

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SENSORI CONDUTTIMETRICI NON INVASIVI PER APPLICAZIONI
BIOMEDICHE - REVISIONE DELLO STATO DELL'ARTE**

Relatrice: Prof.ssa Tonello Sarah

Laureando: Storato Edoardo

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 25/11/2022

ABSTRACT

I sensori elettrochimici, biosensori se usati per misurare parametri biologici, acquisiscono sempre più importanza nel campo delle misure; nuovi materiali e tecniche di realizzazione quali smart materials, nano strutture, tecniche di stampa, nuovi polimeri hanno portato in alto gli standard metrologici di questi dispositivi che competono e in alcuni casi sono addirittura preferiti a metodi di analisi tradizionali di laboratorio. Tra questi i sensori conduttimetrici si dimostrano molto versatili e di semplice realizzazione, garantiscono ottime performance metrologiche, sono facilmente adattabili a dispositivi indossabili e permettono sia rapide che prolungate misure per la ricerca di biomarkers specifici. Più avanti si analizzeranno particolari casi di interesse di applicazioni per misure di parametri medici di diversi fluidi corporei, citando la valenza clinica di questi ed enfatizzando la trattazione sulle specifiche dei dispositivi.

INDICE

1. INTRODUZIONE
2. GENERALITA' SUI SENSORI
3. MISURA DELLA CONDUCIBILITA'
4. ANALISI DEL RESPIRO
 - 4.1. Misura di anidride carbonica
 - 4.1.1. Sensori conduttimetrici in liquido
 - 4.2. Misura di ossido nitrico
 - 4.1.2. Sensori ad adsorbimento a base di ossidi metallici
5. ANALISI DEL SUDORE
 - 5.1. Misura di glucosio
 - 5.1.1. Sensori di glucosio a base enzimatica
 - 5.1.1.1. Cinetica enzimatica di Michaelis Menten
 - 5.1.1.2. Sensore conducimetrico a base di ossido di Indio, Silicio e Glucosio ossidasi
 - 5.2. Misura del cloro
 - 5.2.1. Cella conduttimetrica a microflusso
6. CONCLUSIONI
7. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

I fluidi biologici presenti nel corpo umano (i.e. saliva, sudore, urina, fiato, lacrime, muco, sangue e liquido interstiziale) rappresentano una preziosa risorsa per la diagnostica medica, grazie alla possibilità di correlare la misura delle loro proprietà e delle concentrazioni di ioni e molecole con specifici processi patofisiologici.

I marcatori che vengono ricercati in ciascuno dei biofluidi risultano particolarmente vari e coinvolti in contesti molto diversi delle scienze mediche. Per esempio, nella saliva si cercano molecole marcatori di condizioni endocrine, immunologiche, infettive (HIV, sarsCOV) ecc.; nel sudore la misura della concentrazione di Cl^- e Na^+ è il principale metodo per diagnosticare la fibrosi cistica (FC); nelle urine si ricercano concentrazioni di sostanze anomale indici di problemi sistemici o renali; nel fiato è possibile sfruttare le concentrazioni di molecole volatili per diagnosticare infezioni gastrointestinali o prevedere attacchi d'asma oltre che indicare possibile Alzheimer; nelle lacrime è in via di sviluppo la possibilità di misurare la glicemia attraverso lenti a contatto; per ultimi sangue e lic simili nelle caratteristiche sono storicamente i più conosciuti, analizzati e determinanti in diagnostica, rappresentano il gold standard per la maggior parte delle analisi.

I metodi tradizionali di analisi in laboratorio più comuni, come la spettroscopia, cioè la misura di trasmittanza e assorbanza del campione, e la cromatografia, tecnica di separazione del campione nelle sue componenti discrete grazie alle loro differenti proprietà fisiche, danno valori molto precisi e affidabili, ma richiedono personale specializzato per operare ed essendo spesso basati sull'analisi di campioni di tessuto/fluido danno risultati relativi solo al momento del prelievo, oltre che richiedere processi e macchinari costosi ed ingombranti.



Figura 1: uno spettrofotometro (sx), un laboratorio di analisi cromatografica (dx).

La ricerca spinge quindi su metodi di analisi non invasivi, a basso costo, che possano dare misure caratterizzate da elevata ripetibilità, riproducibilità, precisione e stabilità nel tempo. In questo contesto, i sensori elettrochimici, rappresentano un interessante strumento per cercare di coniugare miniaturizzazione, facilità di integrazione e mantenendo al contempo adeguate performance metrologiche.

Con il termine sensori elettrochimici ci si riferisce a una vasta gamma di elementi sensibili presenti in strumenti di misura che associano una proprietà elettrica misurata a concentrazioni di sostanze.

Il problema principale è che questi sono solitamente più soggetti a degradazione e variazione di sensibilità, soprattutto se per funzionare necessitano il contatto diretto con i tessuti biologici, spesso altamente aggressivi, caso in cui sono quindi richieste calibrizioni più frequenti e/o algoritmi di compensazione, e ne risultano tempi di vita degli apparecchi più brevi.

Nel prosieguo di questa tesi saranno analizzati tecnicamente diversi sensori per il monitoring di fluidi biologici e discussa sommariamente loro valenza clinica, verranno elencati principali svantaggi e caratteristiche tipiche dei dispositivi commerciali e/o applicazioni in ricerca quando rilevanti.

Importante specificare che comunemente con il termine sensore si intende l'intera struttura che effettua la misura, composta da: un elemento sensibile, la parte del sensore che entra in contatto con il campione modificando le proprie proprietà per interazione con uno o più analiti, un trasduttore che converte tale modifica in un segnale elettrico misurabile più un eventuale circuito di condizionamento.

Quando lo strato sensibile è un'entità biologica, ad esempio un enzima, un anticorpo o un frammento di DNA, si parla di biosensori elettrochimici.

2. GENERALITA' SUI SENSORI

Affinché un sensore sia utilizzabile vengono richiesti buoni valori dei seguenti parametri:

- Selettività: capacità dell'elemento sensibile di interagire con la sola sostanza d'interesse senza disturbi da parte di altre sostanze che possono essere simili.
- Sensibilità: collegata alla risoluzione e al LOD, è la capacità di rilevare quanto più piccole variazioni del misurando
- Linearità della relazione tra misurando e risposta del sensore
- Brevi tempi di risposta
- Assenza di effetti di memoria come l'isteresi per cui misure per valori crescenti di un misurando differiscono dalle stesse misure prese per valori decrescenti
- Reiezione dei disturbi ambientali quali temperatura, pH, campi elettromagnetici, vibrazioni.
- Stabilità ambientale, cioè la capacità di operare senza degradarsi nel tempo o alterare le proprie caratteristiche, collegata alla vita operativa del sensore e al numero di cicli di funzionamento.
- Piccole dimensioni, sono stati sviluppati sensori miniaturizzati in grado di captare molecole derivate da processi a livello della singola cellula, inoltre è utile che il sensore sia applicabile al paziente o addirittura impiantabile con la minima invasività possibile.
- Ripetibilità: lo strumento deve essere in grado di fornire misure coerenti quando le condizioni operative sono le stesse.
- Semplicità di fabbricazione, da cui risulta anche un minor costo.
- Semplicità di utilizzo, apparecchi operabili da persone medicalmente laiche favoriscono nuovi tipi di medicina a distanza.

Per la vastità di applicazioni e la disomogeneità di caratteristiche è difficile categorizzare i sensori in gruppi a compartimenti stagni, tuttavia sono comunemente usate tre classificazioni: in base al tipo di connessione, cioè se il sensore è a contatto con il paziente o se la misura avviene contact-less; al tipo di circuito elettrico e al principio di funzionamento.

Elettricamente i sensori elettrochimici si categorizzano in 4 macro-categorie: **Voltammetrici (o voltamperometrici)** quando un potenziale variabile (gradualmente, a

impulsi o sinusoidale) viene applicato tra i due elettrodi della cellula e ne viene misurata la corrente che vi scorre, **Amperometrici** quando effettuano una misura voltammetrica con un potenziale che è però fisso ed imposto, e in cui la corrente misurata è proporzionale all'analita elettroattivo, un esempio è l'elettrodo di Clark per la pCO₂. I vantaggi di queste due tipologie sono un'altissima sensibilità, da cui deriva anche il più basso LOD (Limit of Detection, la quantità minima di analita che il sensore riesce a rilevare) dell'ordine di 10⁻¹² M, la possibilità di effettuare una misura continua nel tempo e di poter distinguere diversi analiti nel corso della stessa misura in base alle loro differenti proprietà elettriche. Gli svantaggi sono che l'analita deve essere elettroattivo per essere rilevato, molti composti organici non rientrano in questa categoria; inoltre la corrente variabile imposta altera l'ambiente circostante e potrebbe interferire con reazioni fisiologiche d'interesse. Nel caso di misura voltammetrica in ambiente biologico gli elettrodi possono essere contaminati da biomolecole non di interesse; con le misure amperometriche, soprattutto se statiche, è facile incappare nel problema della saturazione degli elettrodi.

Sono detti **Potenzimetrici** quando misuro una ddp tra due elettrodi di una cella galvanica senza che vi scorra corrente e ponendo uno dei due ad un potenziale di riferimento costante, mentre l'altro immerso nella soluzione con l'elettrolita di incognita concentrazione. Questi sono facilmente miniaturizzabili, consentono un monitoraggio continuo senza disturbare l'ambiente circostante e non richiedono l'elettroattività, di contro soffrono di *cross-sensitivity* (condizione per cui l'elemento sensibile ha interazioni con multiple sostanze, ad esempio diventa complesso misurare la concentrazione di una molecola in una soluzione se nella stessa sono presenti altre sostanze affini al sensore) inoltre la ddp misurata può essere alterata dalla presenza di ioni. Un esempio è il sensore di pH con elettrodo a vetro o l'elettrodo Stow-Severinghaus per la misura della pCO₂.

Infine i sensori cosiddetti **Conduttimetrici (o conducimetrici)** misurano la resistenza (quindi la conduttività) di soluzioni campione valutando la corrente che scorre tra due elettrodi a cui è applicata una tensione, in seguito una dimostrazione di una semplice applicazione nella misura dell'osmolarità di una soluzione fisiologica. Anche questi consentono un monitoraggio continuo e la miniaturizzazione, non necessitano di elettrodi di riferimento ma soffrono di *cross-sensitivity*, bassa sensibilità (sono oggetto di ricerca l'utilizzo di nanomateriali come nanofilamenti di ossidi metallici o nanostrutture di carbonio che risolvono in parte il problema) e, molto importante, richiedono modelli

matematici per estrarre informazioni utili. Sono purtroppo molto influenzati da condizioni ambientali come pH e temperatura.

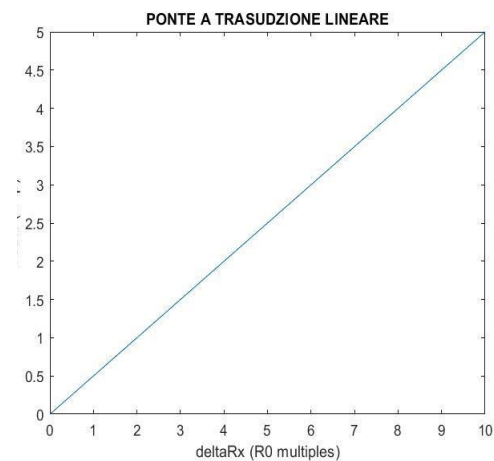
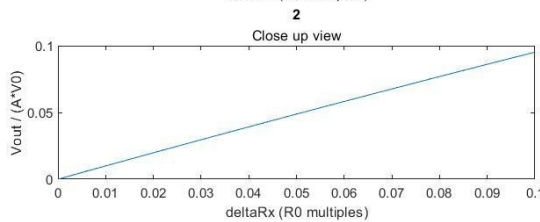
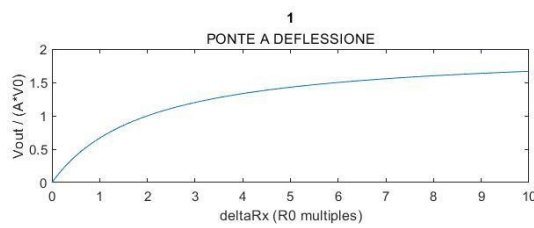
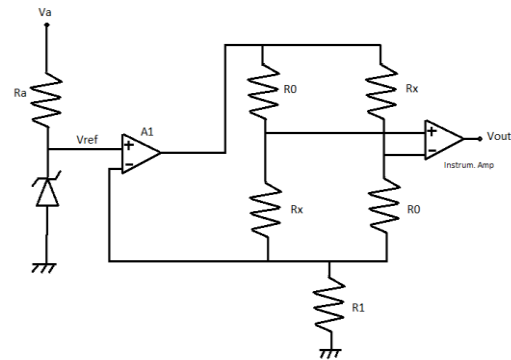
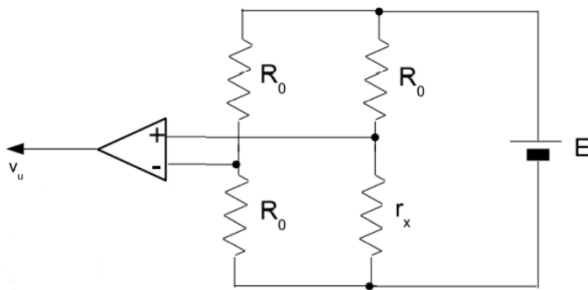
Un'altra distinzione elettronica è tra passivi ed attivi, i primi necessitano di un circuito che produca potenza elettrica per funzionare e dare una misura sensibile, i secondi invece la producono da sé, è spesso necessario un sistema di amplificazione in quanto questa è generalmente molto piccola. Un esempio di sensore attivo è la cella fotovoltaica che converte una potenza entrante, data dalla radiazione luminosa, in una potenza uscente proporzionale senza bisogno di circuiti di alimentazione esterni; o anche le celle di carico piezoelettriche che ad uno sforzo meccanico rispondono generando una ddp.

