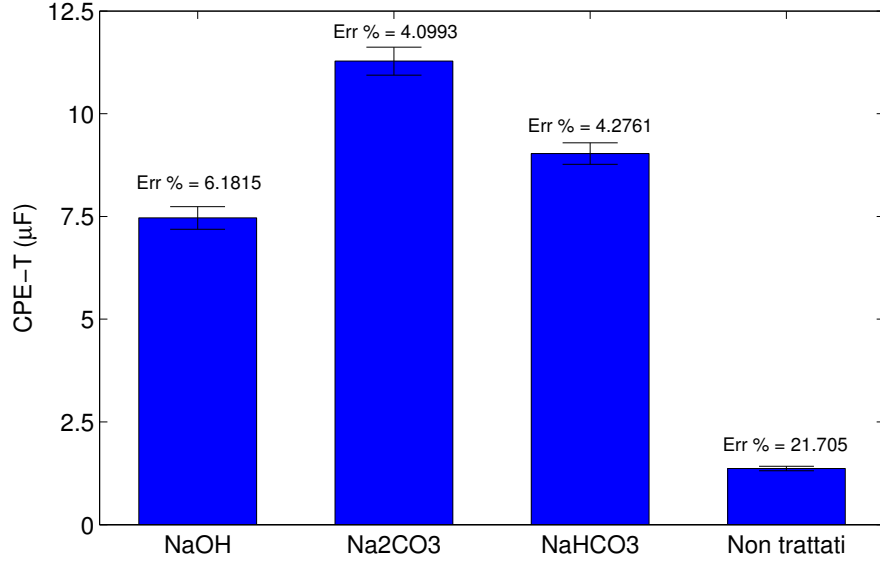


Figura 5.8: Confronto del parametro  $CPE-T$  nei gruppi di dispositivi non trattati,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$

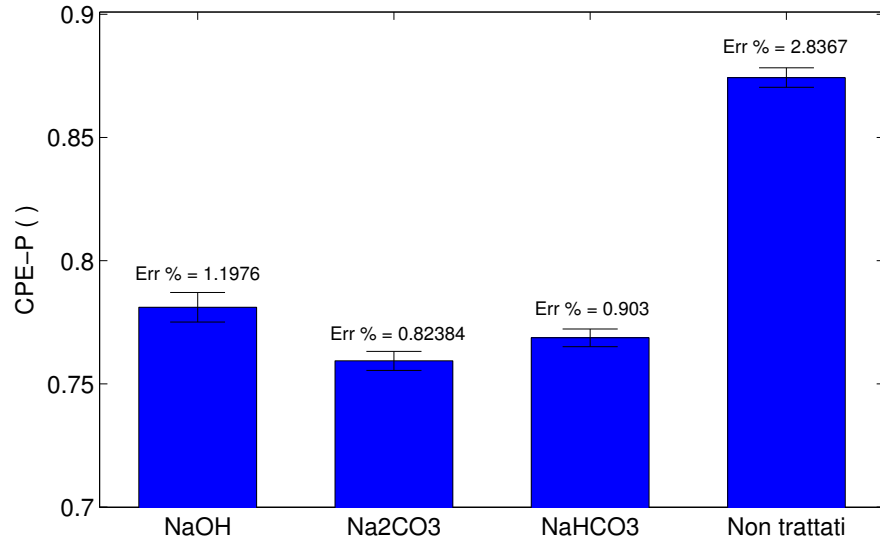


Figura 5.9: Confronto del parametro  $CPE-P$  nei gruppi di dispositivi non trattati,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NaOH$

Come mostrato in figura 5.8, è presente un netto incremento del parametro  $CPE-T$  e una decrescita di  $CPE-P$  in tutti i dispositivi trattati, di conseguenza i trattamenti hanno avuto il comune effetto di incrementare la capacità di *double layer* ( $C_d$ ).

Considerando, invece, la resistenza del trasferimento di carica  $R_{ct}$ , è evidente come i gruppi trattati mostrino un significativo incremento rispetto ai gruppi non trattati. Infine, prendendo in esame la resistenza della soluzione  $R_s$ , si può osservare come siano presenti unicamente piccole variazioni tra i 4 gruppi considerati. Questo andamento conferma l'affidabilità del modello utilizzato in quanto la soluzione utilizzata per i 4 gruppi è la medesima.

Infine, a conclusione della parte inerente la caratterizzazione superficiale dei dispositivi sono state effettuate delle misurazioni al microscopio a scansione elettronica della superficie del *working electrode*. In questo modo è stato possibile valutare gli effetti morfologici introdotti dai pretrattamenti elettrochimici, rispetto ai dispositivi non sottoposti ad alcuna procedura. In figura 5.10 è possibile osservare il confronto tra le immagini SEM dei 4 gruppi di dispositivi.

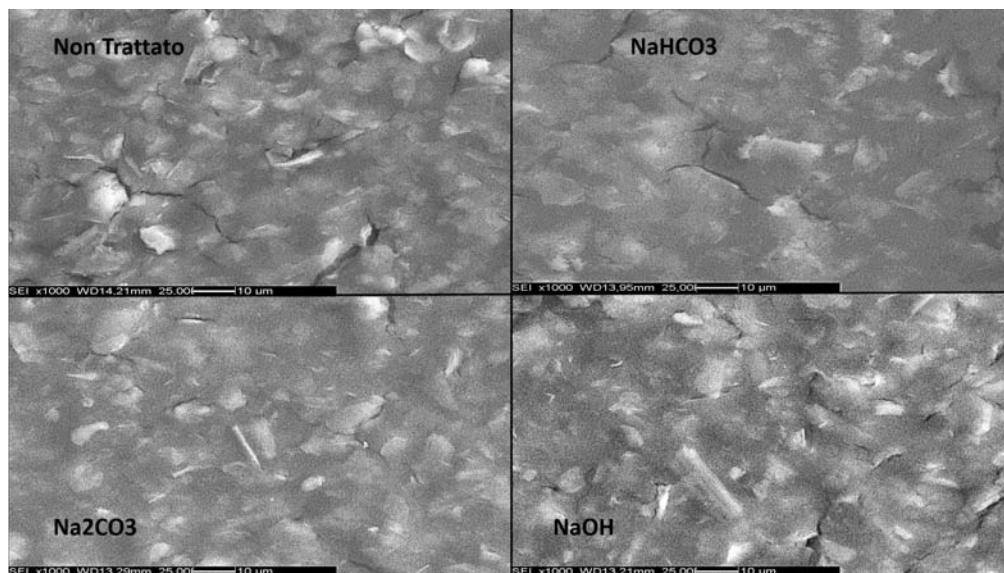


Figura 5.10: Confronto tra le immagini SEM ottenute dai 4 gruppi di dispositivi

Considerando come riferimento la foto del gruppo non trattato, si può notare come il trattamento con  $\text{NaHCO}_3$  abbia avuto un effetto *smoothing*, ovvero una sorta di appiattimento delle asperità presenti sulla superficie dei dispositivi di riferimento. Al contrario, il trattamento  $\text{NaOH}$  ha introdotto un effetto *sharpening* della superficie, che presenta molte più asperità. Infine, il trattamento che ha meno modificato la superficie dei dispositivi sembra essere quello con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , in quanto il confronto con il riferimento non mostra sostanziali differenze.

Dopo una prima analisi visiva, sono stati calcolati i principali parametri legati alla rugosità superficiale per quantificare le modifiche morfologiche dei dispositivi, mediante il software *Gwyddion*. In particolare nell'analisi ci si è incentrati su 3 parametri: la rugosità superficiale media ( $R_a$ ), la variazione di rugosità ( $R_{ms}$ ) e il confronto tra area effettiva e proiettata delle immagini e il loro rapporto. In figura 5.11-5.12 e 5.13 sono riportati i valori dei parametri definiti.



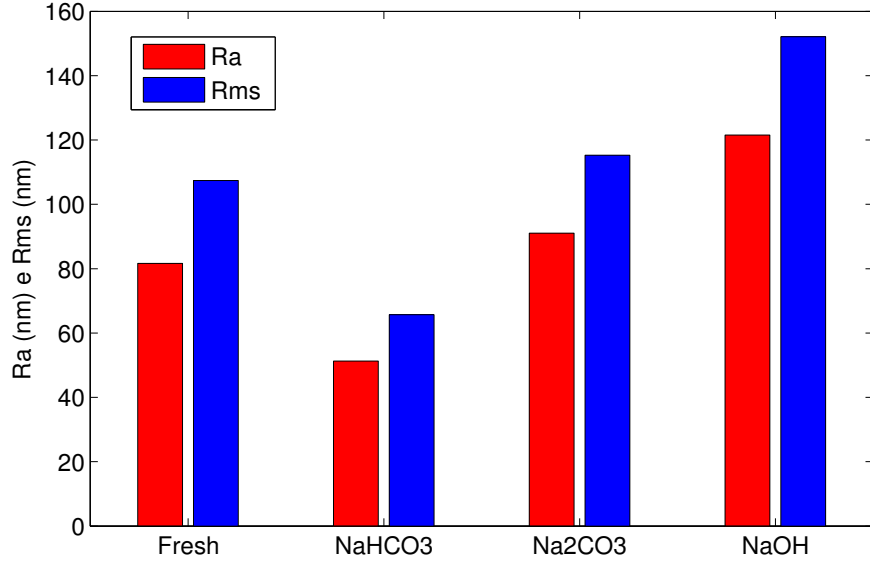


Figura 5.11: Confronto tra rugosità superficiale media e variabilità di rugosità dei 4 gruppi di dispositivi

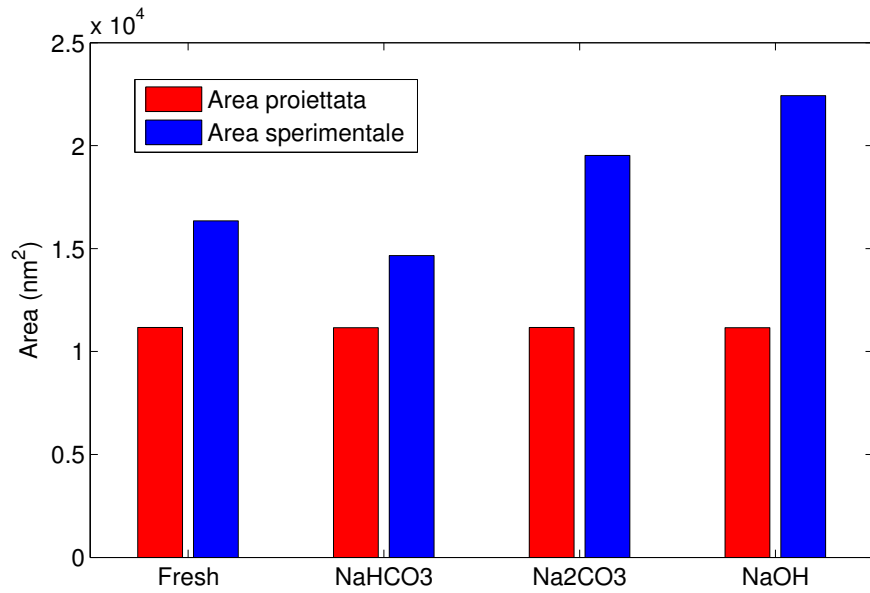


Figura 5.12: Confronto tra area sperimentale e proiettata dei 4 gruppi di dispositivi

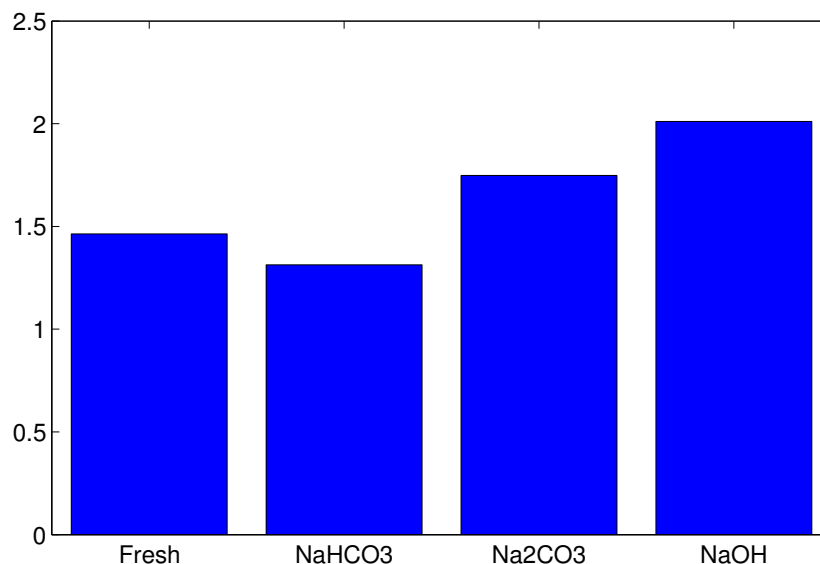


Figura 5.13: Rapporto tra area sperimentale e proiettata dei 4 gruppi di dispositivi

I grafici confermano le ipotesi dell'analisi visiva preliminare per tutti e 3 i processi elettrochimici. Infatti, il trattamento con NaOH è quello che maggiormente ha modificato la superficie dei dispositivi, i cui livelli di rugosità superficiale media, di variabilità di rugosità e il rapporto tra area effettiva e proiettata sono i più alti in assoluto. Anche i valori di  $R_a$  e  $R_{ms}$  ottenuti con il trattamento NaHCO<sub>3</sub> confermano l'effetto di *smoothing* della superficie. Infine, il trattamento con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, si conferma esser quello che presenta una variazione minima di rugosità rispetto al gruppo non trattato e di conseguenza anche una minima differenza in termini di area effettiva.

## 5.2 Calibrazione NADH

### 5.2.1 Ciclovoltammetria

La prima tecnica di indagine elettrochimica impiegata per la calibrazione del NADH è stata la ciclovoltammetria, i cui risultati sono riportati in figura 5.14.

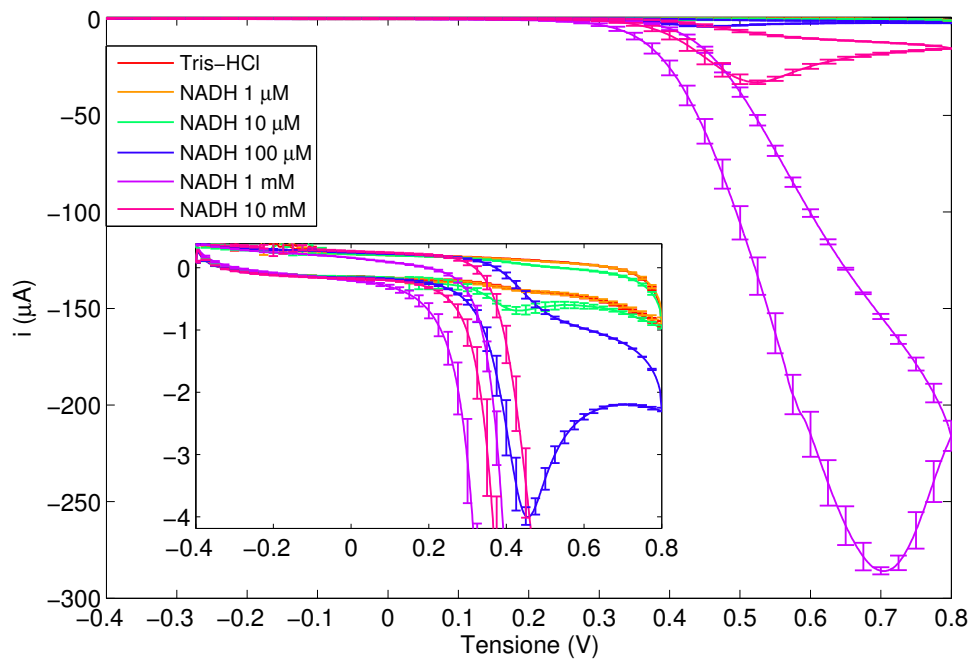


Figura 5.14: Ciclovoltammogramma relativo a misure in NADH in Tris-HCl a differenti concentrazioni ( $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $1 \text{ mM}$  e  $10 \text{ mM}$ ). Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi

Le correnti di picco registrate tendono a valori sempre più negativi all'aumentare della concentrazione di NADH, mentre per quanto riguarda la relativa tensione, si registra un aumento significativo unicamente nelle soluzioni  $1 \text{ mM}$  e  $10 \text{ mM}$ . Al fine di selezionare il parametro di riferimento ottimale per la rilevazione del NADH è stato effettuato uno studio della corrente registrata a tensioni comprese fra  $400 \text{ mV}$  e  $700 \text{ mV}$ . Da questa analisi è stato possibile identificare il potenziale che fornisce una curva di calibrazione con maggior sensibilità alle basse concentrazioni, che è risultato essere  $456 \text{ mV}$ . Il confronto delle correnti così ottenuto è riportato in figura 5.15.