Classificazioni molto più specifiche possono essere la divisione per principio fisico di interazione tra elemento sensibile e analita, per il modo in cui lo strato sensibile è fisicamente legato al trasduttore (legame chimico, elettropolimerizzazione, adsorbimento, deposizione in fase vapore o incorporato in una struttura con membrana); per il tipo di elettrodi utilizzati se presenti (monouso, riutilizzabili, convenzionali, funzionalizzati,...); per il tipo di risposta analitica (qualitativa, semi-qualitativa o quantitativa); per la tecnica di elaborazione dei dati; per ambiente destinatario di utilizzo; per tecnica di realizzazione nel caso di sensori miniaturizzati (*screen printing* o microelettronica) e così via.

3. MISURA DELLA CONDUCIBILITA'

Per essere utile il sensore conducimetrico deve essere nelle condizioni di produrre una tensione proporzionale alla conducibilità del campione analizzato senza tanto interesse nel suo valore assoluto quanto nella sua variazione, i circuiti di condizionamento in grado di fare tale conversione sono progettati per leggere la resistenza di un carico comparandola ad altre note e possono dividersi in due categorie in base al tipo di corrente in cui opera il dispositivo: continua (DC) o alternata (AC), nel primo caso la misura è definita di resistenza, nell'altro di impedenza; effettuando l'inversione si ottengono conducibilità e ammettenza, entrambe misurate in Siemens (S).

I setup più semplici ed efficaci sono il ponte di wheatstone e le sue varianti, in figura riportati a sinistra il diagramma circuitale di un ponte a deflessione, con relazione lineare per piccoli scostamenti di R_x ; a destra invece una sua variante che fornisce una relazione lineare ma sensibilmente più complessa da realizzare.



Uno dei vantaggi dei circuiti sopracitati è la presenza di più resistori con cui poter facilmente implementare una compensazione di temperatura, prima fonte di disturbo della misura essendovi la resistenza proporzionale.

Nel caso dei sensori conducimetrici l'elemento sensibile è comunemente paragonabile ad un resistore, questo da un particolare vantaggio perché il comportamento è uguale sia in corrente alternata che continua e nella maggior parte dei casi permette di usare gli stessi circuiti di condizionamento.

4. ANALISI DEL RESPIRO

L'aria inalata ed esalata differiscono per composizione, analizzandone le differenze si può ricondursi ai processi metabolici avvenuti nei polmoni.

In seguito, una schematizzazione dei principali gas componenti del respiro in percentuali di volume con relativi differenziali.

SOSTANZA	ARIA ATMOSFERICA	ARIA ESALATA	Delta
Azoto (N)	78%	79%	1%
Ossigeno (O ₂)	20.95%	13.6-16%	4.95- 7.35%
Anidride carbonica (CO ₂)	• (400ppm)	4.0-5.3%	4.0-5.3%
Vapore acqueo (H ₂ O(v))	1%	5.0-6.3%	4.0-5.3%
Argon (Ar)	• (9340ppm)	1%	1%

Altre sostanze presenti in ridotta presenza includono ione ammonio, monossido di carbonio, idrogeno e componenti organici volatili (VOCs) come isoprene e acetone particolarmente utili come markers per diagnostica medica; riguardo a quest'ultimi, sono degni di nota recenti studi che indicano come il profilo di composizioni dei VOCs nel respiro possa essere collegato a patologie quali tumori nelle vie respiratorie o nel tratto digerente. Il gold standard per la misura di queste componenti sono spettroscopia di massa e cromatografia, queste purtroppo oltre agli svantaggi già citati richiedono che il campione d'aria sia pre-concentrato e pre-disidratato il che rende impossibile un monitoraggio diretto. Viene quindi preferita una tecnica alternativa: la spettroscopia per mobilità ionica in cui la separazione delle molecole avviene per differenza di mobilità molecolare, questa risulta più economica e facile da miniaturizzare oltre che non richiedere pre-elaborazioni particolari del campione.

L'aria esalata porta inoltre micro gocce (*droplets*) di condensa contenenti in sospensione biomarkers non volatili come proteine.

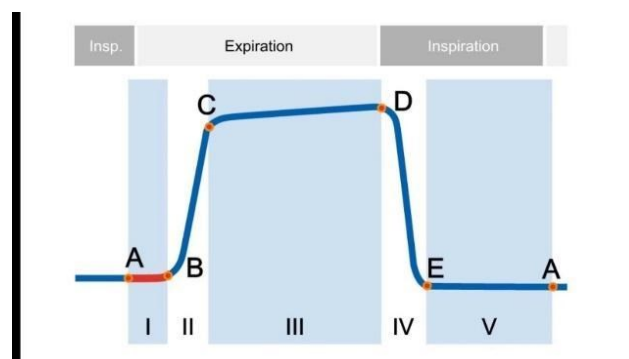
4.1 MISURA DI ANIDRIDE CARBONICA

L'anidride carbonica (CO_2) è prodotta dal nostro corpo come residuo di scarto dell'attività metabolica dei tessuti, perlopiù muscolare, assieme all'ossigeno costituiscono i due gas disciolti nel sangue; la sua concentrazione è regolata dai reni che possono aumentare o ridurre gli ioni carbonati nel plasma e dal bulbo ventrale, area del cervello adibita al controllo della frequenza del ciclo respiratorio. Se la CO_2 dovesse essere in eccesso dei chemorecettori periferici verrebbero attivati segnalando il disequilibrio al bulbo che per compensare aumenterà la frequenza respiratoria.

La pressione parziale di CO_2 (pCO_2) è mantenuta pressoché costante dai meccanismi a feedback sopracitati; oltre la normale soglia (35-45 mmHg) vengono anche stimolati i chemorecettori dei glomi carotidei e aortici (ipercapnia) e si avranno sintomi come tachicardia, extrasistoli, dispnea, arrossamento della pelle, spasmi muscolari, aumento della pressione sanguigna, mal di testa, stato confusionale, letargia, fino ad arrivare a iperventilazione e disorientamento e perdita di coscienza.

La CO_2 è un fattore di stress esogeno, quindi un importante parametro per la qualità dell'aria in ambienti chiusi (e.g. aule, auto, uffici): alte concentrazioni in ambienti piccoli o sovraffollati sono state indicate come possibile contributo all'aumento di sindrome da "morte in culla" o *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS).

La capnometria fornisce la visualizzazione numerica delle concentrazioni di anidride carbonica espirata ed inalata tracciata nel tempo (Capnografia). Ne esistono anche versioni colorimetriche che danno un'indicazione più sommaria della presenza di CO_2 .



In figura una capnografia, tempo sulle ascisse e pCO_2 sulle ordinate. Importante precisare che la misura che si prende come riferimento è il valore nel punto D, alla fine del plateau, detta end-tidal pCO_2 (petCO_2) sperimentalmente dimostrata essere simile alla paCO_2 .

I metodi di acquisizione tradizionali sono due: *mainstream* in cui il sensore è interno al circuito di un ventilatore e *sidestream* in cui abbiamo una linea secondaria apposta composta da una cannula con il sensore alla fine, questa è la meno invasiva e più applicata. La prima ha come vantaggio i tempi di risposta del sensore inferiori di qualche secondo ma rispetto alla seconda il paziente deve essere per forza intubato.

Le tecniche di spettroscopia a raggi infrarossi (FT-IR) sono il gold standard per la misura delle concentrazioni di acidi carbonici gassosi ma risentono anch'esse dei limiti sopracitati.

4.1.1 Sensori conduttimetrici in liquido

L'anidride carbonica disciolta in soluzione acquosa alza il pH e genera acido carbonico ($\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})$) che dissocia in ioni bicarbonato ($\text{HCO}_3^-(\text{aq})$) e carbonato ($\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$) responsabili di un cambio di conduttività.

Le reazioni sono:

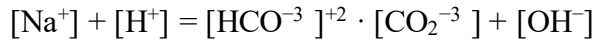


Con k_i valutati a 25°C

Il sensore è di semplicissima realizzazione e funzionamento: è composto da una camera riempita di acqua distillata alle cui estremità sono posti due elettrodi, la camera può scambiare ioni attraverso una membrana CO_2 permeabile direttamente in contatto con la soluzione liquida o gassosa da misurare. Applicando una ddp tra i due elettrodi e misurando quanta corrente passa si avrà una stima della conducibilità da cui si può facilmente ricavare quanti ioni in generale sono disciolti in soluzione, essendo la membrana permeabile solo alla CO_2 avrò un'indicazione corrispondente alla sua concentrazione, con conducibilità nulla in assenza di essa.

I tempi di risposta sono dell'ordine dei secondi, dipendenti perlopiù dai tempi di diffusione e in modo trascurabile dalle cinetiche di reazione.

Al posto dell'acqua distillata si può mettere una soluzione elettrolitica (solitamente Bicarbonato di Sodio NaHCO_3), la reazione sarà:



che può essere espressa in funzione della $p\text{CO}_2$ con la concentrazione del bicarbonato come parametro.

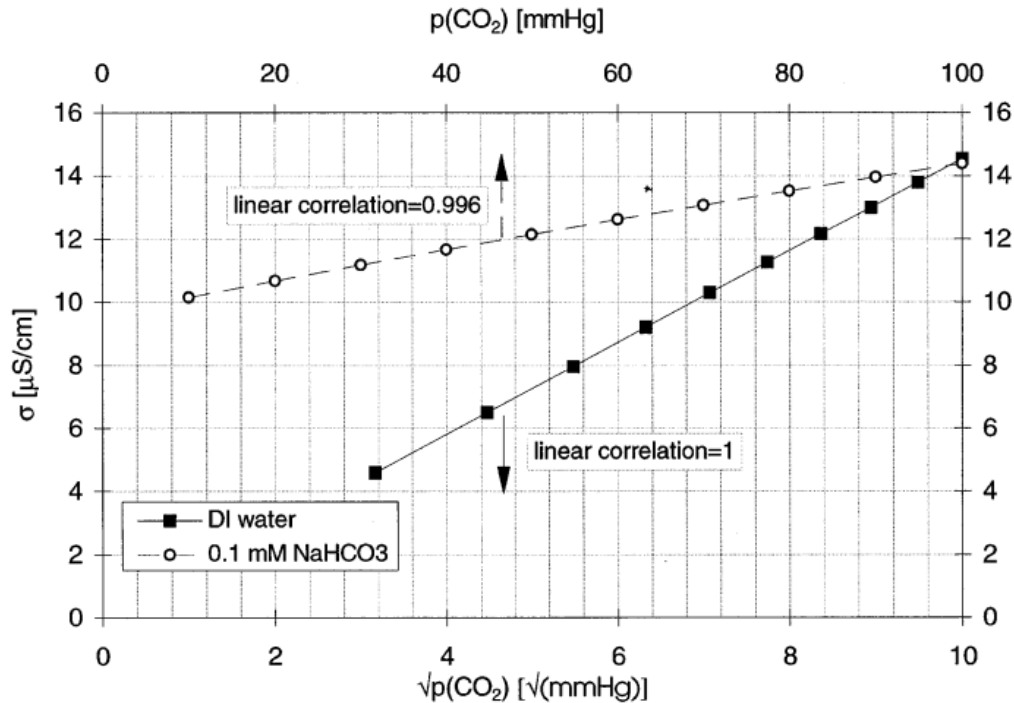


Figura 1: andamento delle sensibilità nel caso di sensore riempito di acqua deionizzata (DI) e soluzione 0.1mM di bicarbonato.

Si è notato sperimentalmente che la sensibilità cala aumentando la concentrazione della soluzione fino ad arrivare al punto che aumenti della $p\text{CO}_2$ non portino più ad un incremento della conducibilità, ma addirittura talvolta a una sua riduzione. La spiegazione di questo fenomeno è legata alla riduzione di idrogenioni e ossidrilioni, principali ioni mobili, che avviene quando in soluzione sono presenti alte concentrazioni di elettrolita libere di reagire.

Importante applicare ai due capi una tensione variabile per evitare il fenomeno della polarizzazione: le molecole cariche non starebbero più in soluzione disponibili a condurre ma andrebbero ad attaccarsi agli elettrodi saturando il sensore immediatamente.

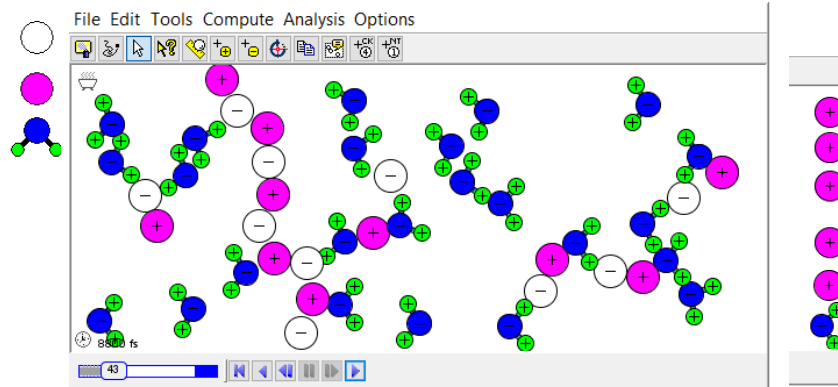


Figura 2: un esempio realizzato con un simulatore (Molecular Workbench V3.0) dell'effetto polarizzazione di una soluzione di H₂O e NaCl. In alto la tensione applicata è continua, in basso è alternata.

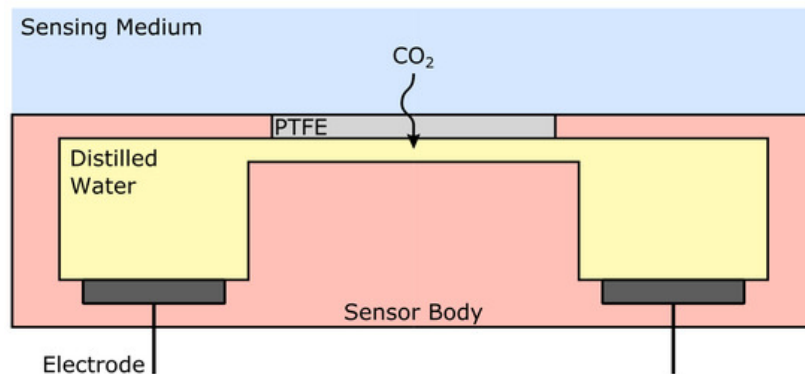


Figura 3: schema di funzionamento di un sensore condometrico il liquido

Questo sensore è in grado di misurare concentrazioni di qualsiasi molecola fintanto che questa sia uno ione, o un acido, e che la membrana di separazione sia permeabile al solo ione d'interesse. Una delle criticità è infatti la contaminazione dell'acqua di stillata con ioni non d'interesse che porta un drift, quantificato in circa 0.4%/h, e una cross-sensitivity; questo spesso accade quando vengono utilizzate colle o resine per assemblare il corpo del sensore o quando la membrana non è fissata in modo stagno. Altro problema è l'evaporazione di acqua attraverso la membrana (dry-out), soprattutto quando il sensore è interfacciato con un ambiente gassoso a bassa pressione di vapore; per questo

l'approccio è sconsigliato per misurare concentrazioni nel respiro ed è meglio adattabile per analizzare altri fluidi biologici. Inoltre è da verificare che la soluzione in esame sia sufficientemente diluita, certe molecole in alta concentrazione possono infatti avere altre interazioni tra loro modificando la relazione concentrazione-conducibilità spostandola dalla linearità.

In figura 3 l'effetto sopracitato: nel caso di alte concentrazioni di acido solforico (H₂SO₄) la relazione non è più lineare, determinare la concentrazione diventa molto più difficile con il sensore conducimetrico.

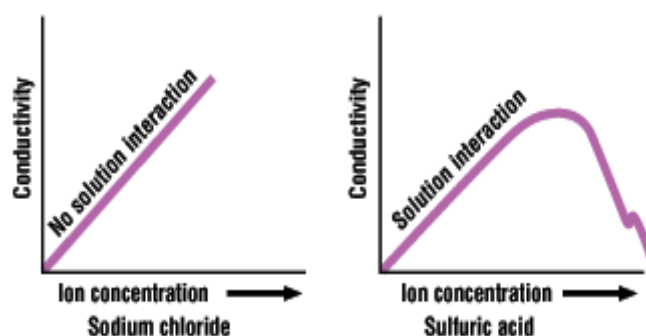


Figura 3: andamento delle conducibilità nel caso di Cloruro di Sodio (Sodium Chloride) e Acido Solforico (Sulfuric Acid)

Particolare attenzione va data alla temperatura, la conducibilità infatti vi è proporzionale secondo:

$$G_t = G_{t_0}[1+a(t-t_0)]$$

Dove:

G_t = conducibilità alla temperatura t in $^{\circ}\text{C}$

G_{t_0} = conducibilità alla temperatura di riferimento t_0

a = coefficiente di temperatura della soluzione alla temperatura di riferimento

Questo tipo di sensore è infatti spesso accoppiato con un termistore che misura la temperatura della soluzione ed un algoritmo di compensazione calcola la concentrazione corretta.

4.2 MISURA DI OSSIDO NITRICO

L'ossido nitrico (NO) è una molecola segnale pleiotropica partecipe nei processi biologici più disparati, la sua efficacia dipende fortemente dalla quantità, basse concentrazioni

provocano infatti utili effetti mentre alte dosi concorrono a patologie ed effetti anche mortali.

Nel sistema cardiocircolatorio provoca il rilassamento dei muscoli vascolari lisci, un effetto vasodilatatore che riduce la pressione e aumenta l'irrorazione di sangue; farmaci precursori del NO come la nitroglicerina e nitrato di amile vengono somministrati per trattare episodi di Angina, dolori al petto da carente afflusso di ossigeno coronarico.

Nell'encefalo gli effetti del NO sono neuroprotettivi a basse concentrazioni, la molecola agisce anche da neurotrasmettitore retrogrado nelle sinapsi, ma in sufficienti concentrazioni reagisce con ioni superossido (O_2^-) a formare il gas perossinitrito, altamente citotossico e volatile, la cui presenza nel cervello è collegata agli effetti neurodegenerativi di demenza senile e Alzheimer.

Ha anche un ruolo nel sistema immunitario, i macrofagi infatti producono gas NO e lo rilasciano per stimolare la morte di batteri, parassiti intracellulari (come Leishmania e malaria) e cellule tumorali (apoptosi).

Un ruolo importante e sfruttato in clinica è la proprietà dell'ossido nitrico di essere un segnale della presenza di infiammazioni, esso infatti, antinfiammatorio naturale in individui sani, tende a cronicizzare le ferite aumentando lo stress ossidativo dei tessuti danneggiati.

Nell'apparato gastrointestinale è indice di patologie croniche quali morbo di Chron e rettocolite ulcerosa, inoltre la concentrazione di NO esalata dal paziente è usata come biomarker per patologie infiammatorie dei polmoni quali bronchite, asma e secondo recenti studi anche per i postumi infiammatori di pazienti COVID-19.

La molecola è composta a un azoto e un ossigeno legati da doppio legame, l'azoto ha 6 elettroni di valenza il che rende particolarmente reattiva la particella, proprietà che riduce il suo raggio di azione poiché ha emivita stimata tra 1 e 10 s.

Le tecniche più comuni per la misura della concentrazione di NO gassoso si basano sui principi della spettroscopia ad assorbimento, molto efficienti e miniaturizzati al punto di essere portatili.

Sono comunque degni di nota nuovi tipi di sensori basati su principi elettrochimici, il NO è infatti altamente pronò ad essere sia ossidato che ridotto rendendo questo tipo di sensori altamente efficienti. Delle due reazioni l'elettro ossidazione è la preferita, la riduzione è

possibile ma succube di maggiori interferenze in ambiente biologico dovute perlopiù a pH, ossigeno libero disciolto, e biomolecole contenenti gruppi heme.

4.2.1 Sensori ad adsorbimento a base di Ossidi metallici

I sensori di gas a base di ossidi-metallici semiconduttori sono uno dei gruppi più studiati, le loro caratteristiche comuni sono: semplicità d'uso, ampio spettro di gas attivi, bassissimo costo di produzione e flessibilità di utilizzo. La ricerca mostra come, in presenza di determinate sostanze, sulle superfici di questi materiali avvengono reazioni reversibili che ne alterano la conducibilità rendendoli perfetti per lo scopo, questi infatti hanno anche un'ottima sensibilità definita come rapporto tra resistenza del materiale in contatto con il gas bersaglio R_g e la resistenza dello stesso in contatto con un gas di riferimento R_a , solitamente aria.

$$S = R_g/R_a.$$

Questo importante parametro dipende da diversi fattori quali le proprietà naturali del materiale scelto per il sensore, la superficie di interfaccia e le microstrutture su di essa, eventuali agenti inquinanti o presenza di altri atomi elettrone-donatori specificatamente scelti nel reticolo cristallino, quest'ultimo caso infatti è ottenuto via drogaggio del materiale semiconduttore, un processo che sperimentalmente ha dimostrato essere decisivo per la realizzazione di sensori gas-specifici ed altamente sensibili.

Dei 18 ossidi metallici che mostrano conducibilità gas-dipendente sono meno favoriti i metalli di transizione in quanto la differenza tra diversi livelli della loro configurazione elettronica (d^n e d^{n+1}) è spesso molto piccola, essi infatti possono mutare in diversi tipi di ossidi metallici, questa instabilità li rende inadatti allo scopo di misure precise.

I metalli di pre-transizione vengono anch'essi messi da parte, i gap energetici sono troppo grandi perché ci siano elettroni liberi o lacune disponibili alla conduzione, sono quindi inerti. Rimangono gli ossidi metallici a base metallo di post-transizione, di questi le configurazioni preferite sono la d^0 presente in TiO_2 , V_2O_5 , WO_3 e d^{10} propria di ZnO e SnO_2 . Attenzione che se i materiali scartati sopra non sono idonei ad essere usati come ossidi metallici sensibili vengono comunque utilizzati con successo insieme ad essi nella

creazione di materiali compositi ternari o quaternari che in certi casi dimostrano migliori qualità.

Aggiungere altri materiali alla lega di ossido metallico è infatti uno dei modi per migliorare sensibilità e specificità del sensore; un metodo molto utilizzato è il drogaggio del materiale, le reazioni di ossido-riduzione possono essere infatti facilitate dalla presenza di atomi elettro-donatori o elettron-attrattori nel reticolo cristallino dell'ossido. Tra questi composti spicca l'ossido di Zinco (ZnO), un semiconduttore di tipo n largamente utilizzato per sensori di gas, questo quando drogato con atomi specifici varia il suo spettro di sensibilità ad esempio con atomi del terzo gruppo (numero di ossidazione +3) diventa più sensibile alle CO_x (CO₂ e CO).

Un caso particolare per la sua valenza come biosensore è il composto ternario AlMgZnO (5Al1MgZnO). Un interessante esempio è presentato nello specifico da Jaballah et al, 2021: una polvere di ZnO drogato Al e Mg viene stesa via stampa serigrafica (*screen printing*) su una lamina di allumina fornita di una coppia di elettrodi interdigitati ed un elemento riscaldante in platino utile sia come termocoppia per scaldare il sensore che come termoresistore per misurarne la temperatura. Questo mostra ottime caratteristiche metrologiche, può operare tra i 200°C e i 400°C ma alla media temperatura di 250-300 gradi da un ottimo compromesso tra sensibilità e velocità mostrando di poter registrare la minima quantità (*Limit of Detection*, LOD) di 500 ppb di CO e 200 ppm di CO₂ con tempi di risposta e recupero nell'ordine delle decine di secondi.

Altri modi per migliorare la sensibilità sono l'utilizzo nel sensore di metalli nobili che facciano da catalizzatori per l'ossido-riduzione e l'irradiazione con raggi ultravioletti, un esempio è il sensore a base di nano-pellicole di Au-ZnO che ha registrato la risposta di 13 a 10 ppm di NO a temperatura ambiente e sotto UV, un accettabile risultato per la sensibilità ma debole per altri parametri quali tempi di risposta e recupero, rivelatosi molto lunghi, oltre che alti costo e difficoltà di produzione: le pellicole sono create via Atomic Layer Deposition (ALD).

L'utilizzo del ZnO è principe anche di un altro interessante esperimento in cui invece della modifica nella composizione del materiale si è optato per l'intervento sulla morfologia della superficie di contatto: Li et al. hanno sviluppato un sensore superficialmente caratterizzato da nanotubi biomorfi di ossido di zinco (più precisamente ZnO-6), la tecnica è stata utilizzare una biomassa di corteccia di Cajuput, strutturalmente

molto fibrosa, come stampo per costruire abbondanti microtubi; come mostrato in figura alla temperatura di 92°C il LOD è un notevole 100 ppb, la risposta è massima pari a $S = 118$: le cinematiche di adsorbimento e desorbimento delle molecole di NO sono in equilibrio, temperature maggiori favoriscono il desorbimento e viceversa.

Il riferimento ZnO-6 e ZnO-0 indica la conformazione del reticolo, la favorita è quindi la prima, ottaedrica.

I parametri metrologici dinamici sono anch'essi ottimi 162s il tempo di salita, 52s il tempo di discesa che paragonati ai 492 s e 336 s rispettivamente dei sensori a base di puri TiO₂ e ZnO è un enorme passo avanti anche senza considerare che quest'ultimi richiedono temperature d'esercizio nell'ordine dei 300-350°C.

Questi vantaggi energetici garantiscono al sensore una richiesta di potenza inferiore, facilitando quindi l'integrazione con l'elettronica di dispositivi più piccoli, potenzialmente aumentando anche stabilità e vita operativa rispetto alle controparti. La relazione tra valori di risposta e concentrazioni in ppm di NO è di tipo approssimativamente lineare

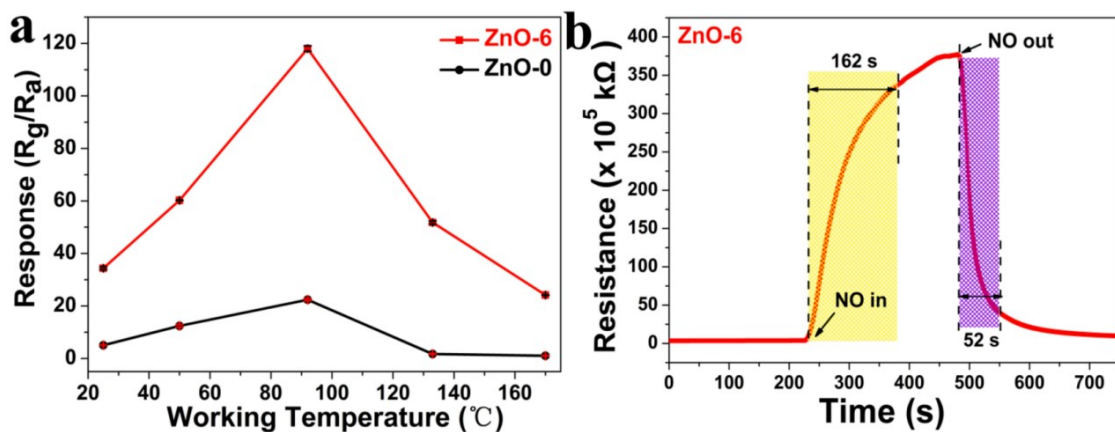


Figura 1: andamento della risposta, o sensibilità (sx), diagramma dei tempi di risposta e recupero (dx)

Altro importante parametro da verificare è la specificità del sensore per evitare effetti di falso-positivo, sono stati condotti test con ottimi risultati, l'esposizione del sensore a composti organici volatili (VOCs) e gas inorganici ha dato risposte tra 1 e 2.4 a 92°, nettamente inferiori all'ossido nitrico; il coefficiente di selettività $K_{ab} = S_{no}/S_{altro\ gas}$ si attesta tra 35.5 e 82.6.