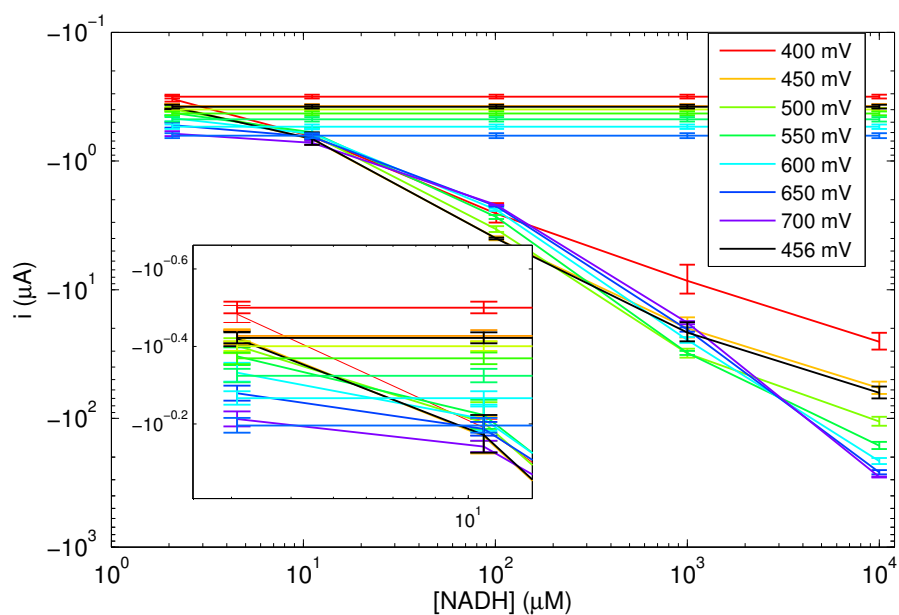


Figura 5.15: Studio delle correnti di picco registrate durante la ciclovoltammetria con NADH in Tris-HCl a potenziali compresi fra 400 mV e 700 mV

A seconda del potenziale considerato è possibile individuare due andamenti di correnti ben distinti: a basse concentrazioni (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) si ha un andamento quasi lineare delle correnti in scala logaritmica solamente a bassi valori di potenziali applicati. Con le soluzioni 1 mM e 10 mM, invece, la linearità è osservabile solo per le alte tensioni. Di conseguenza, essendo il *range* di concentrazioni di NADH d'interesse compreso fra 1  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ , si è deciso di selezionare come potenziale di riferimento 456 mV, ottenendo la curva di calibrazione rappresentata in figura 5.16.

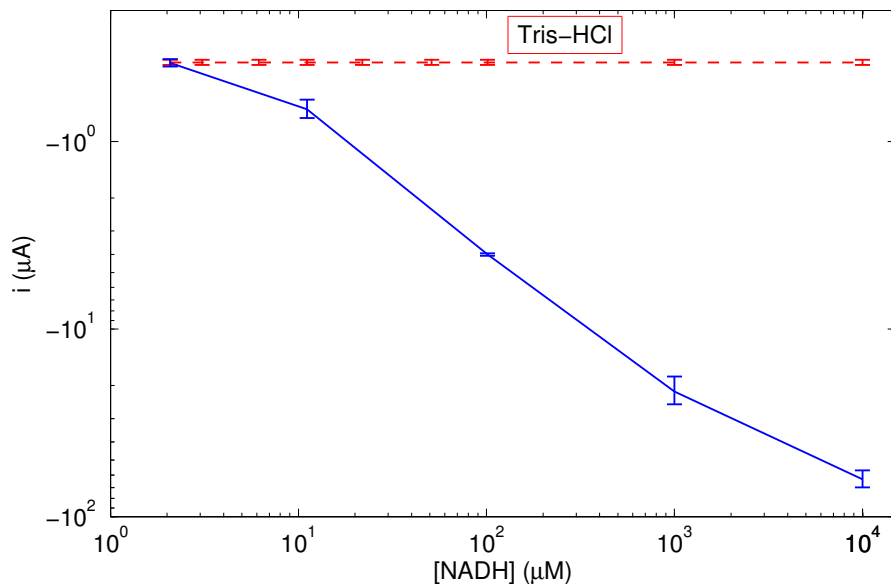


Figura 5.16: Curva di calibrazione del NADH ottenuta mediante ciclovoltammetria, considerando la corrente di ossidazione a 456 mV

Per una miglior comprensione dei dati, in tabella 5.2, sono riportati i valori delle correnti registrate.

Concentrazioni	$i$ ( $\mu\text{A}$ )	Range di variabilità $i$ ( $\mu\text{A}$ )
Tris-HCl	-0.378	[ -0.366 , -0.39 ]
1 $\mu\text{M}$	-0.381	[ -0.364 , -0.398 ]
10 $\mu\text{M}$	-0.674	[ -0.599 , -0.749 ]
100 $\mu\text{M}$	-4.003	[ -3.944 , -4.062 ]
1 mM	-21.554	[ -17.904 , -25.204 ]
10 mM	-63.272	[ -56.625 , -69.919 ]

Tabella 5.2: Valori delle correnti registrate a differenti concentrazioni di NADH

Come si può osservare, quindi, solamente la corrente prodotta dalla soluzione NADH 1  $\mu\text{M}$  risulta indistinguibile dalla *baseline* in Tris-HCl, di conseguenza la minima concentrazione testata rilevabile risulta esser pari a 10  $\mu\text{M}$ . Questa concentrazione corrisponde anche al limite di quantificazione, in quanto la corrente registrata a 10  $\mu\text{M}$  risulta esser nettamente separata da quella prodotta dal NADH 100  $\mu\text{M}$ .

## 5.2.2 Amperometria

La calibrazione del NADH è stata misurata anche mediante amperometria, con uno studio preliminare per individuare il potenziale ottimale da impostare. A tal proposito sono stati considerati due principali aspetti legati a questa scelta: la capacità

di produrre una corrente significativa in soluzione e la necessità di mantenere basso il potenziale per ridurre l'interferenza potenzialmente prodotta dagli analiti non di interesse tipicamente presenti nei campioni biologici. I risultati dello studio sono riportati in figura 5.17.

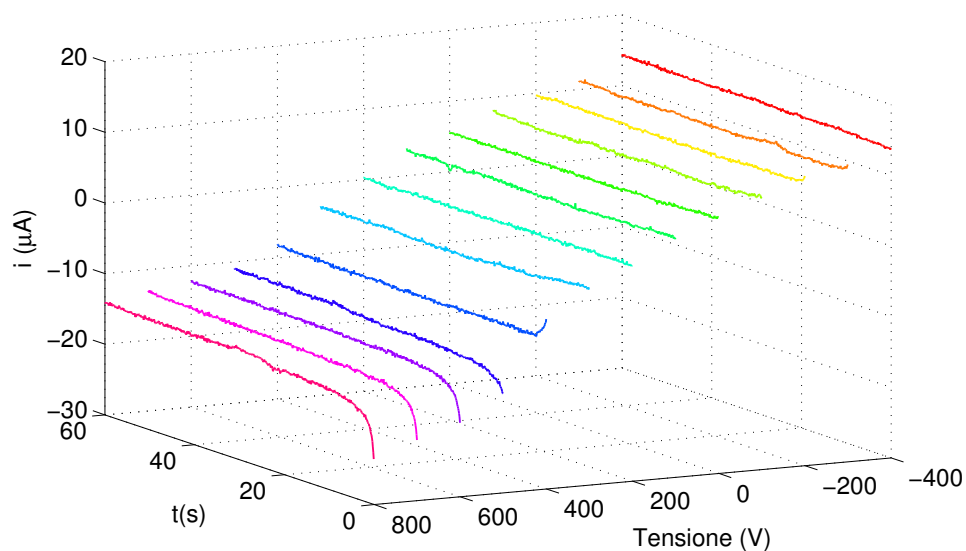


Figura 5.17: Studio delle correnti amperometriche prodotte in soluzione di NADH 1mM in Tris-HCl a potenziali compresi fra -400 mV e 800 mV

Il grafico mostra cinetiche di corrente simili per potenziali compresi tra 500 mV e 800 mV. La corrente registrata all'istante iniziale rappresenta il minimo assoluto all'interno del *range* di tensioni considerate. Successivamente è presente una fase di crescita, seguita da una stabilizzazione dopo circa 20 secondi, e questo valore rimane invariato per i successivi 280 secondi. Per potenziali inferiori a 500 mV, invece, non è stata osservata alcuna cinetica legata all'ossidazione del NADH ma solo valori costanti di correnti non proporzionali al potenziale applicato. Di conseguenza, questi potenziali sono stati esclusi dalla selezione. Si è deciso di utilizzare come potenziale di riferimento 600 mV, in quanto è la minima tensione in grado di fornire una cinetica di corrente significativa. Impostando il potenziale di misura, è stata svolta la calibrazione amperometrica del NADH utilizzando le stesse soluzioni testate con le ciclovoltammetrie. Un esempio delle correnti registrate è riportato in figura 5.18.

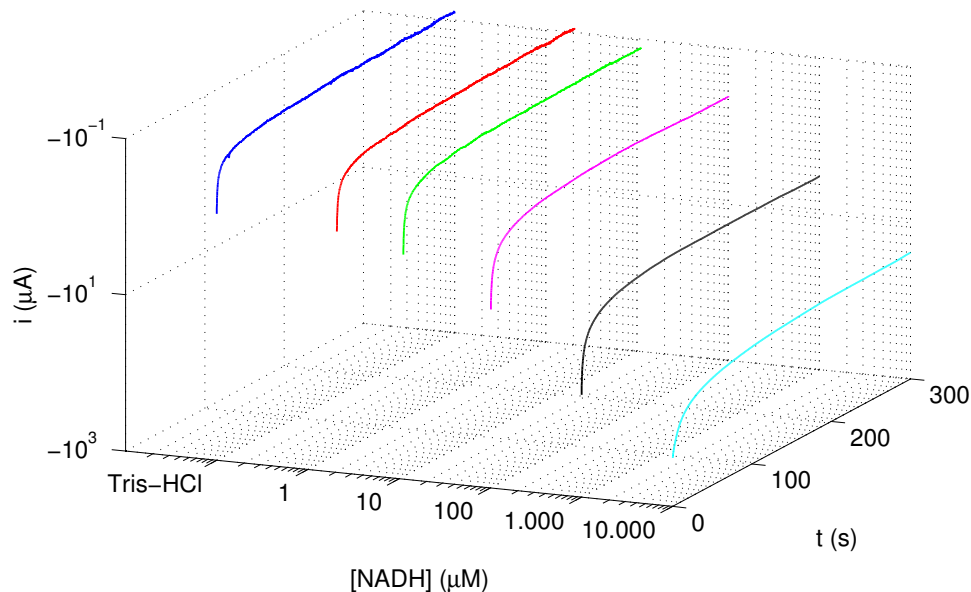


Figura 5.18: Corrente amperometrica a 600 mV misurata in NADH in Tris-HCl a differenti concentrazioni ( $0 \mu M$ ,  $1 \mu M$ ,  $10 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $1 mM$  e  $10 mM$ )

È evidente come al crescere della concentrazione di NADH in soluzione le correnti generate dalla sua ossidazione aumentino notevolmente in modulo. In tutte le curve mostrate si può notare una cinetica caratterizzante la fase iniziale del processo. La corrente tende, infatti, a stabilizzarsi ad un valore di saturazione dopo circa un minuto. Questo fenomeno è presente anche nella corrente prodotta dalla soluzione composta unicamente dal *buffer* Tris-HCl. Ciò indica che il potenziale utilizzato è in grado di generare reazioni interne anche in assenza di NADH. Osservando la cinetica definita dalla soluzione 10 mM, si può notare come presenti un andamento differente dalle concentrazioni minori. Questo aspetto è da attribuirsi al fatto che in presenza di un'alta concentrazione di analita, l'ossidazione del NADH sia più lenta. Per ottenere la curva di calibrazione amperometrica si è deciso di considerare e confrontare le correnti prodotte all'istante iniziale e finale (dopo 300 secondi), figura 5.19.

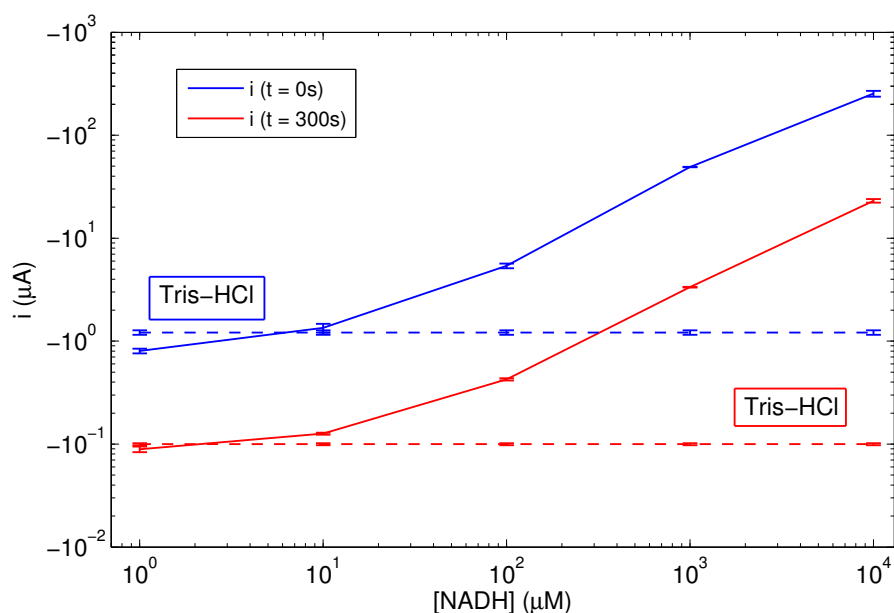


Figura 5.19: Curve di calibrazione del NADH in Tris-HCl all'istante iniziale e finale dell'amperometria

Il grafico mostra chiaramente come la corrente registrata al termine dell'analisi amperometrica sia un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella dell'istante iniziale, con un andamento identico. Per una miglior comprensione dei risultati, in tabella 5.3 sono riportati i valori di corrente registrati nei due istanti temporali considerati, in funzione della concentrazione di NADH.

Concentrazioni	i istante iniziale ( $\mu\text{A}$ )	i istante finale ( $\mu\text{A}$ )
<b>Tris-HCl</b>	-0.778 [ -0.655 , -0.901 ]	-0.083 [ -0.077 , -0.089 ]
<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	-0.802 [ -0.759 , -0.845 ]	-0.089 [ -0.083 , -0.095 ]
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	-1.343 [ -1.21 , -1.476 ]	-0.126 [ -0.123 , -0.129 ]
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	-5.383 [ -5.097 , -5.669 ]	-0.425 [ -0.415 , -0.435 ]
<b>1 mM</b>	-49.12 [ -48.848 , -49.392 ]	-3.345 [ -3.324 , -3.366 ]
<b>10 mM</b>	-253.663 [ -236.967 , -270.359 ]	-23.07 [ -22.108 , -24.032 ]

Tabella 5.3: Valori delle correnti registrate a differenti concentrazioni di NADH relative all'istante iniziale e finale dell'amperometria

Dal confronto tra le curve di calibrazione ottenute con i due metodi elettrochimici, si è deciso di considerare come tecnica di riferimento per la rilevazione del NADH la ciclovoltammetria. Questo perchè la sensibilità alle basse concentrazioni è maggiore ed il comportamento è più lineare. Individuata la tecnica di calibrazione, si è deciso di ripetere la calibrazione nel medesimo *range* di concentrazioni di NADH, ma infittendo



il numero di campioni nell'intervallo 1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ . In questo modo è stato possibile ottenere una retta di calibrazione più accurata rispetto alla precedente, figura 5.20.

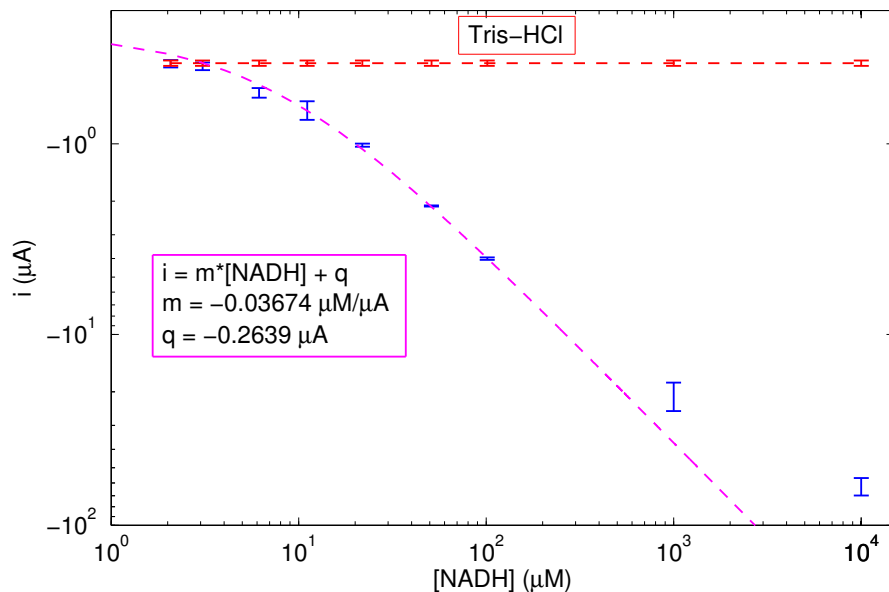


Figura 5.20: Curva di calibrazione del NADH in Tris-HCl in ciclovoltammetria, e fit lineare delle concentrazioni tra 5  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$

Dal grafico emerge come la minima concentrazione di NADH rilevabile sia di 5  $\mu\text{M}$ , e che il *range* di linearità è compreso fra 5  $\mu\text{M}$  e 1  $\text{mM}$ , con una sensibilità pari a  $-36.7 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$ .

## 5.3 Calibrazione Lattato

La calibrazione del lattato è stata suddivisa in due *step* principali: la prima fase ha previsto una misurazione ottica di cinetica ( $\lambda$  fissa a 340 nm), mentre successivamente ci si è incentrati sulla caratterizzazione elettrochimica attraverso la tecnica di ciclovoltammetria.

### 5.3.1 Spettrofotometria UV-Vis

Le cinetiche di assorbanza a 340 nm sono mostrate in figura 5.21. Le misure sono iniziate 20 secondi dopo il mescolamento delle componenti della reazione di catalisi, quindi per le soluzioni a maggior concentrazione (10 mM, 5 mM e 2 mM) sono stati calcolati anche i *fit* relativi ai primi 20 secondi, tabella 5.5. Per la realizzazione del *fit* è stata considerata l'equazione:

$$A = \frac{(a \cdot t)}{(b + t)}$$

dove  $A$  è l'assorbanza (Abs),  $t$  il tempo (s),  $a$  il parametro legato all'assorbanza asintotica (Abs) e  $b$  è il parametro costante dell'equazione. Non sono stati calcolati i *fit* per le altre cinetiche perchè dopo i 20 secondi presentano un andamento poco marcato.

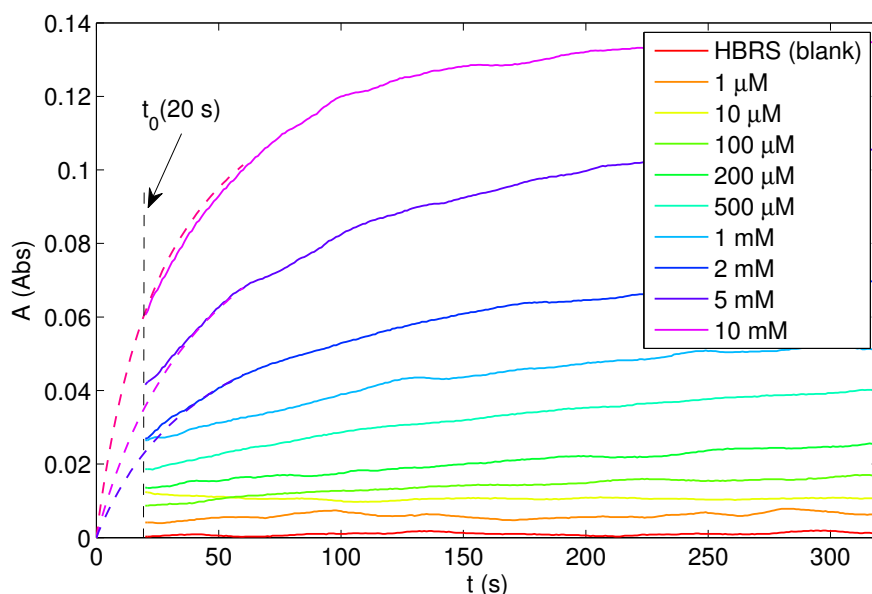


Figura 5.21: Cinetiche di catalisi del lattato in HBRS ottenute ad una lunghezza d'onda  $\lambda$  pari a 340 nm. La baseline delle misure è misurata aggiungendo HBRS al posto del campione.

[Lattato]	a	b	R-square
2 mM	0.08	48.77	0.996
5 mM	0.12	49.48	0.996
10 mM	0.15	28.93	0.989

Tabella 5.4: Fitting dei dati sperimentali relativi alle concentrazioni di lattato 2 mM, 5 mM e 10 mM.

Come sottolineato in precedenza, solamente le concentrazioni più alte tra quelle testate sono caratterizzate una cinetica marcata. Le soluzioni a minor concentrazione, invece, pur mostrando un incremento nel valore di assorbanza, non presentano un vero e proprio un valore di saturazione nei 300 secondi, ma piuttosto un andamento lineare a pendenza molto bassa. Considerando il valore di assorbanza finale

registrato è stato possibile calcolare la concentrazione di NADH formato per ogni concentrazione di acido lattico iniziale, figura 5.22.

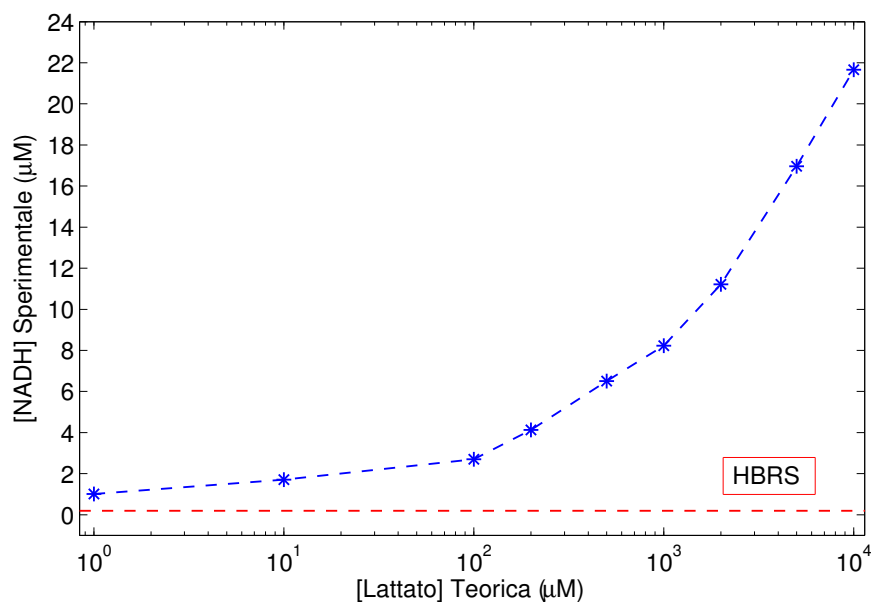


Figura 5.22: Curva di calibrazione del NADH prodotto dalla catalisi del lattato in HBRS.

Il grafico mostra come anche la soluzione a concentrazione minore di acido lattico (1 µM) sia in grado di produrre una quantità di NADH differente da quella del *blank* in HBRS. La concentrazione di NADH prodotto risulta lineare rispetto alla concentrazione iniziale di lattato nel *range* di concentrazioni 10 µM - 500 µM, con una sensibilità pari a  $9.714 \frac{\mu M}{mM}$ . Infine, da questi dati è stato possibile ricavare importanti indicazioni sull'efficienza di catalisi dell'enzima LDH, figura 5.23. L'efficienza rappresenta la quantità di NADH prodotta dalla reazione in relazione alla concentrazione iniziale di acido lattico:

$$Efficienza = \frac{[NADH]_{sperimentale}}{[LA]_{teorica}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

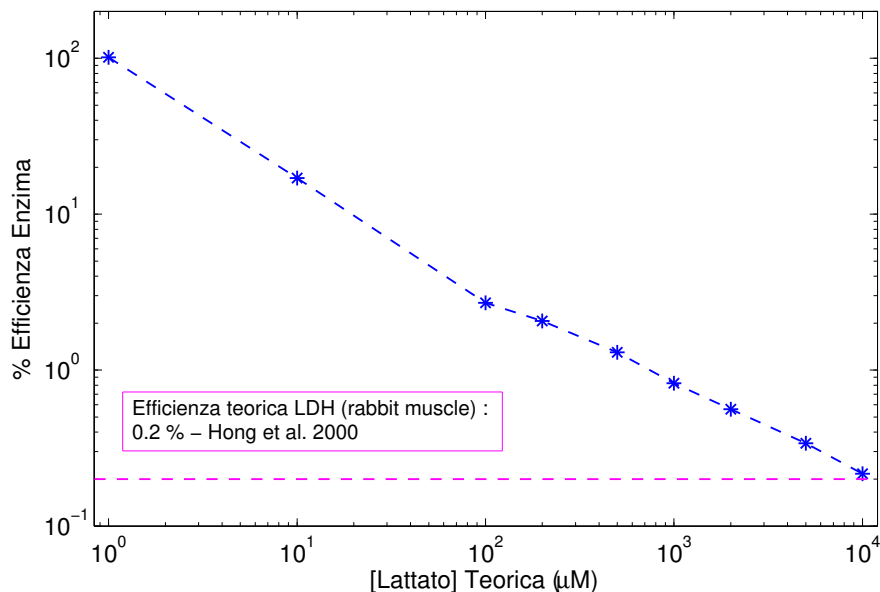


Figura 5.23: Efficienza dell'enzima LDH per la catalisi del lattato in piruvato in funzione della concentrazione di lattato iniziale

Il grafico mostra una dipendenza lineare tra la concentrazione di acido lattico iniziale in soluzione e l'efficienza della reazione. Si deduce che l'attività effettiva dell'enzima LDH sia influenzata dalle quantità dei reagenti presenti in soluzione. Aumentando la quantità di acido lattico iniziale, infatti, l'efficienza dell'enzima decresce fino ad arrivare ad un valore pari a 0,216 % per la soluzione 10 mM. Questo mostra come l'efficienza teorica dell'enzima, pari a 0,2 %, venga raggiunta solo ad alte concentrazioni iniziali di analita. Mentre per le soluzioni a più bassa concentrazione vengono evidenziati valori molto più elevati.

### 5.3.2 Ciclovoltammetria

Al termine di ogni esperimento di spettrofotometria sono state svolte 3 misure di ciclovoltammetria su dispositivi diversi, ricavando i voltammogrammi relativi alle differenti soluzioni di lattato testate, figura 5.24. Analogamente alla rilevazione del NADH anche nel caso del lattato si è deciso di considerare come parametro per la curva di calibrazione la corrente registrata a 456 mV, in figura 5.25.

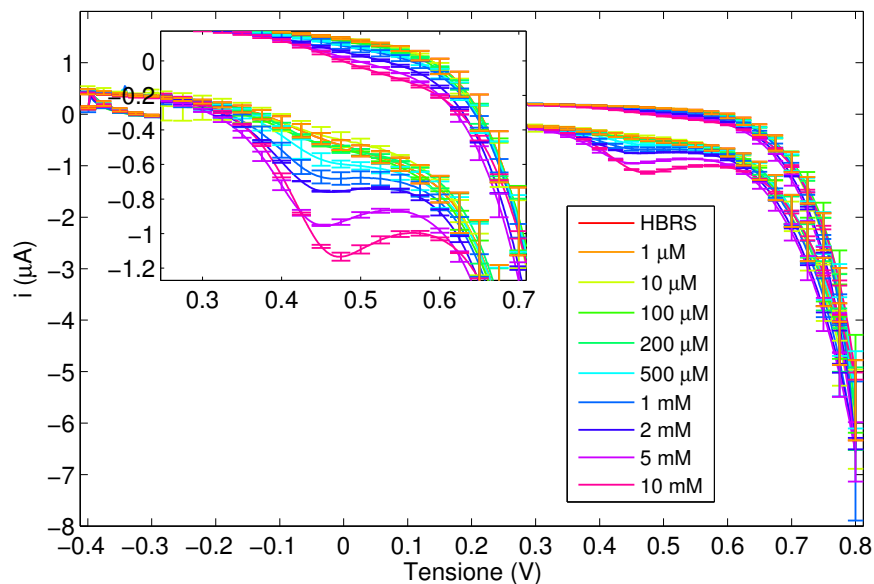


Figura 5.24: Ciclovoltammogrammi relativi alle misure di lattato in HBRS al termine delle cinetiche allo spettrofotometro. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi

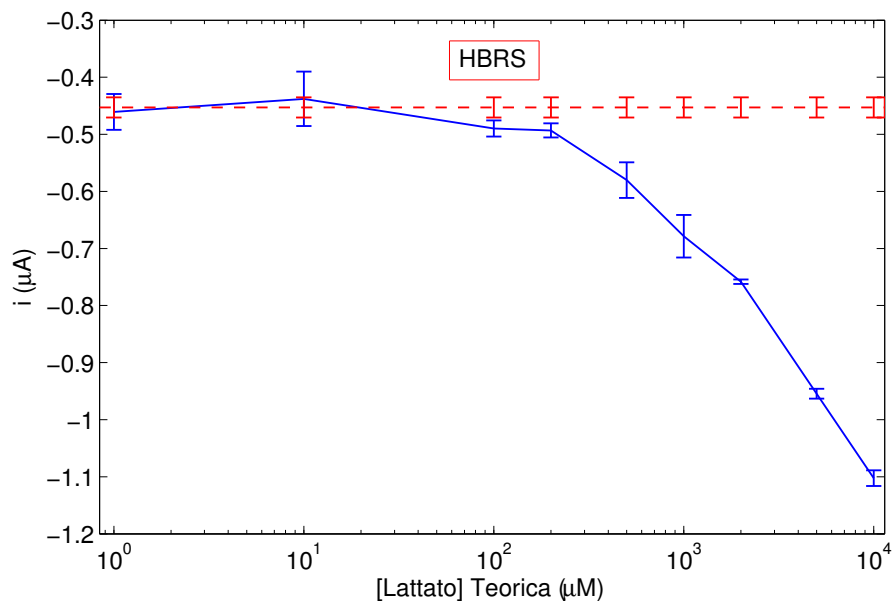


Figura 5.25: Curva di calibrazione del lattato ottenuta dalla corrente a 456 mV delle ciclovoltammetrie sulle soluzioni di lattato in HBRS a concentrazione:  $1 \mu M$ ,  $10 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $500 \mu M$ ,  $1 mM$ ,  $2 mM$ ,  $5 mM$  e  $10 mM$

Tutti i voltammogrammi presentano una forte interferenza a potenziali vicini a 800 mV, causata dal mezzo HBRS. Ciononostante, i picchi di ossidazione del NADH sono chiaramente visibili a 456 mV. La curva di calibrazione presenta un limite di rilevabilità pari a 100  $\mu\text{M}$  e un limite di quantificazione di 500  $\mu\text{M}$ . Si può osservare infatti come la corrente prodotta dalla *baseline* HBRS si sovrapponga ai campioni a più bassa concentrazione (1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ). Utilizzando i valori di assorbanza a fine cinetica e le correnti a 456 mV per ogni concentrazione di lattato testata è stato possibile ricavare la correlazione tra la tecnica ottica ed elettrochimica, figura 5.26.