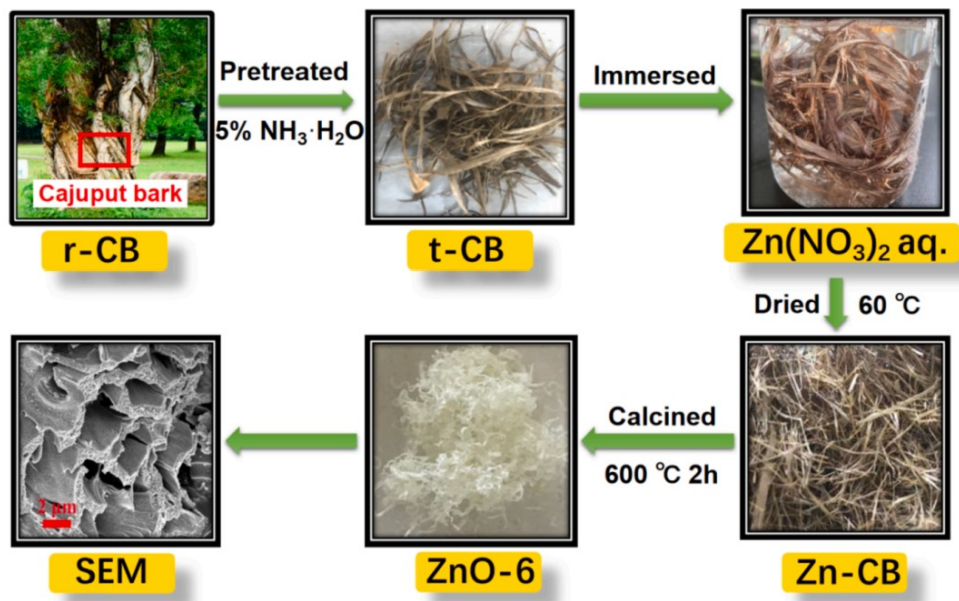


Figura 2: schema del processo produttivo del sopracitato sensore a bio-nanotubi di Ossido di Zinco.

5. ANALISI DEL SUDORE

Il sudore è un fluido biologico particolarmente interessante, che contiene un ricco carnet di elettroliti, metaboliti, micronutrienti, ormoni, proteine che possono essere analizzati in modo totalmente non invasivo. Un interesse crescente è stato mostrato nell'ultimo decade con svariati lavori dedicati alla progettazione e fabbricazione di sensori cutanei per rilevare le modifiche e leggerne i cambiamenti fisiologici in campo militare, sportivo e diagnostico.

E' un fluido trasparente incolore, leggermente acido (6.3 pH) e ipotonico (62-192 mosm/kg) ottimo candidato per il campionamento non invasivo; a differenza di altre tecniche di diagnostica basate ad esempio sul prelievo di sangue, questo è veloce da estrarre e relativamente economico.

La funzione di questo fluido è perlopiù termoregolatrice ma agisce anche da via escretoria (circa il 30% degli scarti del corpo sono espulsi attraverso di esso) e, nel passato, aveva funzione di riconoscimento olfattivo di specie e sesso.

Le unità che producono il sudore sono le ghiandole sudoripare, di tipo eccrino sono le più diffuse sulla pelle del corpo (circa 2-5 milioni in maschio adulto) con picchi di densità su mani e piedi; espellono sudore inodore in modo costante attraverso i pori sulla superficie della pelle e prendono il nome dal tipo di secrezione che operano: la secrezione eccrina utilizza solo il trasporto attivo e la diffusione.

Le ghiandole apocrine invece sono presenti solo nelle zone genitali e nelle ascelle, la secrezione avviene attraverso vescicole direttamente nel bulbo pilifero, la loro attività inizia solo nel periodo di pubertà dell'individuo.

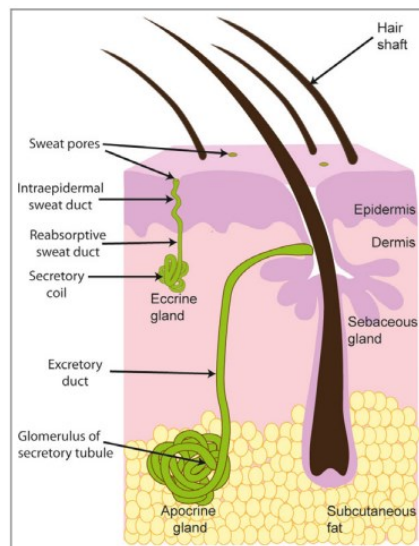


Figura 1: rappresentazione della struttura dell'epidermide non glabra con evidente morfologia delle due tipologie di ghiandole sudoripare.

In tabella sono indicati i ranges di concentrazioni dei 4 ioni, espresse in mmol/l, più presenti nel sudore comparati con gli analoghi nel liquido interstiziale, da notare la somiglianza non casuale in quanto il primo è un diretto prodotto del secondo.

	SUDORE (mM)	LIQUIDO INTERSTIZIALE (mM)
Sodio Na ⁺	10-90	136-145
Potassio K ⁺	2-8	3.5-5.5
Cloro Cl ⁻	10-90	~105
Calcio	0.2-2	8.4-10.5

pH	6.3	7.35-7.45
----	-----	-----------

Importante citare la presenza di biomolecole organiche quali Lattato 5-40 mM, Urea 4-12 mM, anticorpi, proteine (dermdicina (DCD) e la *Prolactine Inducible Protein* (PIP) sono studiate come biomarkers di neoplasie al seno e alla prostata), citokine, amminoacidi, enzimi e farmaci esogeni; la stretta correlazione tra sudore, liquido interstiziale e plasma lo rende infatti un ottimo fluido per test antidroga e antidoping.

Altri derivati del plasma sono Etanolo 2-30 mM (utile per la stima della quantità di alcool ingerito), Ammonia 1-8 mM, Bicarbonato 0.5-5 mM e per ultimo ma tutt'altro che irrilevante il Glucosio 0.01-0.2 miglior segnale per la diagnostica del diabete.

Altre componenti minori in quantità ma non importanza sono metalli quali Zinco 0.1-20 uM, Piombo 0.2-0.6 uM, Ferro 0.1-30 uM e Rame 5-20 uM, la concentrazione di quest'ultimo è simile a quella del rame nell'urina, può infatti essere utilizzato come biomarker per patologie e disfunzioni renali.

La raccolta dei campioni di sudore può avvenire sfruttando le meccaniche della **microfluidica** cioè la manipolazione di liquidi in canali sub-millimetrici con micro

valvole e micropompe che regolano ogni flusso, tecnica molto utilizzata nei dispositivi indossabili adesivi, o più tradizionalmente con l'utilizzo di **garze assorbenti** affette da problemi come evaporazione e alterazione del campione, irritazioni cutanee nel paziente e pericolo di trasmissione di malattie infettive per contatto con fluido infetto. Nonostante siano state sviluppate particolari garze che riducono l'effetto irritante il problema principale rimane l'alta evaporazione, questa infatti rende difficile la corretta normalizzazione delle concentrazioni. Per ovviare a questo problema è in via di studio il concetto di "standard interno": una normalizzazione delle concentrazioni non rispetto al volume di soluzione ma rispetto ad un componente molto presente quale può essere il Sodio o il Potassio, tuttavia questa metodologia non è ancora stata approvata per l'utilizzo diagnostico.



Figura 2: prelievo di sudore con il metodo Gibson-Cooke

L'analisi del campione viene effettuata tradizionalmente con analizzatori a base elettrochimica (potenziometrici, conduttimetrici), ottica (colorimetrici) o osmotica. Il gold standard per la misura rimane la spettroscopia (MS) di massa accoppiata con cromatografia liquida e gassosa (LC, GC).

Le maggiori problematiche nello sviluppo di sensori di questo tipo sono la necessità di alta sensibilità, infatti le concentrazioni dei biomarkers nel sudore sono molto ridotte rispetto alle stesse nel sangue (Glucosio nel sangue 3.3-17.3 mM mentre nel sudore 0.06-0.2 mM, circa 100 volte inferiore), la necessità di alta selettività e reiezione di disturbi derivati dalle contaminazioni della pelle (cellule morte, sebo), l'influenza di pH e temperatura sull'accuratezza delle misure e la discontinuità e variabilità del flusso di

sudorazione, questo infatti oltre che essere variabile in modo soggettivo, non è assolutamente costante. Le ghiandole sudoripare hanno attività intermittente controllata dal sistema nervoso parasimpatico, occorrono quindi sistemi che possano stimolare la sudorazione quando questa è insufficiente, un esempio è il GlucoWatch che utilizzava la ionoforesi inversa per stimolare le ghiandole nel derma.

La ricerca spinge sui dispositivi indossabili che effettuino l'analisi del campione ed misurino in contemporanea il flusso perspirato. Come il sensore indossabile sviluppato da Choi et al., un dispositivo che utilizza la microfluidica per canalizzare il sudore in due tunnel rigidi con del colorante, il primo tunnel misura il flusso di sudore, riempiendosi il colorante viene spostato lungo il tunnel disegnandone la forma che rimarrà impressa anche a sensore asciutto; l'altro invece utilizza un colorante che reagisce al cloro e svolge l'analisi colorimetrica della concentrazione. Questo semplice dispositivo viene attaccato alla pelle del soggetto e permette una misura rapida e qualitativa, apparecchi più complessi sono equipaggiati con sensori elettrochimici, per misure quantitative più precise, valvole per il controllo dei micro-flussi (*Digital Volume Dispensing Systems DVDS*) e moduli di comunicazione ed alimentazione wireless NFC.

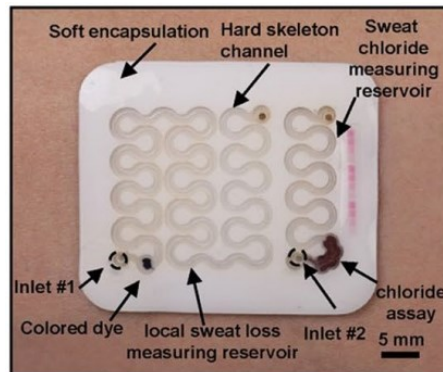


Figura 1: schema di un sensore colorimetrico adesivo per misurazioni del cloro nel sudore.

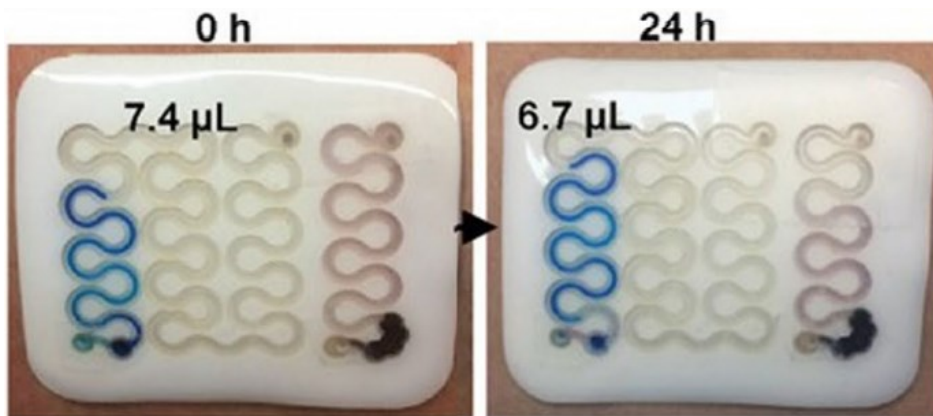


Figura 2: sensore per cloro nel sudore in funzione, da notare l'effetto di accumulo di campione e "memoria" del risultato.

5.1 MISURA DI GLUCOSIO

La glicemia, quantità di glucosio (GLU) nel sangue, è il primo parametro per la diagnosi delle patologie legate al diabete.

In pazienti sani le riserve energetiche del corpo sono sotto forma di lipidi o grosse macromolecole come il glicogeno conservato nel fegato, acidi grassi e trigliceridi. Gli ormoni insulina e glucagone competono il primo per l'accumulo di glucosio nei tessuti togliendolo dal sangue, il secondo per la degradazione delle molecole riserva e il rilascio nella circolazione. L'azione di questi due combinata regola la glicemia; il primo è più attivo quando il sangue tende a una condizione iperglicemica ed è richiesto di togliere zucchero dal sangue immagazzinandolo altrove, viceversa il secondo quando la tendenza è ipoglicemica e i tessuti sono in affanno da carenza di glucosio.