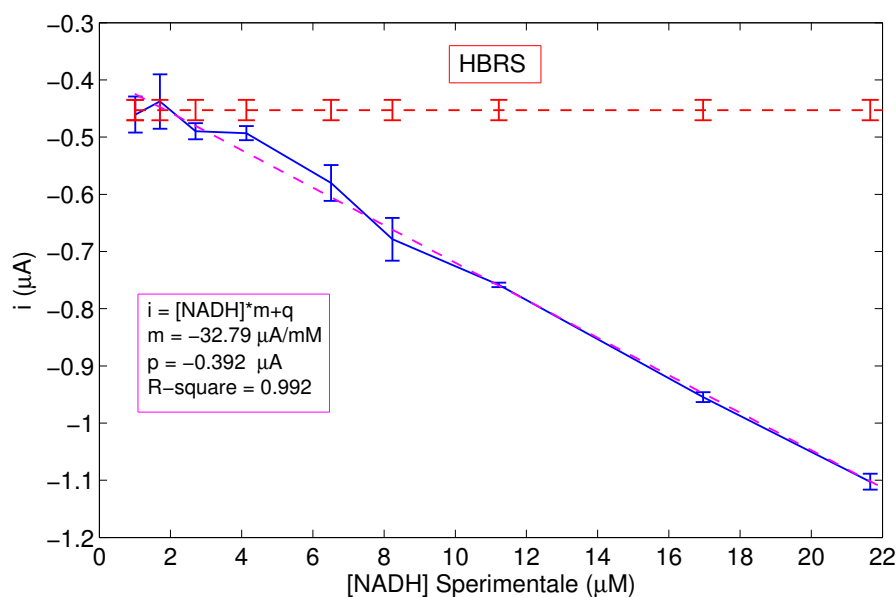


Figura 5.26: Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato

Come si può osservare dal grafico, la concentrazione calcolata del NADH e la corrente registrata a 456 mV, hanno una relazione lineare con una pendenza pari a  $-0.032 \frac{\mu\text{A}}{\mu\text{M}}$ . Infine, confrontando la quantità di NADH prodotto sperimentalmente a partire dal lattato, figura 5.27, con la retta di calibrazione del NADH ottenuta in precedenza, si può notare un'ottima sovrapposizione tra le due curve, per concentrazioni superiori a 5  $\mu\text{M}$ , mentre per concentrazioni inferiori, l'interferenza causata dall'HBRS influisce notevolmente sul valore di corrente.

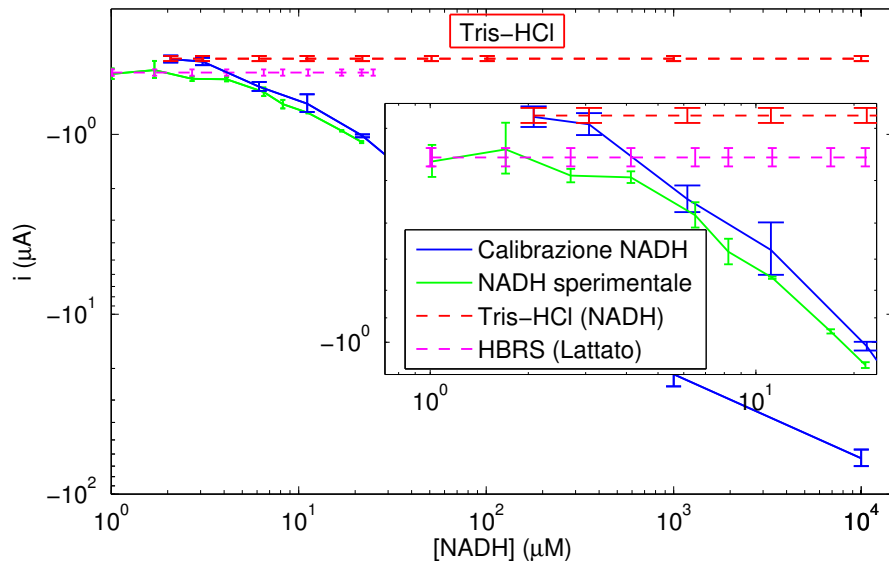


Figura 5.27: Confronto tra retta di calibrazione del NADH (blu) e la quantità di NADH prodotto sperimentalmente in soluzione dal lattato (nero)

## 5.4 Confronto tra il kit Megazyme e il protocollo BioDevices

Allo scopo di validare i protocolli ottici ed elettrochimici di rilevazione del lattato realizzati nell'ambito di questa tesi, il protocollo *BioDevices* definito nel precedente paragrafo è stato confrontato con il *kit* commerciale della *Megazyme Inc.* per la quantificazione del lattato. Il kit e il suo funzionamento sono descritti in modo approfondito nel paragrafo 4.3.

### 5.4.1 Spettrofotometria UV-Vis

In questa sezione vengono mostrati e confrontati i risultati riferiti a misure di spettrofotometria (cinetiche) ottenuti con il *kit Megazyme* e il protocollo *BioDevices*. I dati sono mostrati in media e deviazione standard, *kit* commerciale in figura 5.28 e 5.29, protocollo *BioDevices* in figura 5.31 e 5.32.

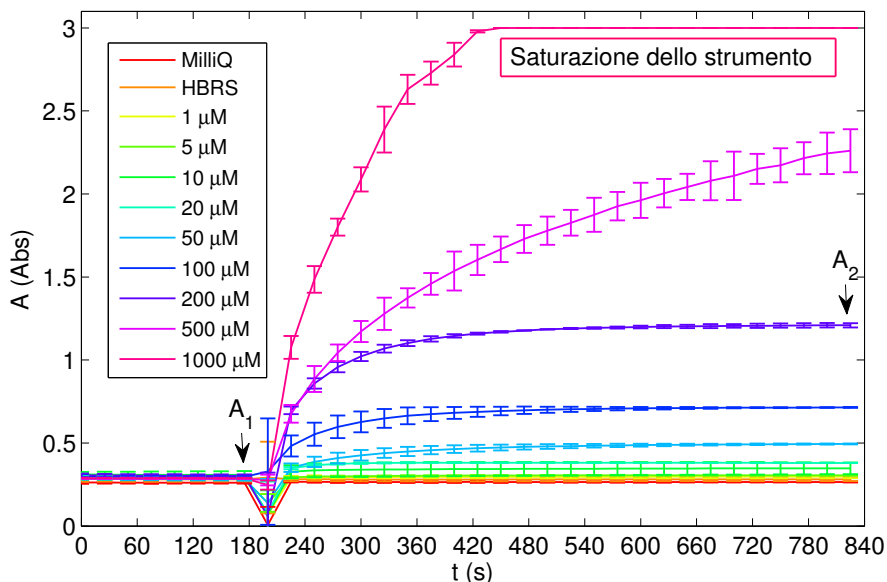


Figura 5.28: Cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il kit Megazyme. La baseline delle misure è misurata in aria (*cuvetta* di quarzo vuota). Il campione è stato aggiunto dopo 3 minuti registrando nell'intervallo precedente l'assorbanza dovuta ai reagenti in *cuvetta* ( $A_1$ ). Mentre il parametro  $A_2$  è ricavato a fine cinetica, un esempio di  $A_2$  è mostrato per la curva relativa a 200  $\mu\text{M}$ .

Come si può osservare tutti i campioni considerati, ad esclusione delle due concentrazioni più alte (500  $\mu\text{M}$  e 1 mM), presentano una cinetica ben definita, con una variabilità molto contenuta sui valori di assorbanza a fine cinetica. Le due soluzioni escluse, invece, non mostrano un valore asintotico, e sono caratterizzate da una variabilità molto più alta. Inoltre il campione di acido lattico 1 mM produce un'assorbanza tale da portare lo strumento a saturazione (3 Abs). La quantificazione del lattato si basa in realtà su una misura ottica differenziale. Infatti, essa utilizza la differenza di assorbanza prodotta dal valore finale ( $A_2$ ) rispetto al valore registrato dopo 3 minuti di cinetica ( $A_1$ ). In questo modo viene evidenziata unicamente la componente della misura legata alla catalisi del lattato.

$$\Delta A = A_2 - A_1 \quad (5.2)$$



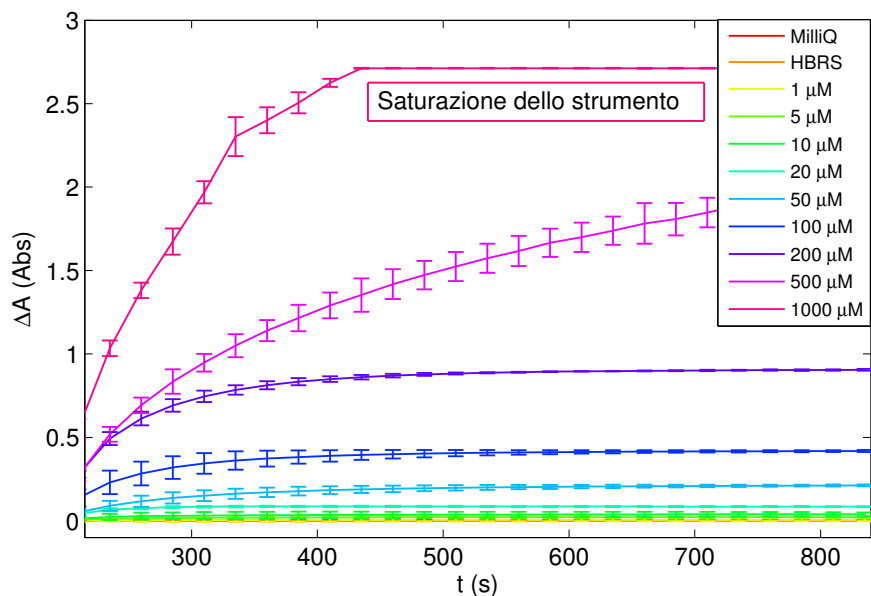


Figura 5.29: Differenze di assorbanza delle cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il kit Megazyme.

Dai valori del delta di assorbanza  $A_1$ , è possibile individuare il *range* lineare di concentrazioni di acido lattico rilevabili dal sistema attraverso un *fit*, cui parametri sono riportati in tabella 5.5:

$$\Delta A = m \cdot [LA] + q \quad (5.3)$$

Range di linearità	m	q	R-square
1 $\mu\text{M}$ - 200 $\mu\text{M}$	$4.499 \frac{\text{Abs}}{\text{mM}}$	-8.002 mAbs	0.999

Tabella 5.5: Parametri del fit lineare dei delta di assorbanza rispetto alla concentrazione di acido lattico del kit Megazyme

Questo risultato conferma le specifiche del *kit Megazyme* riportate dai produttori. Dai valori di assorbanza a fine cinetica sono state ricavate le concentrazioni di NADH prodotte dalla reazione, figura 5.30.

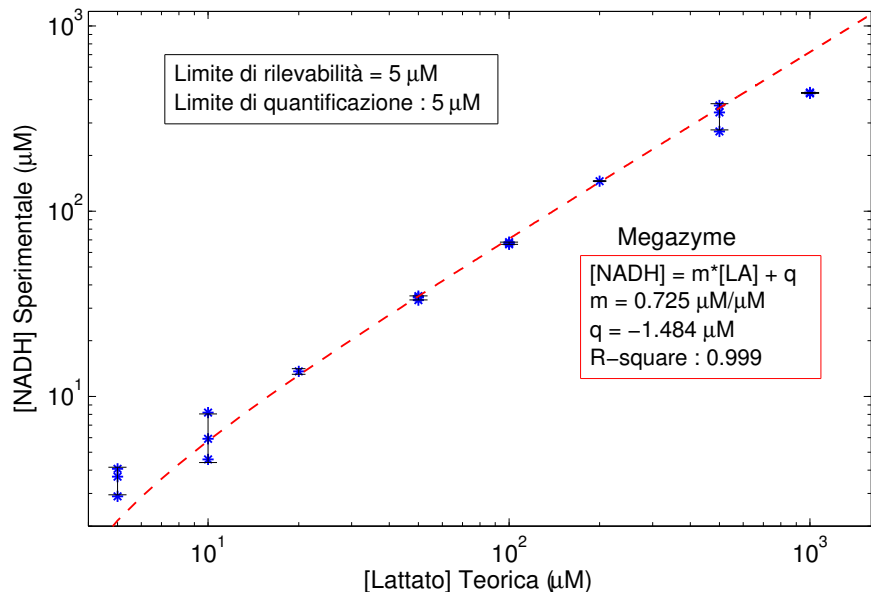


Figura 5.30: Curva di calibrazione del NADH prodotto dalla reazione del *kit Megazyme* in funzione della concentrazione di acido lattico iniziale. I parametri del fit sono riportati nel riquadro a destra.

Come già evidenziato in precedenza le cinetiche che maggiormente presentano alta riproducibilità e linearità sono quelle comprese nell'intervallo 2  $\mu\text{M}$  – 200  $\mu\text{M}$ , secondo gli *standard* del *kit*, fatta eccezione per le misure relative alla soluzione 10  $\mu\text{M}$  che presenta una variabilità notevolmente superiore se confrontata con le altre soluzioni appartenenti a tale *range*. Inoltre, la relazione tra il NADH prodotto a fine cinetica e la concentrazione iniziale di lattato è fortemente lineare e la pendenza del fit risulta 0.7247 ( $\frac{\mu\text{M}}{\mu\text{M}}$ ), indicando un'efficienza di reazione superiore al 70%. Le stesse analisi presentate per il *kit Megazyme* sono di seguito presentate per il protocollo *Biodevices*.

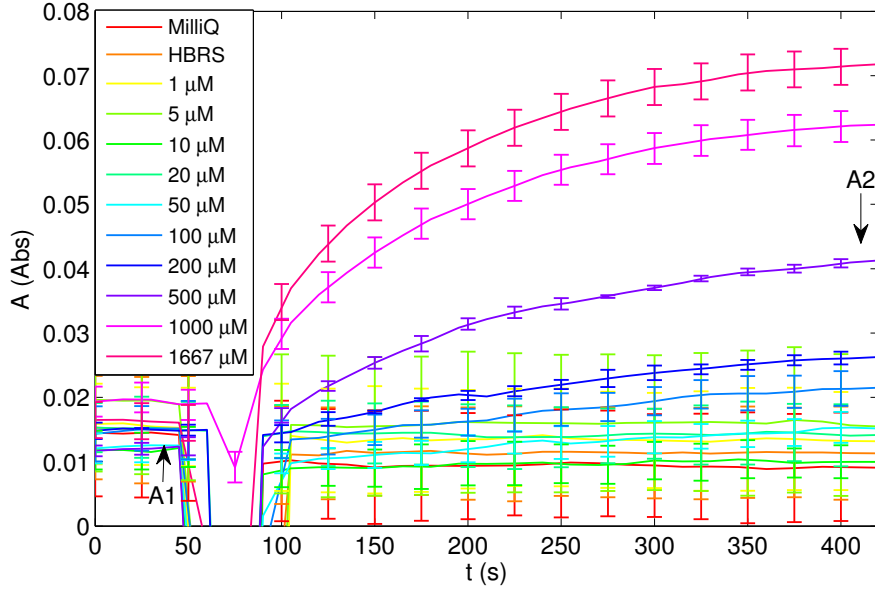


Figura 5.31: Cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il protocollo BioDevices. La baseline delle misure è ottenuta aria (*cuvetta* di quarzo vuota). Il campione è stato aggiunto dopo 1 minuti registrando nell'intervallo precedente l'assorbanza dovuta ai reagenti in *cuvetta*.

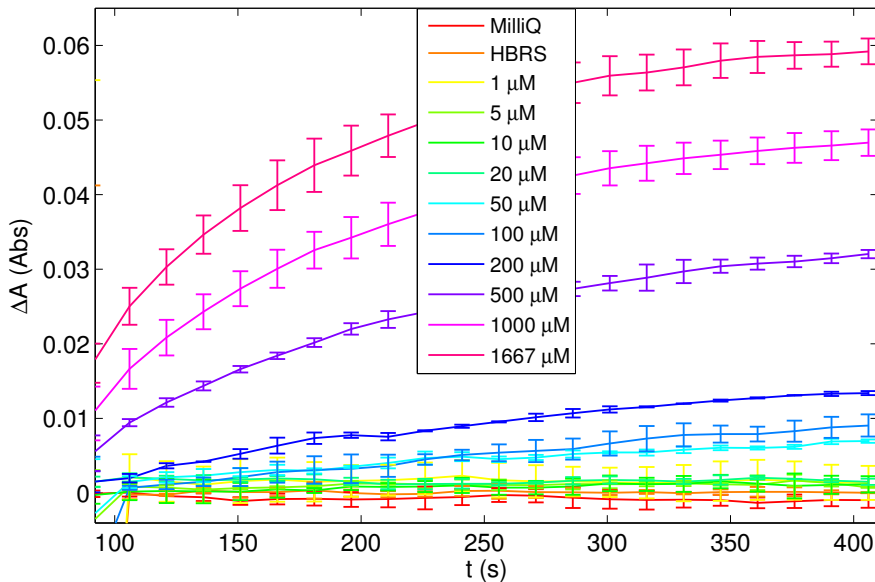


Figura 5.32: Differenze di assorbanza delle cinetiche di catalisi del lattato ottenute con il protocollo BioDevices.

In modo analogo a quanto svolto per il kit Megazyme, dai valori del delta di assorbanza finali, è stato ricavato il fit lineare, vedi formula (55), dei dati i cui parametri sono riportati in tabella 5.6.

Range di linearità	m	q	R-square
1 $\mu\text{M}$ - 200 $\mu\text{M}$	0.06621 $\frac{\text{Abs}}{\text{mM}}$	1.192 mAbs	0.999

Tabella 5.6: Parametri del fit lineare del protocollo BioDevices, relativi al delta di assorbanza e la concentrazione di acido lattico

A differenza dei risultati ottenuti con il *kit Megazyme*, questo protocollo mostra una bassa sensibilità all'acido lattico pur mantenendo una risposta lineare nel medesimo range. A concentrazioni superiori, invece, il protocollo BioDevices mostra un comportamento di saturazione descrivibile con un'equazione di Langmuir (vedi paragrafo 5.33)

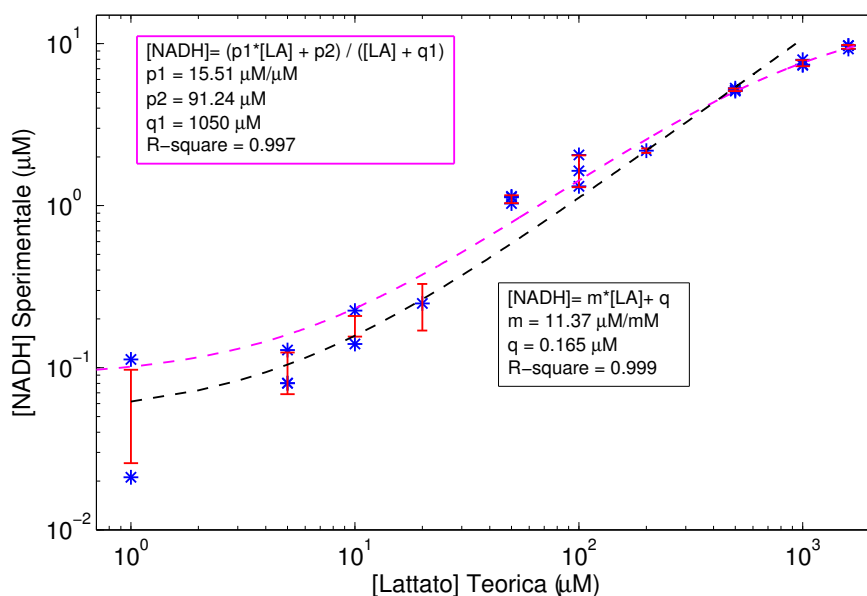


Figura 5.33: Curva di calibrazione del NADH prodotto dal protocollo BioDevices in funzione della concentrazione di acido lattico iniziale.

I parametri dei due fit sono riportati in figura 5.33. A conclusione dello studio inerente i due *set* sperimentali, vengono riportati i grafici di confronto delle analisi spettrofotometriche effettuate, in funzione della quantità di NADH prodotto in soluzione, in scala logaritmica in figura 5.34, e lineare in figura 5.35.

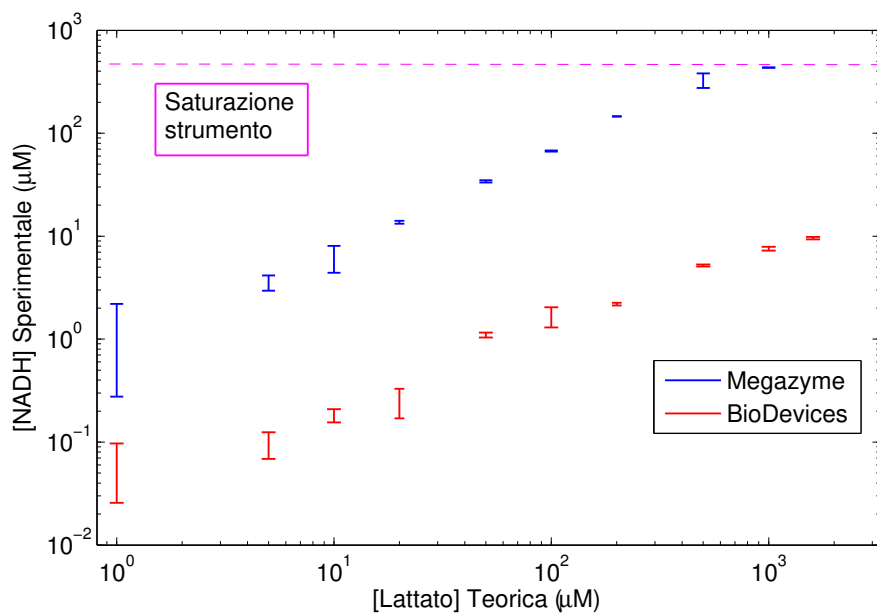


Figura 5.34: Confronto tra le curve di calibrazione del NADH prodotto dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices per le concentrazioni di acido lattico considerate.

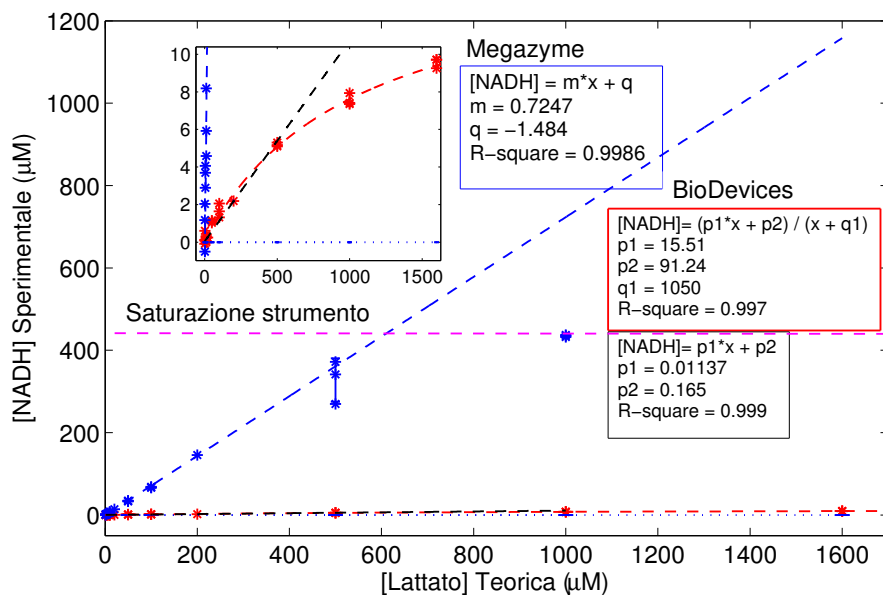


Figura 5.35: Confronto tra le curve di calibrazione del NADH prodotto dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices con le concentrazioni di acido lattico considerate.

L'efficienza della reazione enzimatica, vedi formula (53), viene calcolata come rapporto percentuale tra la quantità di NADH prodotta e la concentrazione di acido lattico teorica iniziale. Dunque, nel *range* di risposta lineare della misura, l'efficienza è rappresentata dalla pendenza del *fit*. In figura 5.36 è riportato il confronto tra l'efficienza dei due protocolli in scala logaritmica e il dettaglio relativo al protocollo *BioDevices*.

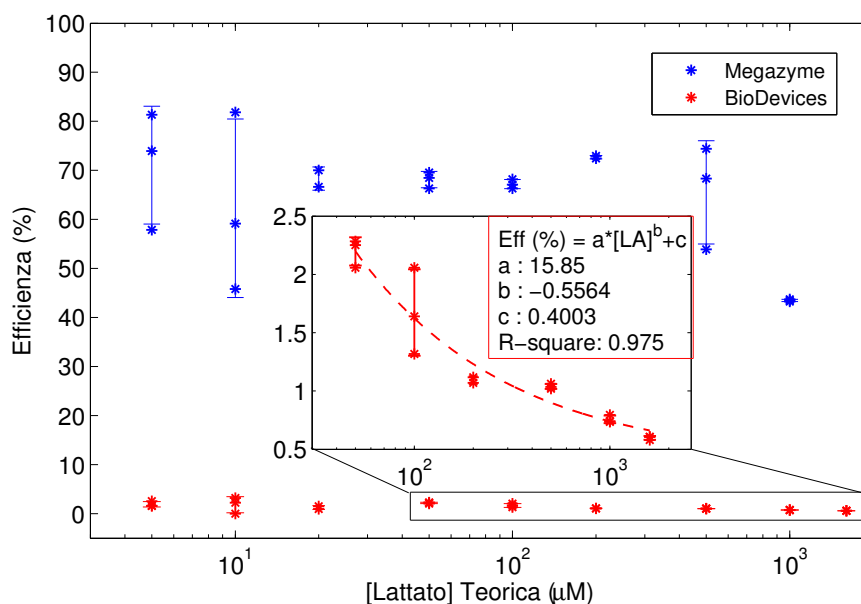


Figura 5.36: Confronto tra l'efficienza della reazione enzimatica del kit Megazyme e del protocollo BioDevices

Come atteso l'efficienza della reazione risulta esser notevolmente superiore nel *kit Megazyme*, infatti, ad esclusione delle misure fuori *range* lineare, in media è pari al 70%, e questo valore viene mantenuto costante per tutte le concentrazioni analizzate. Al contrario, il protocollo *BioDevices*, la cui massima efficienza non supera il 2,5%, mostra una rilevante decrescita all'aumentare della concentrazione di acido lattico. La notevole differenza nelle efficienze registrate trova spiegazione nelle reazioni biochimiche alla base dei due protocolli. L'isoforma di LDH utilizzata da entrambi i sistemi favorisce la reazione di catalisi del piruvato in lattato, quindi anche una piccola concentrazione di piruvato sbilancia la catalisi verso la produzione di lattato. Il protocollo *BioDevices* è quindi «frenato» da questo aspetto mentre il kit Megazyme sfrutta un secondo enzima, il D-GPT, per sottrarre alla reazione il piruvato prodotto dall'enzima LDH, rendendolo così non più disponibile per la reazione. Il *kit Megazyme* risulta quindi esser notevolmente superiore nelle misure spettrofo-

tometriche rispetto al protocollo *BioDevices*, sia dal punto di vista di efficienza che di riproducibilità.

## 5.4.2 Ciclovoltammetria

Al termine di ciascuna misura allo spettrofotometro, utilizzando le medesime soluzioni, è stata svolta la calibrazione elettrochimica mediante ciclovoltammetria sui dispositivi DS-110, mantenendo le stesse impostazioni e parametri utilizzati nella fase di calibrazione del lattato (paragrafo 5.3.2). I risultati sono riportati in figura 5.37, e 5.38.

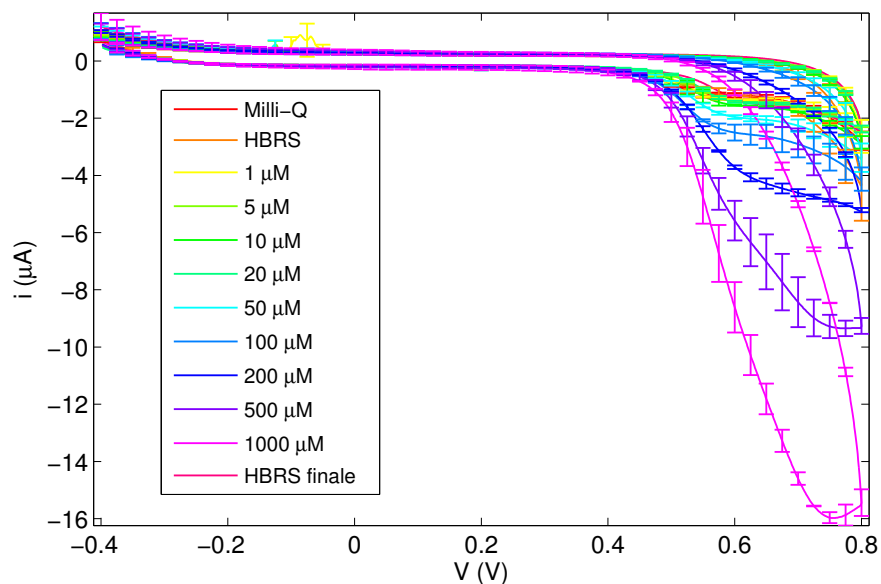


Figura 5.37: Ciclovoltammogramma del lattato in HBRS ottenuto con il kit Megazyme. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi.

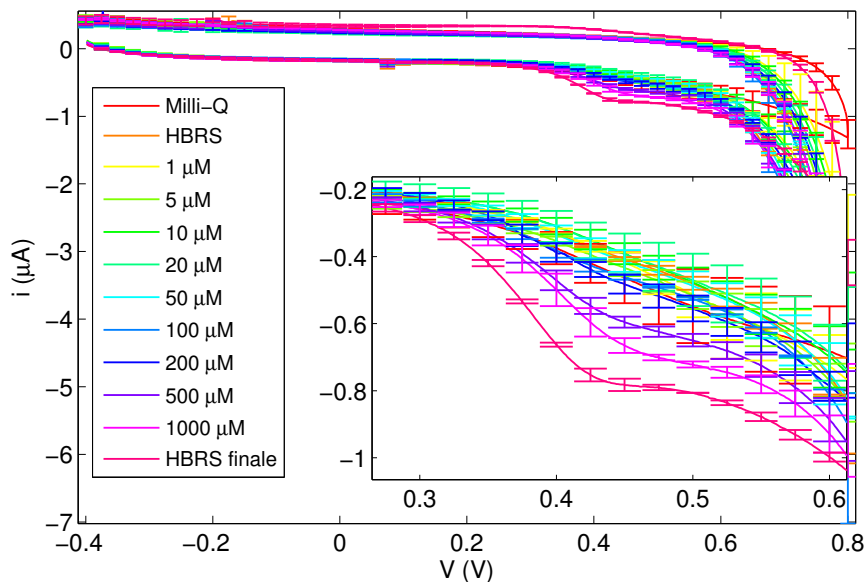


Figura 5.38: Ciclovoltammogramma del lattato in HBRS ottenuto con il protocollo BioDevices. Media e deviazione standard calcolate su 3 dispositivi.