In pazienti sani l'insulina agisce direttamente solo nei tessuti preposti con recettori adatti: fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo; nel fegato stimola la glicogenesi (produzione di glicogeno a partire da monomeri di GLU), la creazione di acidi grassi, l'assorbimento di glucosio dal sangue e la glicolisi (secondo step della respirazione cellulare). Nei muscoli scheletrici agisce stimolando il trasporto di proteine trasportatrici per il glucosio (GLUT4) dalle vescicole alle pareti cellulari aumentando il flusso all'interno della cellula del GLU che sarà usato per la produzione di ATP. Le rimanenze di glucosio nel sangue una volta saturati muscoli e fegato vengono convertite dal tessuto adiposo e dal fegato stesso in trigliceridi e acidi grassi come riserve di energia.

Il diabete è una patologia cronica strettamente legata all'ormone anabolico insulina, scaturita dall'incapacità del pancreas di secernere quantità sufficienti o dalla difficoltà dei tessuti nel utilizzarla efficacemente.

La patologia diabetica viene classificata in due tipi, diabete di tipo 1 e di tipo 2.

Il diabete di tipo 1 è di origine genetica, ed è caratterizzato da una produzione irrisoria o nulla di insulina nel pancreas: le unità che la secernono, cellule beta pancreatiche, subiscono infatti una distruzione autoimmune. I pazienti sono detti insulina-dipendenti e necessitano di supplementi esogeni per vivere, perlopiù insulina bovina, in quanto i loro livelli di glucosio nel sangue a digiuno (8h dopo i pasti) sono superiori a 7 mmol/l (126 mg/dl). Paradossalmente, in questa condizione, muscoli e tessuti si trovano privi di zuccheri da consumare e li rimpiazzano con la degradazione di muscolo e lipidi, processo che porta ad una pericolosa acidizzazione del sangue (ketoacidosi).

Il diabete di tipo 2, soggetti non insulina-dipendenti, dipende dalla resistenza dei tessuti ad assorbire il glucosio che rimane nel sangue, condizione risultante solitamente da uno stile di vita inattivo e una dieta sbilanciata: la resistenza al glucosio è infatti favorita da alte percentuali di grasso corporeo e muscolatura debole. Nelle prime fasi della malattia il pancreas reagisce all'iperglicemia producendo più insulina per compensarne l'inefficacia, successivamente anche l'attività pancreatica diminuisce peggiorando ulteriormente la condizione.

I test comunemente eseguiti sono tre: a digiuno, dopo pasto e il test della tolleranza al glucosio. Il primo è eseguito campionando il soggetto 8 ore dopo l'ultimo pasto, il secondo non richiede digiuno, il terzo viene eseguito somministrando liquidi contenenti glucosio e verificando quanto ne entra in circolo nel sangue circa 2 ore dopo. Segue una tabella con riportati i valori misurabili in ogni test e l'indicazione diagnostica relativa.

	Test a digiuno	Test resistenza al glucosio	Test non a digiuno
Diabete	> 126 mg/dl	> 200 mg/dl	> 200 mg/dl
Pre-diabete	100-125 mg/dl	140-199 mg/dl	nd
Normale	< 99 mg/dl	< 140 mg/dl	nd

La fascia di popolazione con valori intermedi tra sano e patologico è quella più a rischio, detto Pre-Diabete, è il gruppo target delle campagne di prevenzione; questi sono infatti soggetti a rischio e spesso basta un cambio di stile di vita per riportarli nella fascia di sicurezza.

Le persone con questi valori intermedi soffrono generalmente di due patologie: la Bassa Tolleranza al Glucosio (*Impaired Glucose Tolerance*, IGT) è diagnosticata quando 2 ore dopo l'assunzione di 75g di GLU per via orale la glicemia è assestata su 7,8-11.0 mM/l, l'Alterata Glicemia a Digiuno (*Impaired Fasting Glycemia*, IFG) scaturisce dalla presenza di uno strato di grasso che blocca l'insulina dal raggiungere le cellule, la glicemia rimane alta anche a digiuno, con valori tra 5.9 mM/l - 6.9 mM/l (100-125 mg/dl). Importantissimo quindi sia per la prevenzione che per la terapia e il controllo riuscire a misurare accuratamente la glicemia; iperglicemia e ipoglicemia sono infatti condizioni

dannose per l'organismo, con la seconda fattore di alto rischio, il cervello infatti può resistere in carenza di glucosio per pochi minuti prima di subire danni permanenti.

E' fondamentale per un paziente con controllo ormonale glicemico compromesso mantenere i propri parametri nei range di sicurezza, onde evitare le complicazioni patologiche sopracitate.

Il metodo di misura tradizionalmente più comune è il prelievo di sangue da una piccola perforazione sul dito (*finger pricking*), sull'avambraccio o sulla gamba; la ferita va tamponata con un'apposita strisciolina assorbente ricoperta di enzima Glucosio Ossidasi (GOx) che, inserita in un misuratore amperometrico sarà analizzata e fornirà il valore sul display. Un'altro metodo che è stato sviluppato è il Glucair, un analizzatore del fiato che rileva la presenza di acetone, questo è infatti collegato ai livelli di chetoni nel sangue (chetoacidosi) come conseguenza specifica del diabete di tipo 1 e tipo 2 grave. Questi metodi rimangono limitati a misure singole, conseguentemente nel corso di una giornata si potrà avere solo *snapshots* della situazione glicemica perdendo informazioni su eventuali picchi. La ricerca spinge quindi su metodi di monitoraggio continuo del glucosio (*Continuous Glucose Monitoring, CGM*) che siano poco invasivi ma mantengano la necessaria efficacia.

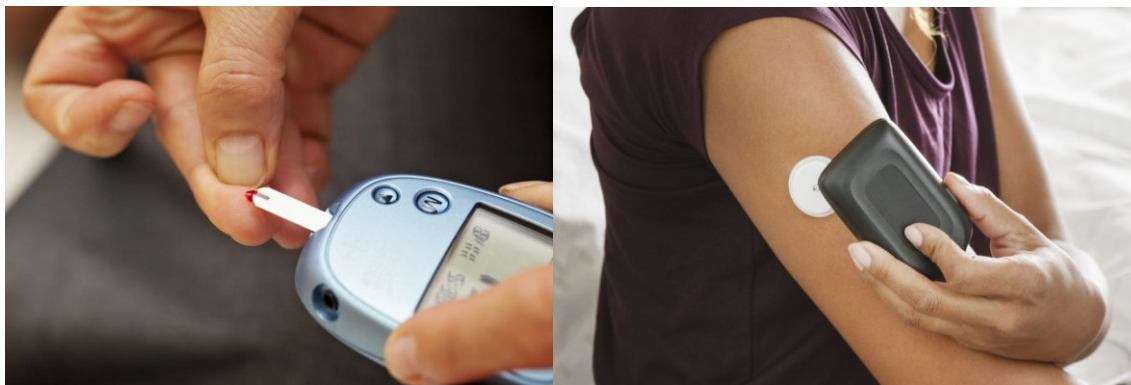


Figura 1: misuratore amperometrico di glucosio (sx), sensore sottocutaneo con tecnologia di comunicazione wireless (dx)

Già esistono validi sistemi di CGM commerciali attualmente in uso quali analizzatori sottocutanei impiantati, sistemi di prelievo periodico automatico del sangue attraverso microaghi; le complicazioni di questi rimangono l'alta invasività e il disagio causato al paziente oltre che agli alti costi e complessità di realizzazione.

La ricerca si sta focalizzando quindi su apparecchi indossabili a basso costo e minima invasività, che possano al contempo dare misure continue ed affidabili con bassi LOD e alta sensibilità, le concentrazioni di glucosio fuori dal sangue sono infatti ridotte; i fluidi più esplorati per questo scopo sono sudore e lacrime; la saliva è anch'essa utilizzabile ma scarsamente considerata per via delle inevitabili contaminazioni del campione.

Le categorie più promettenti di questi impianti sono i sensori elettrochimici, sensori per spettroscopia d'impedenza e ottici, interessante lavoro riguardo a quest'ultimi è la progettazione da parte di Google di lenti a contatto provviste di sensori colorimetrici per il glucosio con tecnologia di comunicazione ed alimentazione wireless.

Altra divisione possibile è tra sensori che utilizzano enzimi sulle loro superfici detti enzimatici (l'enzima di riferimento è la Glucosio ossidasi) e non enzimatici.

Nel seguito saranno trattati due sensori per l'analisi del glucosio in soluzione acquosa quindi abili sia al monitoraggio nel sudore che nella saliva.

5.1.1 Sensori di Glucosio a base enzimatica

Le nanostrutture (nanotubi e nanoparticelle) sono ampiamente utilizzate nei sensori per le loro proprietà soprattutto nei biosensori elettrochimici. Alcune configurazioni di materiali agiscono da catalizzatori elettrochimici per le reazioni amplificando i segnali elettrici prodotti, altre hanno siti di legame intrinseci per l'immobilizzazione di biomolecole enzimatiche o molecole marcatrici (*labels*) che rendono meno complessi i processi di fabbricazione e aumentano l'efficacia, altre ancora hanno addirittura capacità pseudo-enzimatiche e potenzialmente utilizzabili per sostituire gli enzimi naturali, tra questi sono degni di nota i *Single Atomic Site Catalists* (SASCs) tra cui i composti a base Fe-N-C che svolgono un'azione catalitica simile alle perossidasi.

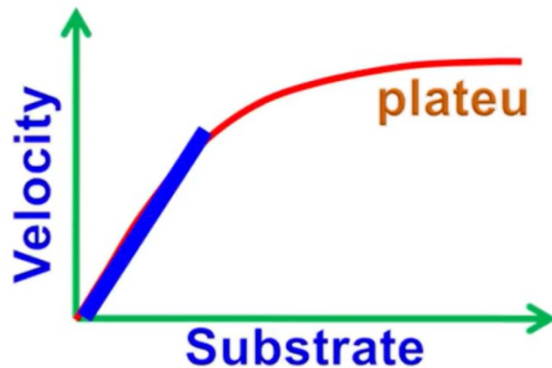
Uno dei problemi dei sensori enzimatici è infatti l'immobilizzazione di queste biomolecole sulle superfici, tradizionalmente avviene attraverso idrogel e stabilizzatori (ad esempio il siero albumina bovina) risultando comunque fragili e suscettibili a degradazione per pH e temperature troppo alti, oltre che molto costosi.

La ricerca spinge quindi sull'implementazione di materiali intelligenti (smart-materials) nano-strutturati che risolvano queste complicità, sarà in seguito presentato un sensore a base di nanoparticelle di Ossido di Indio unito all'enzima Glucosio Ossidasi che si è

dimostrato avere ottima sensibilità, durabilità e costo di realizzazione relativamente contenuto.

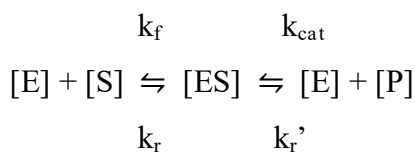
5.1.1.1 Cinetica enzimatica spiegata con il modello Michaelis-Menten

L'andamento della velocità di reazione in una reazione enzimatica:



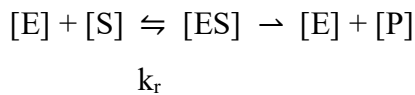
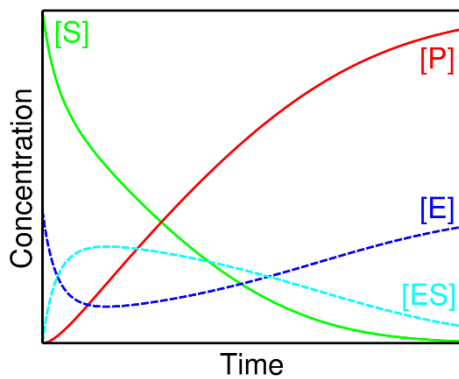
La velocità, definita come la quantità di prodotto ottenuta nell'unità di tempo ($V_0 = Pt$) segue un andamento approssimativamente direttamente proporzionale alla quantità di substrato quando questa è ristretta (prima parte del grafico evidenziata in blu, detta cinetica di primo ordine), si discosta poi dalla linearità all'aumentare del substrato oltre una certa soglia tendendo ad un valore limite (V_{max}) secondo un comportamento detto cinetica di ordine zero per questa indipendenza dalla disponibilità di substrato. Mentre una cinetica di primo ordine è modellabile dalla semplice $V(s) = k[S] + c$, la seconda parte è più complessa e richiede un'analisi più approfondita.

La cinetica delle reazioni enzimatiche è ben descritta dal modello sviluppato dai biochimici Lenor Michaelis e Maud Menten; data una tipica reazione enzimatica in cui un substrato (S) entra in contatto con un enzima affine (E) per produrre un prodotto (P) esiste degli step intermedio di legame enzima-substrato che determina la velocità di reazione, segue:



Con k_f e k_r costanti rispettivamente di formazione e dissociazione della prima reazione e k_{cat} costante catalitica (*turnover number*), cioè il numero di molecole di substrato trasformate in prodotto dall'enzima nell'unità di tempo quando l'enzima è saturo.

La reversibilità della seconda reazione è reale ma generalmente non considerata per ottenere una soluzione meglio trattabile, è comunque di valore trascurabile nei casi in cui la quantità di substrato sia molto maggiore della quantità di prodotto ($[S] \gg [P]$) o quando l'energia libera prodotta della reazione sia elevata ($G \gg 0$). Segue:



Definite le velocità di reazione:

- (1) $\frac{\delta[E]}{\delta t} = -k_f [E][S] + k_r [ES] + k_{cat} [ES]$
- (2) $\frac{\delta[S]}{\delta t} = -k_f [E][S] + k_r [ES]$
- (3) $\frac{\delta[ES]}{\delta t} = k_f [E][S] - k_r [ES] - k_{cat} [ES]$
- (4) $\frac{\delta[P]}{\delta t} = k_{cat} [ES] = V_0([ES])$ velocità di reazione, funzione di $[ES]$

In queste reazioni l'enzima agisce da catalizzatore e non viene degradato nel tempo, la sua concentrazione totale $[E_{tot}] (= [E]_0)$ rimane costante (dim. sommando eq. 1 e 3).

$$(5) \quad [E]_0 = [ES] + [E] = \text{cost}$$

Con $[E]$ enzima disponibile al legame con sito attivo vacante e $[ES]$ enzima legato.