Dai grafici risulta evidente che le correnti di picco prodotte dal *kit Megazyme* siano notevolmente più elevate rispetto a quelle del protocollo *BioDevices*, dovuta a una maggior quantità di NADH prodotta. Confrontando i risultati ottenuti, però, si può osservare come vi siano alcune fondamentali differenze che caratterizzano i due *set* di dati. In primo luogo le misure elettrochimiche svolte con il protocollo *Megazyme* presentano picchi di corrente a potenziali nettamente superiori rispetto ai risultati del protocollo *BioDevices*. In aggiunta si può notare anche come vi sia una maggior variabilità del potenziale di ossidazione del NADH in funzione della concentrazione di acido lattico. Questi aspetti influenzano in modo negativo la possibilità di realizzare misure di ciclovoltammetria con il *kit Megazyme* in matrici reali, in cui gli interferenti potrebbero influire sui valori di corrente a potenziali così elevati. I voltammogrammi ottenuti con il protocollo *BioDevices*, invece, presentano picchi di corrente a potenziali minori, ovvero 456 mV, come sottolineato in precedenza. Dalle correnti a 600 mV e a 456 mV sono state ricavate le rette di calibrazione dai dati sperimentali, figura 5.39-5.40 e 5.41, i cui rispettivi parametri sono riportati in tabella 5.7 e 5.8:

$$i = m \cdot [LA] \cdot +q \quad (5.4)$$



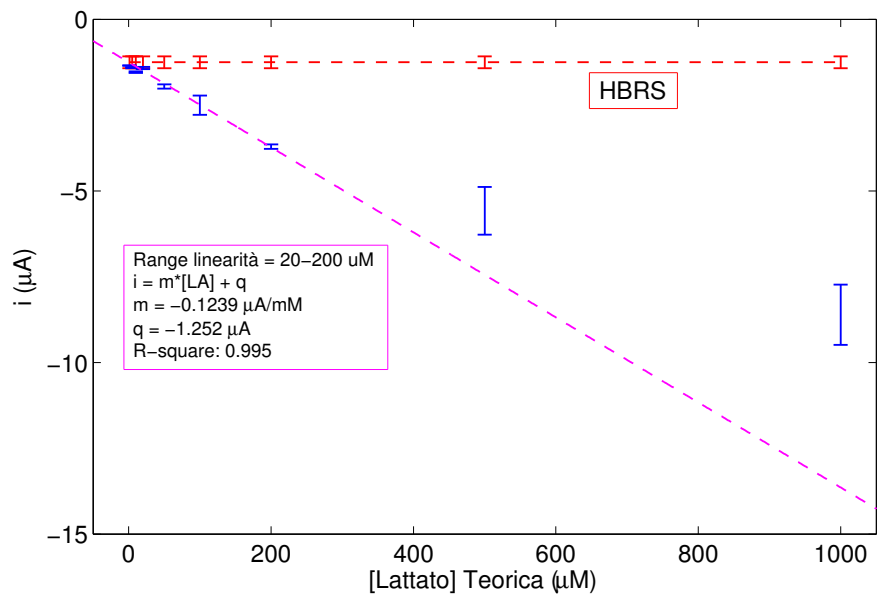


Figura 5.39: Curva di calibrazione ciclovoltammetrica del kit Megazyme riferita alla corrente registrata a 600 mV in funzione della concentrazione di acido lattico.

Range di concentrazioni	m	q	R-square
20 $\mu\text{M}$ - 200 $\mu\text{M}$	$-12.39 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$	-1.252 $\mu\text{A}$	0.995

Tabella 5.7: Parametri del fit lineare del kit Megazyme, relativi al picco di corrente registrato a 600 mV e la concentrazione di acido lattico

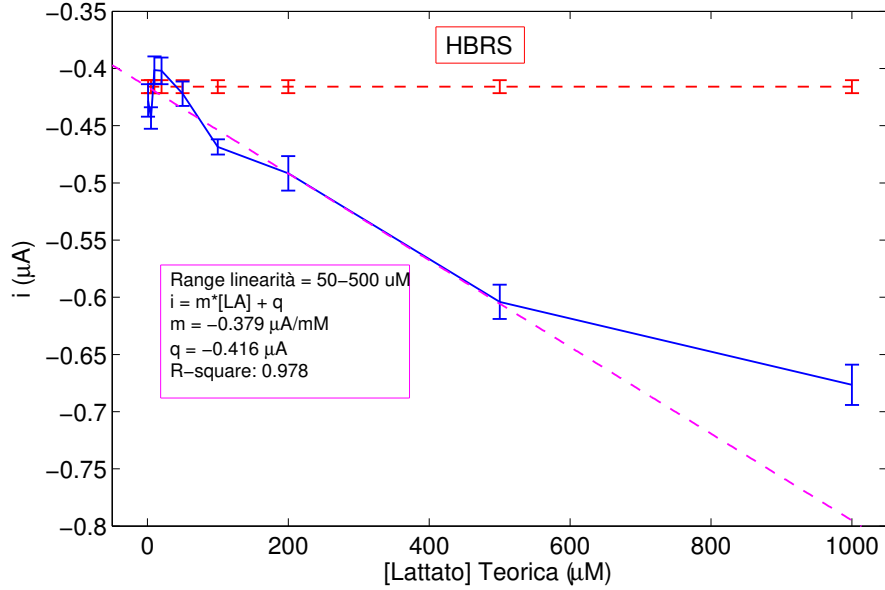


Figura 5.40: Curva di calibrazione ciclovoltammetrica del protocollo BioDevices riferita alla corrente registrata a 456 mV in funzione della concentrazione di acido lattico.

Range di concentrazioni	m	q	R-square
50 $\mu\text{M}$ - 500 $\mu\text{M}$	$-0.3791 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$	$-0.416 \mu\text{A}$	0.978

Tabella 5.8: Parametri del fit lineare del protocollo BioDevices, relativi ai picchi di corrente registrati a 456 mV e la concentrazione di acido lattico

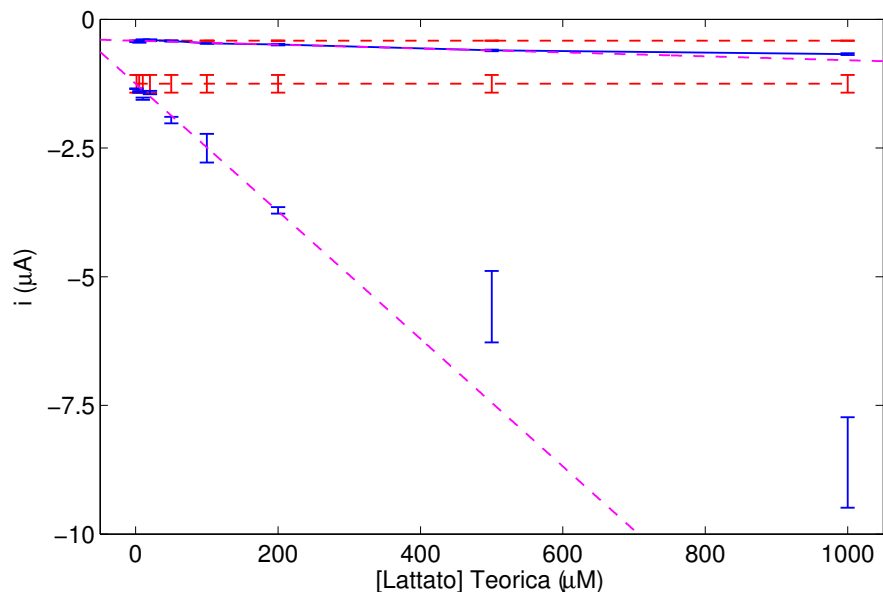


Figura 5.41: Confronto tra le curve di calibrazione ciclovoltammetriche prodotte dal kit Megazyme e dal protocollo BioDevices per le concentrazioni di acido lattico considerate.

Dai grafici si può osservare come le misure ottenute dal *kit Megazyme* siano caratterizzate da linearità in particolare nel range  $5 \mu\text{M} - 200 \mu\text{M}$ . Considerando invece le correnti prodotte dal protocollo *BioDevices*, si ha un andamento lineare nel range  $20 \mu\text{M} - 500 \mu\text{M}$ . Inoltre, dal grafico del confronto delle due tecniche emerge, ancora una volta, come il *kit Megazyme* produca mediamente dei valori di corrente oltre un ordine di grandezza superiore rispetto al protocollo BioDevices. Questo potrebbe esser origine di interferenza nei campioni biologici testati.

Bisogna tenere però in considerazione che per ottenere risultati significativi utilizzando il *kit Megazyme*, è stato necessario fare riferimento a dei potenziali superiori rispetto al protocollo *BioDevices*.

Per concludere, in figura 5.42 e 5.43 vengono mostrati i grafici di correlazione tra la quantità di NADH prodotta in soluzione mediante UV-Vis e le relative correnti di picco ciclovoltammetriche a 456 e 600 mV, sia con il *kit Megazyme* che con il protocollo *BioDevices*.

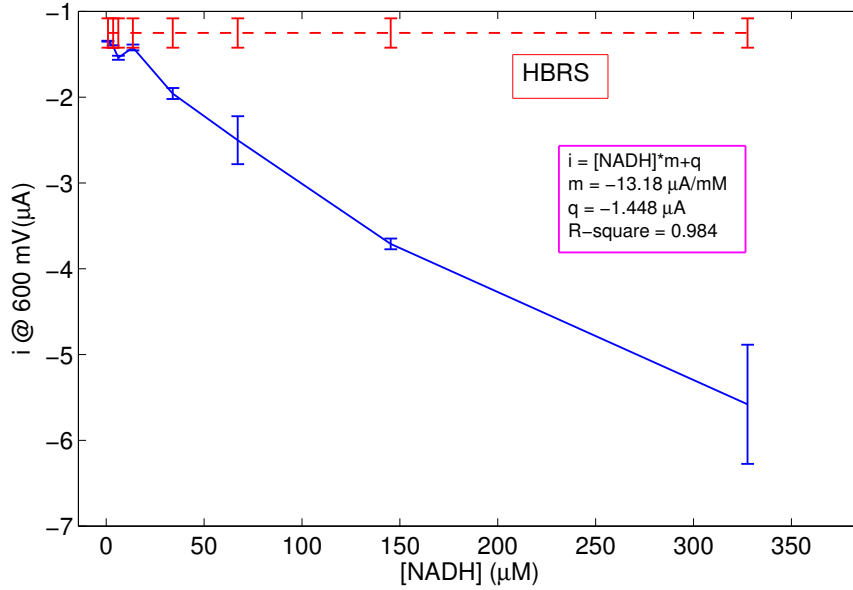


Figura 5.42: Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato prodotto dal kit Megazyme

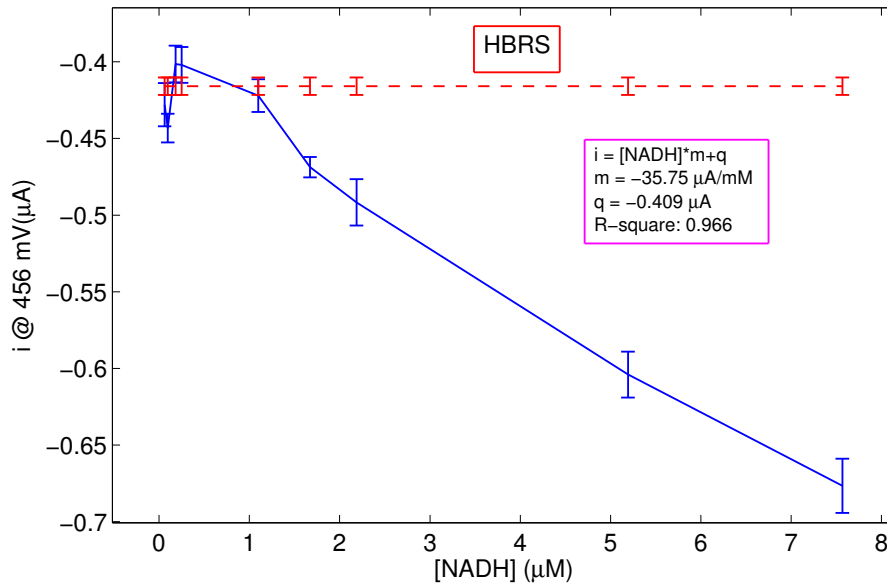


Figura 5.43: Curva di correlazione tra la misura ottica ed elettrochimica del lattato prodotto dal protocollo BioDevices

Dai valori di R-square ottenuti emerge chiaramente come il kit Megazyme sia caratterizzato da una maggior dipendenza lineare tra la corrente registrata a 600

mV e la concentrazione di NADH prodotta in soluzione, rispetto i risultati ottenuti con il protocollo BioDevices. Al contrario, il coefficiente di correlazione  $m$ , risulta superiore nei risultati ottenuti con il protocollo BioDevieces. In particolare si può osservare come la sensibilità della quantificazione CV per unità di NADH prodotto dalla catalisi enzimatica del protocollo BioDevices sia circa tre volte superiore rispetto i risultati del kit Megazyme.

### 5.4.3 Verifica di riproducibilità e ripetibilità del kit Megazyme

Allo scopo di valutare riproducibilità e ripetibilità delle misure ottenute con il *kit Megazyme*, anche in relazione allo stato di conservazione del prodotto in condizioni di stoccaggio (+4 gradi), sono stati ripetuti cinque *set* sperimentali identici utilizzando un'unica concentrazione di lattato in soluzione, pari a 100  $\mu\text{M}$ . Gli esperimenti sono stati eseguiti a differenti intervalli temporali dal giorno di apertura del prodotto a 20 giorni. Per ciascun esperimento, la misura del lattato 100  $\mu\text{M}$  è stata ripetuta 6 volte. Con questo *setup* si è voluto valutare quindi la risposta del protocollo *intra* e *inter* esperimento. Come svolto in fase di calibrazione sono state ricavate le cinetiche complessive e le relative efficienze di assorbanza per ogni esperimento effettuato. I risultati in termini di concentrazione di NADH prodotta, sono confrontati in figura 5.44.

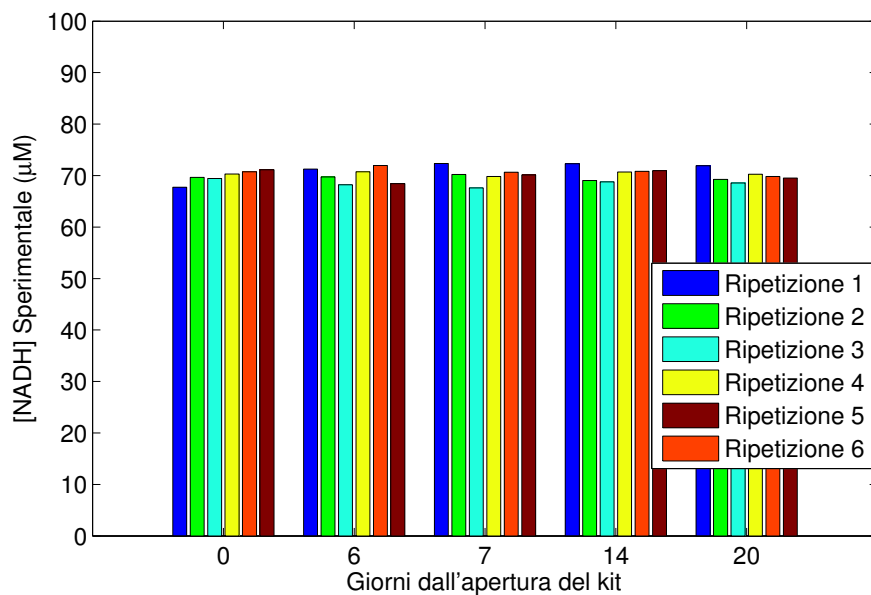


Figura 5.44: Confronto della quantità di NADH prodotto nei 5 esperimenti ripetuti con il kit Megazyme, utilizzando una soluzione lattato 100  $\mu\text{M}$  in HBRS.

Come si può notare dal grafico la quantità di NADH prodotta presenta una bassa variabilità relativa sia all'interno del medesimo *set* sperimentale che calcolata considerando la totalità dei dati ottenuti. In tabella 5.6, sono riportati i coefficienti di variazione CoV delle misure.

$$CoV = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100$$

dove  $\sigma$  è la deviazione standard e  $\mu$  il valor medio dei dati sperimentali.