Assumendo valida l'ipotesi di Briggs-Haldane di stato pseudo-stazionario secondo cui la concentrazione del complesso enzima-substrato [ES] rimane costante in quanto pari le velocità di formazione (Vf) e degradazione (Vb), vale l'eq:

$$(Vf =) k_f[E][S] = k_r[ES] + k_{cat}[ES] (=Vb)$$

si ricava:

$$(6) \quad \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_r + k_{cat}}{k_f} = K_M \quad \text{costante di Michaelis-Menten}$$

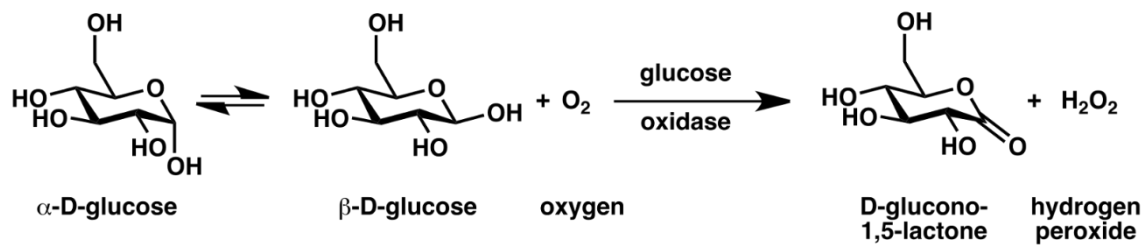
Essendo la velocità legata direttamente alla quantità di enzima legato avrò il massimo quando non ci sarà alcun enzima libero $[E] = 0$, tutto sarà legato $[E]_0 = [ES]$; infatti da eq. (4) si ha: $V_{max} = k_{cat}[E]_0$ (7)

Mettendo a sistema le eq. (4) (5) (6) (7) si ottiene il risultato desiderato: una funzione che rappresenti la velocità di reazione in tutto il range di concentrazione di substrato.

$$V_0([S]) = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Importante specificare che il modello sopracitato è costruito considerando reazioni che avvengono in soluzioni ideali in cui enzima e substrato sono disponibili in grandi quantità e vicini tra loro; nei fluidi biologici non è spesso così, vanno infatti considerati i tempi di diffusione delle molecole e le interferenze da altre reazioni. In linea di massima se la reazione avviene a velocità molto inferiori al limite di diffusione il modello si può considerare valido.

5.1.1.2 Glucosio Ossidasi



L'enzima glucosio ossidasi è prodotto in natura solo da funghi ed insetti, esistono molteplici forme naturali e alcune mutanti ingegnerizzate per avere maggiori stabilità e costante catalitica. E' un enzima ampiamente utilizzato in ambito alimentare, industriale e medico per il trattamento di alcune forme di cancro, diabete e medicazione delle ferite. L'alta velocità di reazione, stabilità e specificità lo rendono primo candidato per la realizzazione di biosensori enzimatici.

La velocità di reazione è ordini di grandezza inferiore al limite di diffusione, è quindi possibile l'uso del modello MM e k_{cat}/k_M stimate nell'ordine di $10^6 M^{-1}s$.

Il meccanismo generale di reazione è l'ossidazione del β -D-glucosio in glucono--lactone da parte della GOx e la riduzione di una molecola elettrone-accettore, solitamente ossigeno molecolare.

5.1.1.3 Sensore elettrochimico conducimetrico a base di ossido di Indio, Silicio e Glucosio ossidasi

I processi biologici operati da enzimi spesso includono trasferimenti di carica da un substrato all'altro, ecco che i sensori elettrochimici opportunamente attrezzati si prestano molto bene allo scopo di intercettare questi movimenti e ricondurli ad una circuiteria elettrica di misura. Il principio di funzionamento del sensore qui presentato è la suscettibilità di strati sottili (thin films) di nanoparticelle di Indio (INP) e Silicio (SNP) alle specie cariche generate dall'azione della GOx con il glucosio. Il vantaggio dell'approccio conducimetrico è l'assenza di elettrodi di riferimento e la più semplice implementazione in sistemi CGM, inoltre queste particolari nanoparticelle sono relativamente semplici da produrre in massa abbattendo i costi. Le INP, già utilizzate con successo per la rilevazione di neurotrasmettitori e pH, soffrono però di un ricorrente

problema dei sensori conduttimetrici: la necessità di un modello matematico; in questo caso i percorsi casuali dei portatori di carica causano misure molto variabili da sensore a sensore, è stato quindi deciso di accoppiare un array di singole unità sensibili e utilizzare un modello statistico per l'evaluazione dei risultati.

Ogni unità è strutturata come segue: su un wafer di silicio a superficie ossidata (2 μ m) sono stampati due elettrodi interdigitati di Cromo Oro con piste lunghe 400 μ m spaziate di 5 - 10 - 15 - 20 μ m, varie spazature vengono testate per valutarne le peculiarità metrologiche. Il tutto viene poi ricoperto sequenzialmente da un primo strato di Polydiallylammmonium chloride (polyDADMAC o PDDA) e Sodium Polystyrene Sulfonate (PSS), seguito da 5 strati alternati di PSS modificato per avere carica superficiale negativa e INP, infine ricoperto da uno strato di immobilizzazione per l'enzima composto da 4 deposizioni alternate di PDDA e SNP.

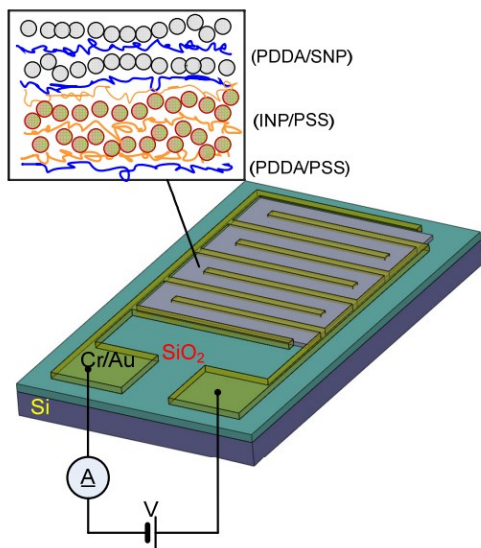


Figure 2. Cont.

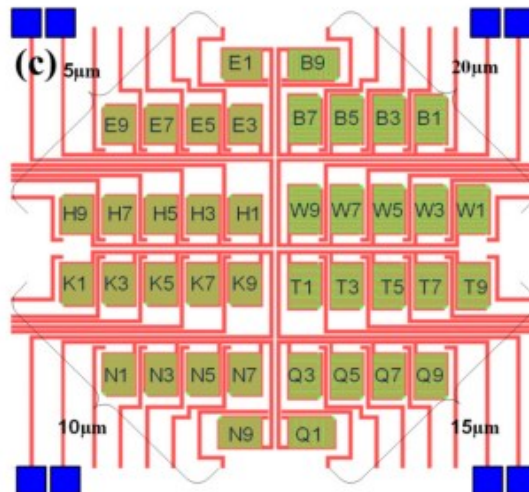


Figura 1: (dx) struttura del singolo elemento sensibile con tensione di bias e amperometro schematizzati; (sx) configurazione array di 40 sensori per il test divisi in gruppi per ampiezza di canale.

I test vengono eseguiti facendo scorrere soluzioni di glucosio e soluzioni neutre (*Phosphate Buffer Solution*, PBS), a flussi alternati di 100 e 550 μ l/min, in una camera dove i 40 sensori sono disposti come in figura, le misure di transcaratteristica sono state svolte in un range tra -1 e 1 V con passo di 5mV e frequenza di campionamento di 10 Hz.

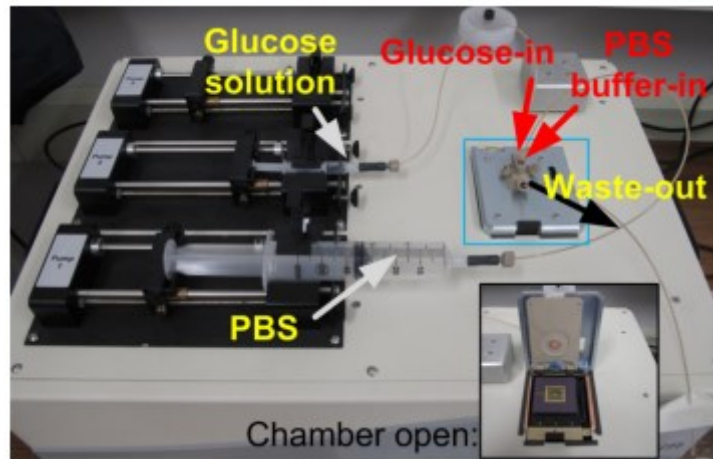


Figura 2: dispositivo di somministrazione delle soluzioni con siringhe azionate da attuatori lineari a barre filettate.

Interessante notare il comportamento simil-diode di questi sensori che mostrano una transconduttanza maggiore e costante se sottoposti a tensioni di bias superiori a 0.6 V sia in aria che immersi nella PBS, stimata essere la barriera energetica delle nanoparticelle. Probabilmente l'origine di questa barriera è l'interfaccia elettrodi nanoparticelle che si traduce in una giunzione Schottky metallo-semiconduttore.

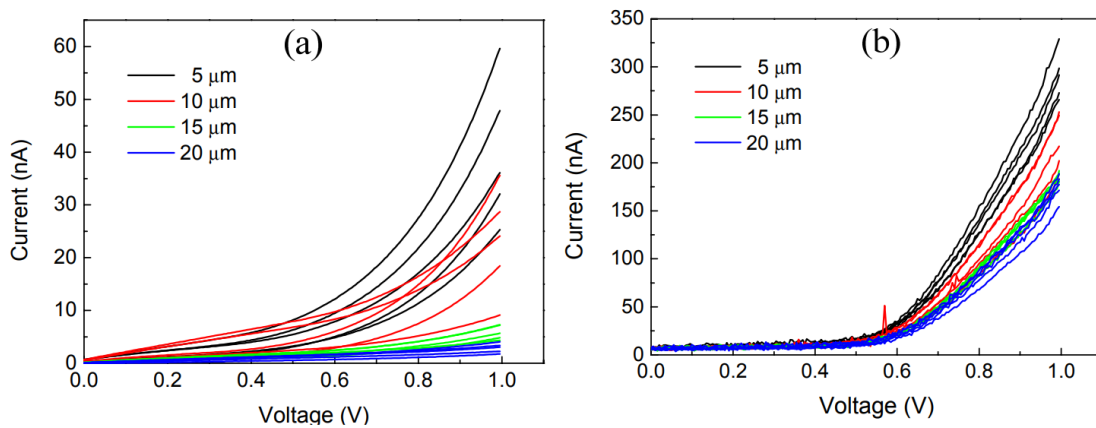


Figura 3: trans-caratteristiche I-V a vuoto, sensore esposto ad aria (sx) e alla PBS (dx).

I tempi di risposta sono stati misurati sia come descritto sopra, alternando soluzioni Glu e PBS, che con un flusso costante di GLU a concentrazioni crescenti senza lavaggio intermedio. La prima metodica ha portato risultati consistenti: con voltaggi tra 0.9 e 1.0 V i sensori con spaziatura dei canali di 10 μm reagiscono con correnti proporzionali al

glucosio in soluzione, per i canali più grandi sono state necessarie tensioni di bias maggiori. I risultati vengono poi normalizzati rispetto alle correnti dei sensori a vuoto (senza glucosio).

Nei sensori con canali più grandi di 10 μm è interessante notare che nonostante la resistenza totale aumenti, nello specifico quella specifica dello strato di nanoparticelle aumenta rispetto alla resistenza dei contatti elettrodo-INP/SNP, essendo inferiori anche le correnti a vuoto il risultato delle correnti normalizzate è comunque comparabile se non superiore ai sensori dal canale più stretto.

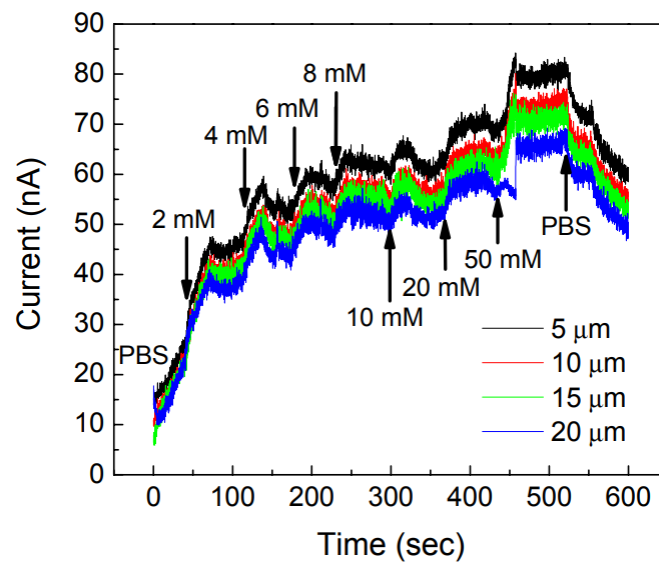


Figura 4: andamento della risposta dell'array a concentrazioni crescenti di glucosio senza lavaggi intermedi.