Esperimento	CoV
1	0.71 %
2	0.72 %
3	0.91 %
4	0.47 %
5	0.97 %
<b>Tot.</b>	1.88 %

Tabella 5.9: Coefficienti di variazione ricavati dalle misure ripetute

Infine è stata valutata la riproducibilità delle misure ciclovoltammetriche sulle soluzioni a fine cinetica per 4 dei 5 esperimenti svolti. I valori di corrente registrati a 600 mV sono mostrati in figura 5.45 sovrapposti a quelli relativi all'HBRS.

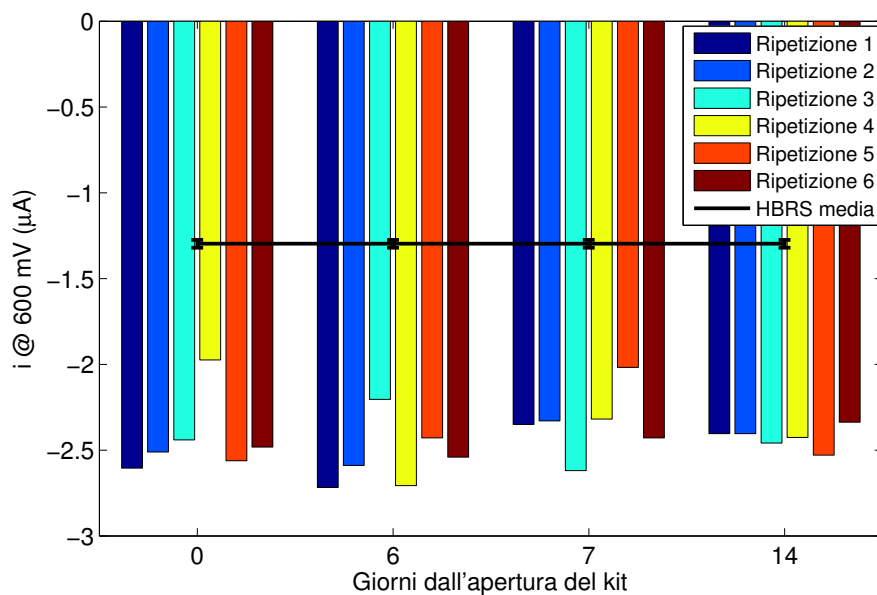


Figura 5.45: Confronto della corrente registrata a 600 mV in 4 esperimenti ripetuti con il kit Megazyme, utilizzando una soluzione lattato 100 µM in HBRS

Anche in questo caso sono stati calcolati i coefficienti di variazione *intra* e *inter* esperimento, tabella 5.7.

<b>Esperimento</b>	<b>CoV</b>
<b>1</b>	9.50 %
<b>2</b>	7.63 %
<b>3</b>	8.32 %
<b>4</b>	2.65 %
<b>Tot.</b>	1.88 %

Tabella 5.10: Coefficienti di variazione ricavati dalle misure ripetute

Osservando i parametri di variabilità è evidente come la tecnica elettrochimica sia caratterizzata da un livello di incertezza molto superiore rispetto alla controparte ottica. Ma ciononostante sia perfettamente utilizzabile per quantificare le concentrazioni di lattato esaminate fino a questo punto.

## 5.5 Confronto tra il kitMegazyme e il protocollo BioDevices su campioni reali

Allo scopo di validare il biosensore sviluppato e da confrontarne le performance di rilevazione in matrice reale con il kit Megazyme, sono state condotte misure di acido lattico sui campioni di sudore, descritti nel paragrafo 4.3.

### 5.5.1 Spettrofotometria UV-Visibile

In questa sezione vengono mostrati i risultati ottenuti dalle misure di spettrofotometria mediante il *kit Megazyme* e il protocollo *BioDevices* sui campioni di sudore, diluiti come descritto nel paragrafo 4.1.5. Dai valori dei delta di assorbanza a fine cinetica è stato possibile ricavare la quantità di acido lattico presente nel campione (figura 5.46) utilizzando le rette di calibrazione definite nei paragrafi 5.4.1 e 5.4.2, i cui parametri sono riportati nelle tabelle 5.5 e 5.6.

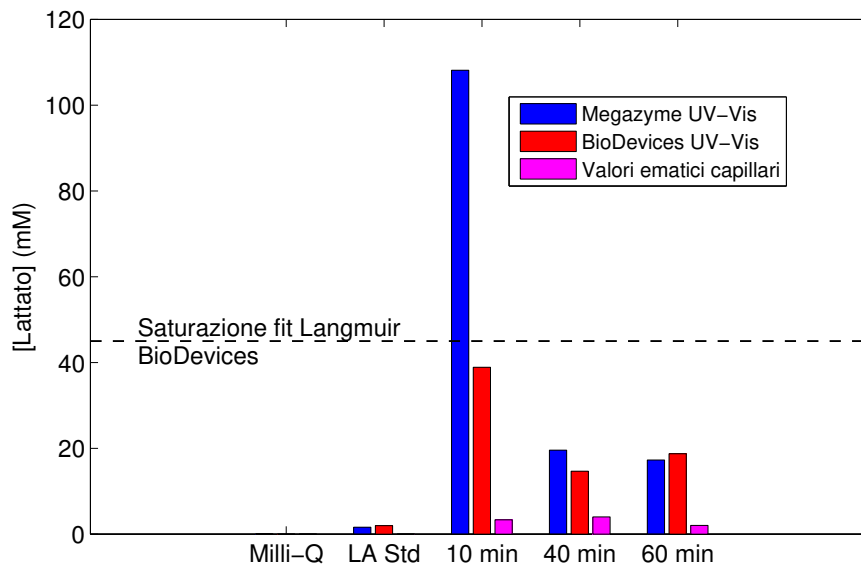


Figura 5.46: Valori di acido lattico in Milli-Q, LA Megazyme standard e campioni di sudore prelevati a 10', 40' e 60', ricavati mediante analisi spettrofotometrica.

Dal grafico si può osservare come le concentrazioni di lattato misurate nelle soluzioni LA Megazyme standard coincidano con quella nominale, con un errore inferiore al 5%, mentre nei campioni in Milli-Q la concentrazione di analita è nulla, come atteso. Inoltre le concentrazioni di lattato misurate sui campioni di sudore prelevati a 40' e 60' con i due protocolli sono confrontabili, mostrando la maggior coerenza nelle misure a 60 minuti, con una deviazione standard di 0,838 mM, corrispondente al 4.48% del valor medio. Invece, risulta evidente che la quantità di acido lattico contenuta nel campione a 10 minuti appare molto differente confrontando i due protocolli. Questo è probabilmente dovuto al fatto che il campione biologico diluito (con diluizione differente a seconda del protocollo) contiene una concentrazione di acido lattico tale da rientrare nel *range* lineare del *kit Megazyme*, ma non in quello del protocollo *BioDevices*. Dunque la concentrazione registrata con il protocollo *BioDevices* di tale campione si avvicina notevolmente a quella di saturazione del *fit Langmuir*, pari a 45 mM, perdendo di significato. Infine, si può osservare chiaramente come le concentrazioni dei campioni di sudore siano notevolmente superiori rispetto a quelle ematiche capillari, in modo concorde a quanto riportato in precedenti lavori[42].

## 5.5.2 Ciclovoltammetria

Al termine di ciascuna misura allo spettrofotometro, le soluzioni, sono state testate in ciclovoltammetria su 3 dispositivi DS-C110, mantenendo le stesse impostazioni e parametri utilizzati nella fase di calibrazione del lattato (paragrafo 5.3.2). In modo analogo a quanto svolto per l'analisi spettrofotometrica sono state ricavate



le concentrazioni di acido lattico dei campioni, utilizzando le curve di calibrazione definite nel paragrafo 5.4.2, figura 5.47.

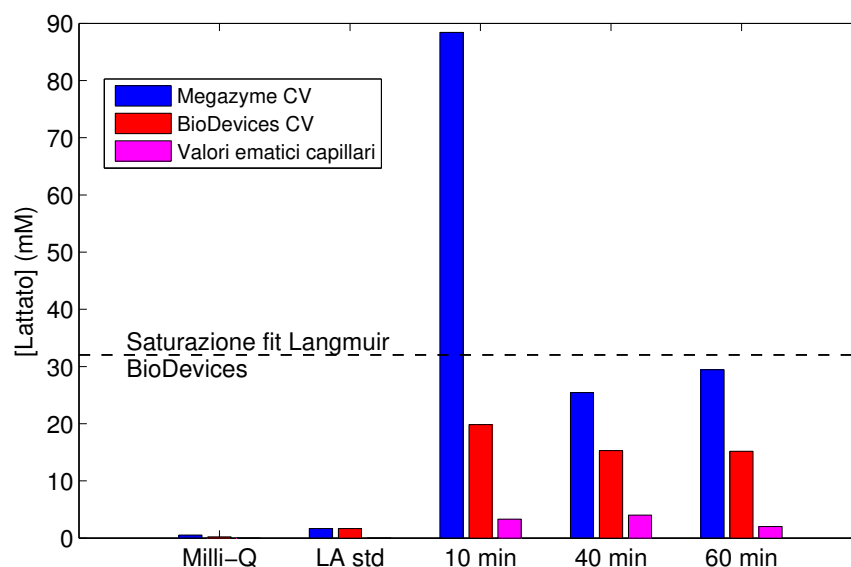


Figura 5.47: Valori di acido lattico nei campioni di Milli-Q, LA Megazyme standard e campioni biologici considerati, ricavati mediante analisi ciclo voltammetrica

La quantità di acido lattico misurata con il *kit Megazyme* risulta superiore rispetto a quella rilevata con il protocollo *BioDevices* per tutti i campioni analizzati. Ciononostante, le concentrazioni misurate per via elettrochimica con il protocollo *BioDevices* risultano più simili a quelle spettrofotometriche, rispetto ai risultati del *kit Megazyme*. Anche in questo caso il campione a 10 minuti si colloca però ad una concentrazione vicina a quella di saturazione del *fit Langmuir*, rendendo la misura poco significativa.

A questo scopo è stata studiata la correlazione tra la quantità di acido lattico ottenuta per via spettrofotometrica e ciclo voltammetrica, figura 5.48.

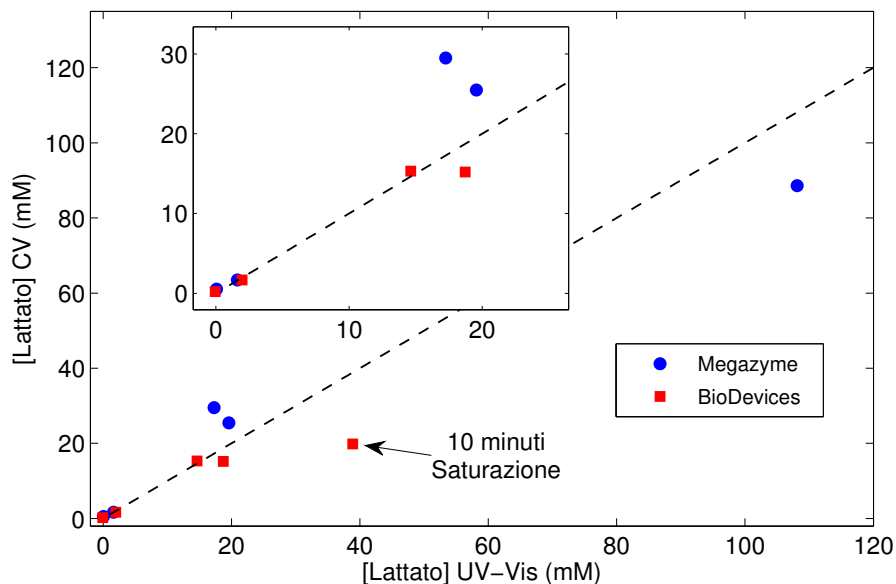


Figura 5.48: Grafico di correlazione della concentrazione di acido lattico ricavata mediante analisi spettrofotometrica e ciclovoltammetrica, con il kit Megazyme e il protocollo BioDevices.

I punti più vicini alla bisettrice sono quelli ottenuti con il protocollo *BioDevices*. Infatti, ad eccezione della misura del campione a 10 minuti, che porta in saturazione il *fit*, i valori di lattato determinato con le due tecniche di misura sono simili. I dati sperimentali ottenuti con il kit *Megazyme*, invece, presentano una correlazione meno marcata; ciò potrebbe esser spiegato dal fatto che la tensione impiegata nelle analisi ciclovoltammetriche, pari a 600 mV, possa esser causa di interferenza nella misura. Come già sottolineato a conclusione del paragrafo 5.4, quindi, si evince come a livello di analisi elettrochimica il protocollo BioDevices sia preferibile al kit Megazyme per applicazioni su campioni reali.

# Capitolo 6

## Conclusioni

Il lavoro svolto è stato incentrato sulla realizzazione di un biosensore elettrochimico per acido lattico, basato su dispositivi commerciali serigrafati in carbonio (SPCE) a basso costo. Il biosensore sviluppato sfrutta la reazione di catalisi dell'acido lattico mediata dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH). Questa reazione, in presenza di acido lattico e del cofattore  $NAD^+$ , produce NADH in rapporto stechiometrico 1:1 con l'acido lattico. Il NADH è una molecola rilevabile sia otticamente, con un picco di assorbanza a 340 nm, che elettrochimicamente, ossidandola agli elettrodi. Il primo punto del lavoro di tesi è stato lo studio di alcuni pretrattamenti elettrochimici sui dispositivi per rendere più efficiente la rilevazione elettrochimica del NADH. I pretrattamenti considerati consistono nella preanodizzazione dei dispositivi mediante 3 differenti soluzioni:  $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$  e  $NaOH$ . Le modifiche superficiali dei dispositivi sono state valutate mediante misure di EIS e CV in ferro/ferricianuro e analisi della superficie degli elettrodi trattati al SEM. Dai diagrammi di Bode delle impedenze misurate è emerso come i pretrattamenti abbiano modificato radicalmente le proprietà della superficie dei dispositivi, portando la risposta in frequenza più vicino a quella di un sistema ideale con trasferimento di carica. Il *modeling* delle impedenze utilizzando la *cella di Randles* come circuito equivalente ha confermato questo aspetto, consentendo di osservare un incremento della resistenza di trasferimento di carica ( $R_{ct}$ ) e della capacità di *double layer* ( $C_{dl}$ ) nei dispositivi pretrattati, rispetto a quelli non trattati. Infine, l'analisi delle immagini SEM ha evidenziato come i pretrattamenti abbiano modificato in modo differente la superficie dei dispositivi, confermando quanto ottenuto dalle misure d'impedenza. In particolare, è emerso come il trattamento con  $NaHCO_3$  abbia drasticamente ridotto le asperità della superficie, mentre il pretrattamento con  $NaOH$  ha avuto un effetto di *sharpening*, aumentando le irregolarità morfologiche. Viceversa, i dispositivi trattati con  $Na_2CO_3$  sono quelli che mostrano modifiche superficiali trascurabili. A conclusione di questo studio, è stata valutata la performance di rilevazione del NADH da parte dei dispositivi trattati e non, mediante CV, provando come le tecniche di preanodizzazione impiegate non solo non siano state in grado di migliorare la risposta dei dispositivi, ma l'abbiano addirittura peggiorata rispetto a quella dei dispositivi non

trattati. Per questo motivo è stato scelto di non effettuare alcun pretrattamento sui dispositivi SPCE negli studi successivi.

Il passo seguente del lavoro di tesi è consistito nella definizione di una curva di calibrazione del NADH in matrice ideale sui dispositivi mediante ciclovoltammetria e amperometria. Per fare questo sono state misurate concentrazioni di NADH comprese tra 1  $\mu\text{M}$  e 10 mM in Tris-HCl, preventivamente titolate mediante misure di spettrofotometria UV-Visibile a 340 nm. Dalle misure svolte sono stati individuati come parametri di calibrazione la corrente registrata a 456 mV per le CV e la corrente all'istante iniziale a 600 mV per l'amperometria. Questi parametri sono i valori più bassi di potenziale che producono una risposta lineare del sensore alle basse concentrazioni. Dal confronto delle curve di calibrazione ottenute è emerso come la ciclovoltammetria sia caratterizzata da una maggiore sensibilità, pari a  $-36.74 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$  e una concentrazione minima quantificabile pari a 5  $\mu\text{M}$ . Per questo motivo è stato deciso di utilizzare solo questa tecnica per le successive caratterizzazioni.