Lunghezza di Canale	Numero di dispositivi considerati	Sensibilità (nA/mM) e dev. std.	k_M (mM)
5	10	11.9 (3.9)	20.3
10	8	5.7 (2.6)	20.1
15	7	4.4 (1.5)	19.6
20	7	6.9 (2.9)	17.7

I risultati riportati in tabella mostrano sensibilità comprese tra 4 e 11.9 nA/mM, tempi di risposta nell'ordine dei 100-200 secondi e k_M apparente intorno ai 20mM per ogni larghezza di canale, principalmente dovuta a fattori sterici delle nanoparticelle più che alla spaziatura degli elettrodi. Alcuni sensori hanno fallito nel collegarsi bene ai contatti della struttura, per questo solo i chips ben connessi sono stati considerati e indicati in tabella.

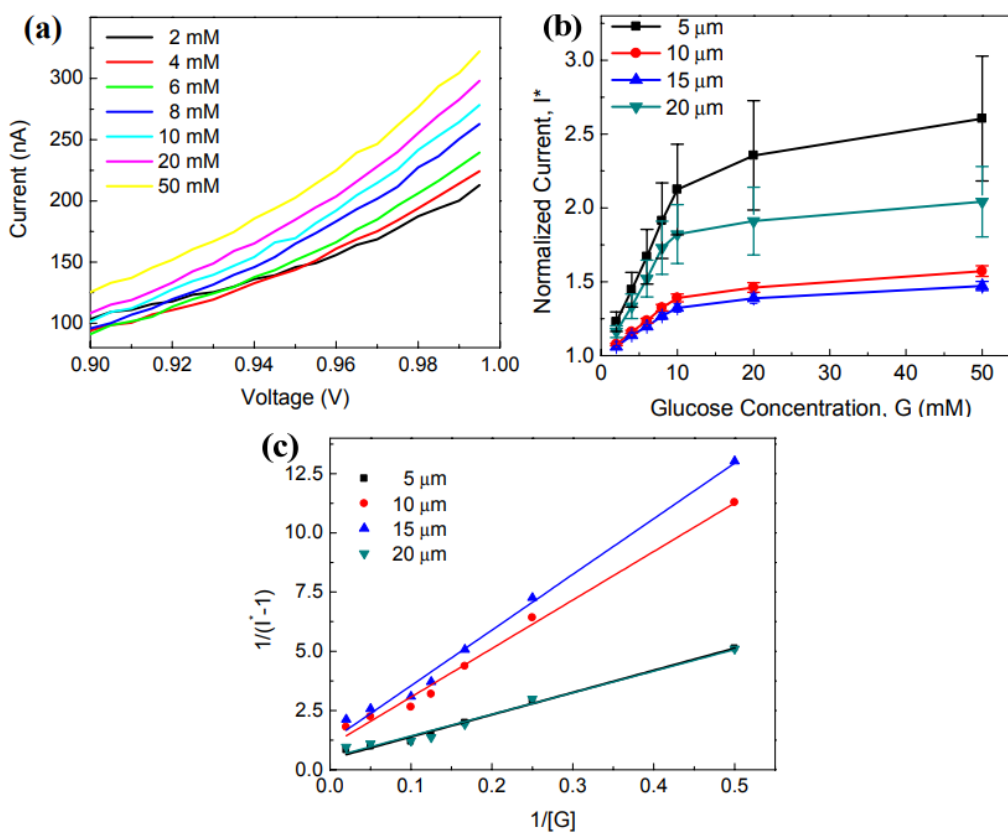


Figura 5: (a) andamento I-V per diverse concentrazioni di glucosio su canali a 10 μm ; (b) correnti normalizzate rispetto a quelle generate in PBS; (c) Grafico di Lineweaver-Burk che descrive la cinetica enzimatica: sulle ascisse il reciproco del substrato, sulle ordinate il reciproco della velocità di reazione.

Il sensore si rivela quindi particolarmente efficace sia per misure di glucosio discrete che per il continuo monitoraggio, alcuni possibili prosegui di ricerca, non trattati dagli autori, e che possono essere utili per la validazione di questo sensore sono: l'effetto della temperatura, soprattutto quella corporea (36-38) il sensore viene infatti proposto come possibile candidato per sensori indossabili; il numero di cicli operativi, la valutazione della sensibilità per misure continue decrescenti e l'effetto di una ulteriore miniaturizzazione di queste componenti sulla stabilità e affidabilità.

5.2 MISURA DEL CLORO

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica ereditaria potenzialmente mortale, causata dalla lesione dei geni regolatori della conduttanza di membrana (*CF Transconductance Regulator*, CFTR). Questa lesione si esprime con un trasporto difettoso degli ioni cloro (Cl^-) e sodio (Na^+) attraverso le membrane delle cellule epiteliali con formazione conseguente di secrezioni disidratate; il primo sintomo caratteristico è infatti la produzione nei lumi degli organi di muco iper-viscoso che nel pancreas causa insufficiente secrezione di enzimi necessaria al metabolismo con conseguenti patologie come insufficienza pancreatica e diabete (incidenza del 30% nei pazienti affetti da FC); nel tratto gastrointestinale causa un deficit dell'assorbimento di nutrienti e produzione di dense secrezioni (meconium ileus); porta inoltre a sterilità nei soggetti maschi. L'apparato più colpito è quello respiratorio, la produzione di muco denso infatti causa una cronica ostruzione delle vie aeree soggette quindi ad infezioni croniche e costantemente infiammate. Le complicazioni respiratorie sono la maggior causa di sofferenza e morte nei soggetti affetti.

La diagnostica della FC avviene quindi sfruttando la proprietà mutata della CFTR, l'epitelio delle ghiandole sudoripare è infatti compromesso e il sudore che ne deriva ha quantità alterate sia di Cloro che di Sodio, il primo passo è quindi misurare la

concentrazione di questi due elementi, solitamente basta il cloro: se in un adulto essa è inferiore a 30 mmol/L la diagnosi FC (dFC) non è supportata, se superiore a 60 mmol/L il paziente è con molta probabilità affetto da FC. Nel caso intermedio, 30-60 mmol/L ci sono più possibilità: errori o interferenze nella procedura di prelievo, particolari condizioni del paziente non correlate a FC, forme di FC atipica con modifiche marginali o parzialmente inesprese dei geni della CFTR; sarà a cura del medico scegliere se rieseguire il test o effettuare misure più approfondite e stabili come l'analisi del DNA, la misura dei potenziali nasali o delle correnti intestinali.

Cloro e Sodio		
Età	Intervallo	Probabilità FC
fino a 6 mesi	29 mEq/L	bassa
	30-59 mEq/L	media
	60	alta
oltre i 6 mesi	39 mEq/L	bassa
	40-59 mEq/L	media
	60	alta

Equivalenti di NaCl	
49 mmol/L	bassa
50 mmol/L	alta

Misurare concentrazioni di cloro nel sudore è il test standard per diagnosticare la fibrosi cistica, la procedura standard si svolge come segue: un campione di sudore viene raccolto con garze assorbenti (minimo 75mg) o tubi a spirale (*Macroduct*[®], minimo 20uL) dalla pelle dell'avambraccio del soggetto, stimolato con una differenza di potenziale e della

pilocarpina applicata sul derma (iontoforesi pilocarpinica). Il campione viene poi trasportato in un laboratorio di analisi dove verrà vagliato con le tecniche standard di spettroscopia e cromatografia. Si tratta di un processo lungo, con molta variabilità alle condizioni ambientali o del soggetto (e.g. idratazione) con passaggi intermedi che possono inficiare sull'incertezza del risultato tant'è che in alcuni casi viene prescritto di ripetere la procedura che nella prima fase richiede 30 minuti, per la seconda invece sono necessari non meno di 1-2 giorni. Dover ripetere il test risulta quindi in un rallentamento delle attività di laboratorio sfavorevole per i programmi di screening, per ovviare a questo problema alcuni laboratori effettuano il prelievo simultaneo su entrambi gli avambracci mediando poi il risultato per rafforzarne l'affidabilità, altri invece si affidano ad un altro test di tipo conduttimetrico in cui misurando la conduttività del sudore riescono a determinare la concentrazione di NaCl disciolto (se superiore a 50 mmol/l supporta dFC), metodo che accelera notevolmente i tempi ma non riconosciuto per la diagnostica e accettato solo per lo screening.

Riassumendo i test di routine rappresentano l'attuale gold standard se ben eseguiti, esecuzione che però è disseminata di possibili intoppi e richiede operatori d'esperienza. La procedura è aerobica e prona all'evaporazione del campione prevede fasi separate per campionamento e analisi con in mezzo un trasporto di biofluidi e possibile rischio di infezioni e contaminazioni, richiede tassi di sudorazione sufficientemente alti e in caso contrario l'applicazione di elettrodi per la stimolazione.

Il processo è inoltre dispendioso in termini di tempo e spesso necessita l'applicazione sul derma di apparati ingombranti, questi sono i due maggiori problemi per la diagnosi di FC nei neonati, essi infatti hanno arti troppo sottili per l'applicazione di elettrodi da adulti, sudorazioni inferiori, e necessitano di tempestività nella risposta in quanto le cure hanno da cominciare con il minor ritardo possibile.



Figura 1: iontoforesi pilocarpinica su entrambi gli avambracci, nei bambini piccoli il campione di sudore è spesso troppo ridotto per il prelievo su un solo braccio.

5.2.1 Cella conduttimetrica a microflusso

Il dispositivo progettato da Wescor et al., ricercatori per la Wescor inc. azienda produttrice dei collettori a spirale sopra citati, incorpora dispositivo di raccolta e sistema di analisi del campione in un unico dispositivo di minore ingombro eliminando la maggior parte dei problemi già menzionati.

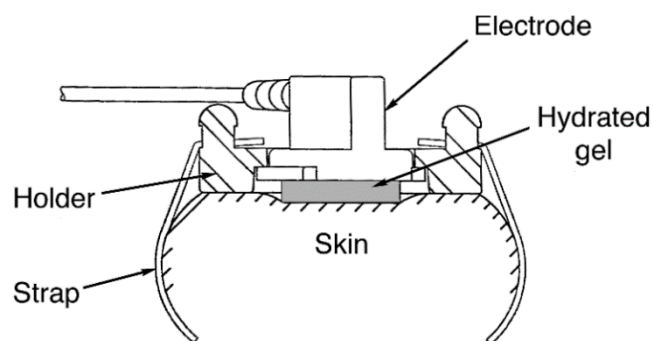


Figura 1: sezione del dispositivo incastro-elettrodo-gel applicata sulla pelle del braccio di un bambino.

L'apparecchio è composto da due dischi in plastica cavi ed identici del diametro di 23 mm da fissare con degli elastici alla pelle del bambino, all'interno di ognuno viene posizionato un dischetto usa e getta di agar contenente pilocarpina saldamente pressato a contatto con la pelle da un elettrodo del diametro di 16 mm. Un sistema a batteria

connesso ai due elettrodi fa scorrere una corrente DC di circa 0.5 mA per 2-3 minuti, quando la stimolazione pilocarpinica del sudore raggiunge il massimo, l'interfaccia elettrodo-gel all'anodo viene rimossa dal suo disco di ritenzione, la pelle pulita con acqua deionizzata ed asciugata con cotone idrofilo. Una cella di analisi composta da un micro tubo collettore ed un elettrodo d'analisi viene immediatamente inserito nel posto vacante dell'anodo, dopo 2-6 minuti si ottiene a schermo la lettura della conduttività.

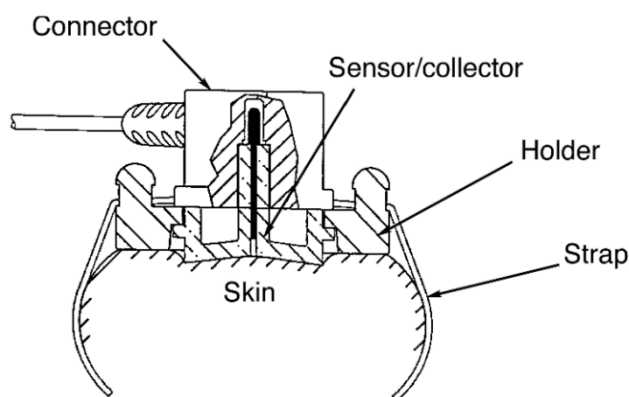


Figura 2: sezione della struttura con la cella sensibile al posto dell'interfaccia elettrodo-gel.

Da quando compare a schermo la prima lettura la misura di conduttività è continua, per 2-4 minuti decresce rapidamente successivamente decresce ancora ma lentamente, tanto da consentire una stima affidabile del valore di conducibilità: l'intervallo più idoneo, su cui verrà mediata, inizia 2-4 minuti dopo la prima lettura e dura 5 minuti. La netta durata massima del test è quindi di 14 minuti.

La temperatura nell'intervallo scelto oscilla nel range tra 30.6 e 32.8 °C (media 31.6°C), è importante notare che il sensore è del tipo conducimetrico in liquido (capitolo 4) quindi affetto da drift da temperatura, vale infatti la formula $G_t = G_{t0}[1+a(t-t_0)]$ con un coefficiente termico stimato per il sudore in $a = 1.2$, nel range di temperatura di circa 2 gradi in cui rientra la misura avremo un errore sulla concentrazione di 2 mmol/l irrilevanti per lo scopo diagnostico, è quindi ridondante qualsiasi tipo di compensazione.

Il valore di conducibilità misurato è, a parità di soluzione, direttamente dipendente dalla geometria della cella sensibile, questo rende superflua la calibrazione di fabbrica in quanto le tecniche di produzione per elementi così semplici hanno alta ripetibilità e l'errore stimato su un campione di 245 celle è di circa il 2%. Conoscendo esattamente il volume del lume della cella (1.56 uL) e la sua superficie di contatto (2.48 cm²) è possibile

anche fare il calcolo del tasso di sudorazione misurando elettronicamente il tempo intercorso tra l'applicazione del sensore e la comparsa a schermo della prima lettura che coincide con il momento in cui la cella è piena di perspirato.

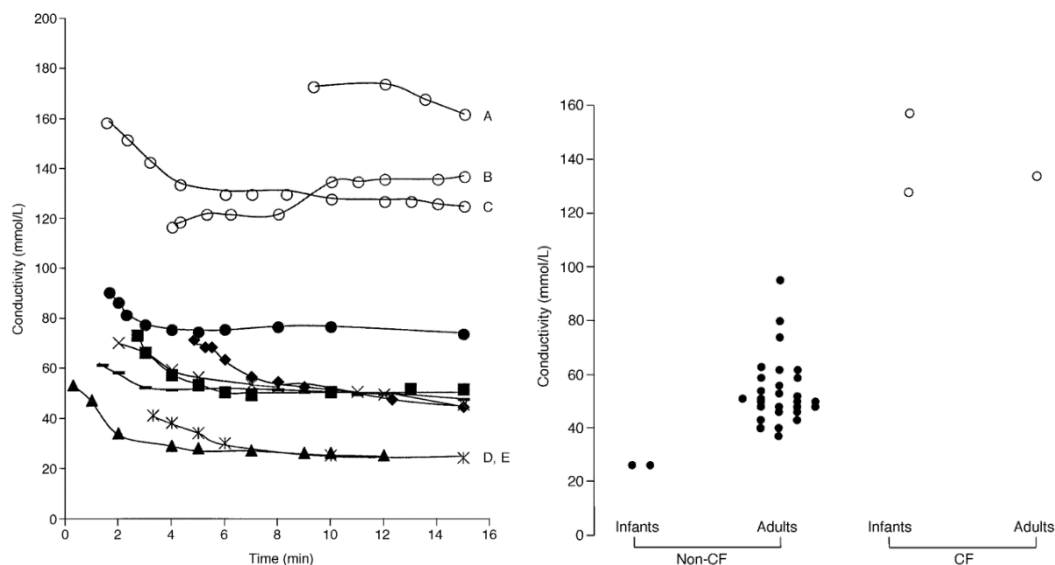


Figura 2: risultati di 35 test effettuati su 22 soggetti, 19 sani e 3 affetti da CF, sia adulti che bambini, ○ = soggetti FC: (sx) il test risulta efficace nel distinguere pazienti FC da non-FC; andamento delle conducibilità nel tempo (dx).

Il dispositivo di rivela dunque un valido sostituto alle tecniche aerobiche promettendo di eliminare il tasso di fallimento del test e consentendo l'esecuzione su neonati con piccoli arti e bassi tassi di sudorazione, anche in caso questi fossero particolarmente bassi l'evaporazione del campione è nulla ed è possibile ottenere il risultato solo aspettando un po' più tempo. l'apparecchio è inoltre privo di errori da contaminazione e non richiede personale addestrato per l'esecuzione, fornisce sensibilità sufficienti per lo scopo e costi di produzione ed operazione molto bassi. L'errore di temperatura è trascurabile come lo è la cross-sensitivity ad altri ioni conduttivi presenti in concentrazioni fino a due ordini di grandezza inferiori al Sodio e al Cloro.

CONCLUSIONI

L'approccio dei sensori elettrochimici conduttimetrici si rivela vincente in svariati campi offrendo vantaggi come la facilità di miniaturizzazione, alta sensibilità, affidabilità dei risultati, bassi costi di produzione e operazione. La vasta gamma di combinazioni di materiali li rendono realizzabili specificatamente per ogni applicazione e utili in ogni campo non solo medico ma anche in sportivo e militare; le direzioni di ricerca più interessanti sono l'integrazione con sistemi di microfluidica, la simbiosi con smart materials e materiali nanostrutturati, l'integrazione in dispositivi indossabili e le possibilità di utilizzo nei cosiddetti laboratori su chip (lab-on chip). I maggiori problemi ancora da risolvere del tutto sono l'influenza di fattori esterni nelle misure come temperatura o affinità dello strato sensibile con biomarkers non considerati, sarà importante in fase di progettazione conoscere a fondo l'ambiente operativo del dispositivo e prevedere gli andamenti di questi disturbi predisponendo delle compensazioni adeguate o aggiustando le composizioni materiali in modo che siano target-specifiche.

BIBLIOGRAFIA

Amperimetria, Wikipedia, <https://it.wikipedia.org/wiki/Amperometria>,

Breathing, Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Breathing#Composition>

Atmospheric chemistry, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Atmospheric_chemistry

Sintomi Ipercapnia, Humanitas, <https://www.humanitas.it/sintomi/ipercapnia/>

Capnometria (Capitolo 3.3.2), Manuali di Medicina Intensiva, Manuali di Medicina Intensiva: Capnometria (Capitolo 3.3.2)

Biological functions of nitric oxide, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Biological_functions_of_nitric_oxide

Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain, Pol Picón, Pagès JoanGarcia, Buendia Francisco J. Muñoz, Laboratory of Molecular Physiology, Faculty of Health and Life Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Aug 1;1865(8):1949-1967.

Alveolar Nitric Oxide as a Biomarker of COVID-19 Lung Sequelae: A Pivotal Study, Cameli P, Bargagli E, Bergantini L, d'Alessandro M, Giugno B, Gentili F, Sestini P. Alveolar Nitric Oxide as a Biomarker of COVID-19 Lung Sequelae: A Pivotal Study. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 25;10(9):1350.

Adsorption/desorption kinetics of nitric oxide on zinc oxide nano film sensor enhanced by light irradiation and gold-nanoparticles decoration, Nguyen Duc Chinh, Truong Thi Hien, Lam Do Van, Nguyen Minh Hieu, Nguyen Duc Quang, Seung-Mo Lee, Chunjoong Kim, Dojin Kim, Adsorption/desorption kinetics of nitric oxide on zinc oxide nano film sensor enhanced by light irradiation and gold-nanoparticles decoration, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 281, 2019, Pages 262-272;

Glucose Oxidase, an Enzyme "Ferrari": Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications, Bauer JA, Zámocká M, Majtán J, Bauerová-Hlinková V. Glucose Oxidase, an Enzyme "Ferrari": Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules*. 2022 Mar 19;12(3):472.

Michaelis–Menten kinetics, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Michaelis%E2%80%93Menten_kinetics

A Conductometric Indium Oxide Semiconducting Nanoparticle Enzymatic Biosensor Array, Lee D, Ondrake J, Cui T. A conductometric indium oxide semiconducting nanoparticle enzymatic biosensor array. *Sensors (Basel)*. 2011;

Comprehensive Review on Wearable Sweat-Glucose Sensors for Continuous Glucose Monitoring, Zafar H, Channa A, Jeoti V, Stojanović GM. Comprehensive Review on Wearable Sweat-Glucose Sensors for Continuous Glucose Monitoring. *Sensors (Basel)*. 2022 Jan 14;

Glucose monitoring by reverse iontophoresis, Potts RO, Tamada JA, Tierney MJ. Glucose monitoring by reverse iontophoresis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 Jan-Feb;18 Suppl 1:S49-53.

Carbon Dioxide Sensing - Biomedical Applications to Human Subjects, Dervieux E, Théron M, Uhring W. Carbon Dioxide Sensing-Biomedical Applications to Human Subjects. *Sensors (Basel)*. 2021 Dec 28;22(1):188.

Development of a Ternary AlMgZnO-Based Conductometric Sensor for Carbon Oxides Sensing, S. Jaballah, G. Neri, H. Dahman, N. Donato and L. E. Mir, "Development of a Ternary AlMgZnO-Based Conductometric Sensor for Carbon Oxides Sensing," in *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 70, pp. 1-7, 2021, Art no. 4003907

Micromachined conductometric p(CO₂) sensor, Anca Roxana Varlan, Willy Sansen, *Micromachined conductometric p(CO₂) sensor*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 44, Issues 1–3, 1997, Pages 309-315;

Metal Oxide Gas Sensors: Sensitivity and Influencing Factors, Wang C, Yin L, Zhang L, Xiang D, Gao R. Metal oxide gas sensors: sensitivity and influencing factors. *Sensors (Basel)*. 2010;10(3):2088-106

Highly sensitive and selective nitric oxide sensor based on biomorphic ZnO microtubes with dual-defects assistance at low temperature, Cheng Li, Bao-Yu Song, Ming-Song Lv, Guo-Li Chen, Xian-Fa Zhang, Zhao-Peng Deng, Ying-Ming Xu, Li-Hua Huo, Shan Gao, Highly sensitive and selective nitric oxide sensor based on biomorphic ZnO microtubes with dual-defects assistance at low temperature, *Chemical Engineering Journal*, Volume 446, Part 1, 2022, 136846;

Electrochemical Nitric Oxide Sensors: Principles of Design and Characterization, Brown MD, Schoenfish MH. *Electrochemical Nitric Oxide Sensors: Principles of Design and Characterization*. Chem Rev. 2019 Nov 27;119(22):11551-11575.

Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease, Avdagić N, Zaćiragić A, Babić N, Hukić M, Seremet M, Lepara O, Nakaš-Ićindić E. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. *Bosn J Basic Med Sci*. 2013 Feb;13(1):5-9.

Detection of volatile organic compounds (VOCs) from exhaled breath as noninvasive methods for cancer diagnosis. *Anal Bioanal Chem* Sun X, Shao K, Wang T. Detection of volatile organic compounds (VOCs) from exhaled breath as noninvasive methods for cancer diagnosis. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Apr;408(11):2759-80

Advances in wearable chemical sensor design for monitoring biological fluids, Giusy Matzeu, Larisa Florea, Dermot Diamond, *Advances in wearable chemical sensor design for monitoring biological fluids*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 211, 2015, Pages 403-418;

Rapid and Selective Biomarker Detection with Conductometric Sensors, Ganganath S. Perera, Taimur Ahmed, Leah Heiss, Sumeet Walia, Madhu Bhaskaran, and Sharath Sriram

Conductometric analysis in bio-applications: A universal impedance spectroscopy-based approach using modified electrodes, Chiara Canali, Layla Bashir Larsen, Ørjan Grøttem Martinsen, Arto Heiskanen, *Conductometric analysis in bio-applications: A universal impedance spectroscopy-based approach using modified electrodes*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 212, 2015, Pages 544-550; *Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring*, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. *Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring*. *Sensors (Basel)*. 2008 Apr 11;8(4):2569-2588.

Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review, Lakard B. *Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review*. *Applied Sciences*. 2020; 10(18):6614.

Printed Electrochemical Biosensors: Opportunities and Metrological Challenges, Sardini E, Serpelloni M, Tonello S. *Printed Electrochemical Biosensors: Opportunities and Metrological Challenges*. *Biosensors (Basel)*. 2020 Nov 4;10(11):166.

PRINCIPI ED APPLICAZIONI DEI SENSORI ELETTROCHIMICI, <https://hdl.handle.net/11390/1050598>

A review of wearable biosensors for sweat analysis, Jo S, Sung D, Kim S, Koo J. A review of wearable biosensors for sweat analysis. *Biomed Eng Lett*. 2021 May 7;11(2):117-129.

Comparative Study of the Composition of Sweat from Eccrine and Apocrine Sweat Glands during Exercise and in Heat, Chen YL, Kuan WH, Liu CL. Comparative Study of the Composition of Sweat from Eccrine and Apocrine Sweat Glands during Exercise and in Heat. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May 12;17(10):3377.

Neural control of sweat secretion: a review, Hu Y, Converse C, Lyons MC, Hsu WH. Neural control of sweat secretion: a review. *Br J Dermatol*. 2018 Jun;178(6):1246-1256.

Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors, A.M.Vinu Mohan, Vinoth Rajendran, Rupesh K. Mishra, Mathiyarasu Jayaraman, Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 131, 2020, 116024;

Recent progress, challenges, and opportunities for wearable biochemical sensors for sweat analysis Roozbeh Ghaffari, John A. Rogers, Tyler R. Ray, Recent progress, challenges, and opportunities for wearable biochemical sensors for sweat analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 332, 2021, 129447;

Recent Developments in Sweat Analysis and Its Applications, Jadoon S, Karim S, Akram MR, Kalsoom Khan A, Zia MA, Siddiqi AR, Murtaza G. Recent developments in sweat analysis and its applications. *Int J Anal Chem*. 2015;2015:164974.

Clinical evaluation of the GlucoWatch® biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes, Tierney MJ, Tamada JA, Potts RO, Jovanovic L, Garg S; Cygnus Research Team. Clinical evaluation of the GlucoWatch biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes. *Biosens Bioelectron*. 2001 Dec;16(9-12):621-9.

Modeling Glucose Transport From Systemic Circulation to Sweat, La Count TD, Jajack A, Heikenfeld J, Kasting GB. Modeling Glucose Transport From Systemic Circulation to Sweat. *J Pharm Sci*. 2019 Jan;108(1):364-371.

Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy, Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*. 2012 Oct;45(15):1132-44.

Cystic fibrosis pathophysiology, models, and novel therapies, Ribeiro CMP, Gentsch M. Editorial overview - 2022 respiratory issue: Cystic fibrosis pathophysiology, models, and novel therapies. *Curr Opin Pharmacol.* 2022 Sep 21;67:102289.

Micro-Flow Cell conductometric sweat analysis for cystic fibrosis diagnosis, Webster HL, Quirante CG. Micro-flowcell conductometric sweat analysis for cystic fibrosis diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2000 May;37 (Pt 3):399-407.

Un grazie a Laura ed Angela