Terminata la calibrazione del NADH, si è proceduto alla calibrazione del lattato sfruttando la reazione di catalisi dell'LDH descritta in precedenza. Monitorando l'assorbanza della soluzione ad una lunghezza d'onda di 340 nm nel tempo, è stato infatti possibile quantificare la cinetica di formazione del NADH conseguente all'aggiunta delle concentrazioni di lattato. Le cinetiche osservate sono state caratterizzate da una rapida crescita lineare seguita da una saturazione entro 5 minuti dall'inizio della misura. I valori finali di assorbanza sono quindi stati utilizzati per ricavare una misura sperimentale della concentrazione di NADH ottenuta in soluzione. La stessa soluzione è stata poi testata sui dispositivi mediante ciclovoltammetria. Le concentrazioni di lattato in grado di produrre NADH con rapporto costante risultano comprese tra 10  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , con una costante di proporzionalità pari a  $9.714 \frac{\mu\text{M}}{\text{mM}}$ . Questo indica come la reazione considerata sia poco efficiente nella conversione del lattato e del cofattore NAD in NADH. La calibrazione CV è stata valutata nuovamente come la corrente registrata a 456 mV. Questo studio ha permesso di individuare come range lineare di risposta del sensore le concentrazioni di acido lattico tra 50  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , con una sensibilità tra la corrente a 456 mV e il NADH prodotto di  $-0.3791 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$ . In questo modo, è stato possibile confrontare le curve di calibrazione di NADH prodotto al termine della catalisi enzimatica, con quelle del NADH testate in precedenza, ottenendo una buona sovrapposizione. Il protocollo utilizzato per la misura dell'acido lattico, che è stato chiamato protocollo BioDevices è stato poi validato sia in matrice ideale che reale (su campioni di sudore raccolti durante un gesto atletico) mediante misure spettrofotometriche e CV. Il protocollo è stato inoltre confrontato con un kit commerciale della Megazyme, Inc. Dal confronto è emerso come la sensibilità del kit Megazyme, pari a  $4.499 \frac{\text{Abs}}{\text{mM}}$ , sia notevolmente superiore rispetto a quella del protocollo *Biodevices*, pari a  $0.0662 \frac{\text{Abs}}{\text{mM}}$ , dato che al suo interno interviene una seconda reazione enzimatica ad aumentare radicalmente l'efficienza di catalisi fino al 70 %. I range di linearità invece risultano esser identici e compresi tra 1  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ . Il protocollo BioDevices ha mostrato invece un'efficienza massima del 2.5% con una decrescita all'aumentare della concentrazione di

acido lattico. L'analisi ciclovoltammetrica, invece, ha messo in evidenza come il kit Megazyme produca valori di corrente di picco superiori a quelli del protocollo BioDevices, ma anche a potenziali superiori con potenziali effetti di disturbo dovuti ad interferenti per misure su campioni reali. La calibrazione CV del kit Megazyme è stata infatti ottenuta utilizzando la corrente registrata a 600 mV, e mostra un range di linearità pari a 20  $\mu\text{M}$  - 200  $\mu\text{M}$  con una sensibilità di  $-12.39 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$ . Il protocollo BioDevices invece, fa riferimento a un potenziale di calibrazione pari a 456 mV con un intervallo di linearità compreso fra 50  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  e sensibilità di  $-0.3791 \frac{\mu\text{A}}{\text{mM}}$ . La differenza nei potenziali di riferimento delle due tecniche assume un ruolo chiave nella valutazione complessiva di quest'ultime, in quanto, le soluzioni *target* del nostro dispositivo sono campioni biologici, in cui a potenziali superiori a 500 mV aumenta in modo consistente la probabilità di interferenza nelle misure elettrochimiche.

A conclusione del lavoro di tesi, il biosensore è stato validato in matrice reale, su campioni di sudore forniti dal dipartimento di scienza biomediche dell'Università di Padova, confrontandone i risultati con il *kit Megazyme* dal punto di vista spettrofotometrico e ciclovoltammetrico. Valutando la correlazione tra la quantità di acido lattico misurata otticamente ed elettrochimicamente, il protocollo *BioDevices* ha mostrato una maggiore coerenza nei risultati ottenuti. Ciò, come descritto in precedenza, può essere dovuto ad interferenza nelle misure CV del *kit Megazyme* legata al potenziale di analisi e alla matrice reale considerata. In conclusione, quindi, è stato dimostrato come la rilevazione elettrochimica di acido lattico nei campioni biologici sia più accurata mediante il protocollo *BioDevices*, anche se l'analisi spettrofotometrica mediante il *kit Megazyme* risulti comunque più performante.



# Bibliografía

- [1] J Ballesta-Claver, M C Valencia-Mirón, and L F Capitán-Vallvey. One-shot lactate chemiluminescent biosensor. *Analytica chimica acta*, 629(1-2):136–44, nov 2008.
- [2] Rinaldo Bellomo. Bench-to-bedside review : Lactate and the kidney. *Critical Care Vol. 6 No. 4*, 6(4):4–6, 2002.
- [3] Lorena Betancor, L Fernando, Aurelio Hidalgo, Noelia Alonso-morales, Gisela Dellamora-ortiz Cesar Mateo, Roberto Fern, and Jose M Guis. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports : Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) 877:882 Different*, 39:877–882, 2006.
- [4] Viviane Casimiri and Claude Burstein. Biosensor for L -lactate determination as an index of E . coli number in crude culture medium. *Analytica Chimica Acta*, 361:45–53, 1998.
- [5] Asha Chaubey, Manju Gerard, Rahul Singhal, V.S Singh, and B.D Malhotra. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta*, 46:723–729, 2001.
- [6] Asha Chaubey, K. K. Pande, V. S. Singh, and B. D. Malhotra. Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films. *Analytica Chimica Acta 407 (2000) 97:103 Co-immobilization*, 407(1-2):97–103, 2000.
- [7] Christina B. Ansinsen. Principles that govern the Folding of Protein Chains. *Science Vol. 181*, 181(4096), 1973.
- [8] G Cui, J H Yoo, J S Lee, J Yoo, J H Uhm, G S Cha, and H Nam. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. *The Analyst*, 126(8):1399–1403, 2001.
- [9] Farzana Darain, Sang Un Park, and Yoon Bo Shim. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modi-

- fied screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 773-780, 18(5-6):773-780, 2003.
- [10] E Dock and T Ruzgas. Screen-printed carbon electrodes modified with cellobiose dehydrogenase: Amplification factor for catechol vs. reversibility of ferricyanide. *Electroanalysis*, 15(5-6):492-498, 2003.
- [11] Pablo Fanjul-Bolado, Paula Queipo, Pedro José Lamas-Ardisana, and Agustín Costa-García. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta* 74 (2007) 427:433, 74(3):427-433, 2007.
- [12] G.A. Brooks. Systemic lactate kinetics during graded exercise in man, 1998.
- [13] Fouad Ghamouss, Sophie Ledru, Nadine Ruillé, Françoise Lantier, and Mohammed Boujtita. Bulk-modified modified screen-printing carbon electrodes with both lactate oxidase (LOD) and horseradish peroxidase (HRP) for the determination of L-lactate in flow injection analysis mode. *Analytica chimica acta*, 570(2):158-164, jun 2006.
- [14] Matthew L Goodwin, James E Harris, M Ed, Andrés Hernández, L Bruce Gladden, and D Ph. Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise :. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(4):558-569, 2007.
- [15] Carla Gouveia-Caridade, Rasa Pauliukaite, and Christopher M.a. Brett. Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol. *Electrochimica Acta*, 53(23):6732-6739, oct 2008.
- [16] G.palleschi. Bioelectrochemical determination. *Talanta*, 41(6):917-923, 1994.
- [17] Catherine M. Halliwell, Evelyne Simon, Chee Seng Toh, Philip N. Bartlett, and Anthony E G Cass. Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly-(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 453(2):191-200, 2002.
- [18] Tzu-chuan Huang, Shih-ming Chen, Yi-chieh Li, and Jen-ai Lee. Urinary D-lactate levels reflect renal function in aristolochic acid-induced nephropathy in mice. *Wiley Online Library*, (250):1100-1106, 2013.
- [19] Bikash Kumar Jena and C. Retna Raj. Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Gold Nanoparticles. *Electroanalysis*, 19(7-8):816-822, apr 2007.
- [20] Eugenii Katz and Itamar Willner. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy : Routes to Impedimetric Immunosensors , DNA-Sensors , and Enzyme Biosensors. *Elsevier*, pages 913-947, 2003.



- [21] D Ario K Kriz. Amperometric Determination of L -Lactate Based on Entrapment of Lactate Oxidase on a Transducer Surface with a Semi-Permeable Membrane Using a SIRE Technology Based Biosensor . Application : Tomato Paste and Baby Food. *Journal of agricultural and food chemistry*, pages 0–5, 2002.
- [22] Vasilica Lates, Delia Gligor, Liana M. Muresan, and Ionel Catalin Popescu. Comparative investigation of NADH electrooxidation at graphite electrodes modified with two new phenothiazine derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661(1):192–197, oct 2011.
- [23] Xianchan Li, Lingzhi Zhao, Zhenling Chen, Yuqing Lin, Ping Yu, and Lanqun Mao. Continuous electrochemical monitoring of extracellular lactate production from neonatal rat cardiomyocytes following myocardial hypoxia. *Analytical chemistry*, 84:5285–5291, 2012.
- [24] C Meyerhoff, F Bischof, F J Mennel, F Sternberg, and E F Pfeiffer. On line continuous monitoring of blood lactate in men by a wearable device based upon an enzymatic amperometric lactate sensor. *Biosensors & bioelectronics (1993) 409-414*, 8:409–414, 1993.
- [25] Adriana Mignani, Erika Scavetta, Lorella Guadagnini, and Domenica Tonelli. Sensors and Actuators B : Chemical Comparative study of protective membranes for glucose biosensors based on electrodeposited hydrotalcites. *Sensors and Actuators B 136 (2009) 196:202*, 136(3):196–202, 2009.
- [26] David L Nelson, Michael M Cox, and Lunney Margaret. *I principi di biochimica di Lehninger*. 2014.
- [27] James E Nocek. Bovine Acidosis : Implications on Laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5):1005–1028, 1997.
- [28] F Palmisano, G E De Benedetto, and C G Zambonin. Lactate Amperometric Biosensor Based on an Electrosynthesized Bilayer Film with Covalently Immobilized Enzyme. *Analyst*, 122(April):365–369, 1997.
- [29] F Palmisano, R Rizzi, D Centonze, and P G Zambonin. Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films. *Biosensors & bioelectronics*, 15(9-10):531–539, 2000.
- [30] F. Pariente, E. Lorenzo, L. Vázquez, E. Casero, and A. Parra. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Analytica Chimica Acta*, 555(2):308–315, jan 2006.
- [31] Byung-Wook Park, Dong-Shik Kim, and Do-Young Yoon. Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers

- for enzyme biosensors. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(1):64–70, dec 2010.
- [32] N G Patel, A Erlenkotter, K Cammann, and G Chemnitz. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. *Sensors and Actuators B 67 2000 134-141*, pages 134–141, 2000.
- [33] D Pfeiffer, B Möller, N Klimes, J Szeponik, and S Fischer. Amperometric lactate oxidase catheter for real-time lactate monitoring based on thin film technology. *Biosensors & bioelectronics*, 12(6):539–550, 1997.
- [34] Barrie Phypers, J M Tom, and Pierce Mrcp. Lactate physiology in health and disease. *Elsevier*, 6(3):128–132, 2006.
- [35] M Piano, S Serban, R Pittson, G a Drago, and J P Hart. Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola’s Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD+. *Talanta*, 82(1):34–7, jun 2010.
- [36] Małgorzata Przybyt. Lactate biosensors for food industry. *Biotechnology and Food Sciences Lactate*, 78(1):71–88, 2014.
- [37] Liza Rassaei, Wouter Olthuis, Seiya Tsujimura, and Albert Van Den Berg. Lactate biosensors: Current status and outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1):123–137, 2014.
- [38] Kavita Rathee, Vikas Dhull, Rekha Dhull, and Sandeep Singh. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5:35–54, 2016.
- [39] Francesco Ricci, Aziz Amine, Danila Moscone, and Giuseppe Palleschi. A probe for NADH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric detection at low applied potential for oxidase and dehydrogenase based biosensor applications. *Biosensors & bioelectronics*, 22(6):854–62, jan 2007.
- [40] R Rimachi, F Bruzzi De Carvahlo, and F Cotton. Lactate / pyruvate ratio as a marker of tissue hypoxia in circulatory and septic shock. *Anaesth Intensive Care 2012; 40: 427-432*, page 2012, 2012.
- [41] MR Romero, Fernando Garay, and AM Baruzzi. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131(2):590–595, may 2008.

- [42] D A Sakharov, M U Shkurnikov, M Yu Vagin, E I Yashina, A A Karyakin, and A G Tonevitsky. Relationship between Lactate Concentrations in Active Muscle Sweat and Whole Blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 150(1):83–85, 2010.
- [43] Simona Serban and Nabil El Murr. Redox-flexible NADH oxidase biosensor: A platform for various dehydrogenase bioassays and biosensors. *Electrochimica Acta*, 51(24):5143–5149, jul 2006.
- [44] Fira Shapiro and Nissim Silanikove. Rapid and accurate determination of D - and L -lactate , lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore : Applications in food quality control. *Food Chemistry 119 (2010) 829-833*, 119(2):829–833, 2010.
- [45] AD. Smith. *Biochemistry and Molecular Biology*, 1197.
- [46] I Smith, P Kumar, S Molloy, A Rhodes, P J Newman, R M Grounds, E D Bennett, and A Rhodes. Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. *Intensive Care Med (2001) 27:74-83*, pages 74–83, 2001.
- [47] F K Stekelenburg. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus cur*  $\bar{O}$  atus and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology 66 2001 197:203*, pages 197–203, 2001.
- [48] Hazhir Teymourian, Abdollah Salimi, and Rahman Hallaj. Low potential detection of NADH based on Fe  $3O_4$  nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes composite: Fabrication of integrated dehydrogenase-based lactate biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 33(1):60–68, 2012.
- [49] Yu Chen Tsai, Siao Y. Chen, and Hong W. Liaw. Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. *Sensors and Actuators B 125 (2007) 474:481 Immobilization*, 125(2):474–481, 2007.
- [50] Franco Valenza, Gabriele Aletti, Tommaso Fossali, Giorgio Chevallard, Francesca Sacconi, Manuela Irace, and Luciano Gattinoni. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients : hypothesis. *Critical Care Vol. 9 No. 6*, 9(6):588–593, 2005.
- [51] Daria Vladikova. The technique of the differential impedance analysis Part 1: Basics of the impedance spectroscopy. *Proceedings of the International Workshop Advanced Techniques for Energy Sources Investigation and Testing*, 2004.

- [52] Stefan Walenta, Michael Wetterling, Michael Lehrke, Georg Schwickert, Kolbein SundfØr, Einar K Rofstad, and Wolfgang Mueller-klieser. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases , Tumor Recurrence , and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers 1. *Cancer Research* 60, 916-921, pages 916–921, 2000.
- [53] D L Wang and a Heller. Miniaturized flexible amperometric lactate probe. *Analytical chemistry*, 65(8):1069–1073, 1993.
- [54] Hang Wei, Jian Jun Sun, Yu Xie, Cong Gui Lin, Yan Min Wang, Wen Hui Yin, and Guo Nan Chen. Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure. *Analytica Chimica Acta 588 (2007) 297-303 Enhanced*, 588(2):297–303, 2007.
- [55] F. Zambolin. Effetti di una dieta chetogenica nella performance del triathlon. *Università degli studi di Padova, Bachelor’s degree thesis*, 2015.