



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“Monitoraggio dell'idratazione in ambito sportivo: una panoramica su
sensori e modalità di acquisizione dati”**

Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello

Laureanda: Giorgia Grisi

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 20/09/2022

Indice

SOMMARIO	4
ABSTRACT	4
1. L'ACQUA NEL CORPO UMANO: UN'INTRODUZIONE.....	6
2. DISIDRATAZIONE ED ESERCIZIO FISICO	8
2.1 Cenni di fisiologia della disidratazione	8
2.2 Effetti della disidratazione sui muscoli.....	10
2.3 Metodi tradizionali per la valutazione dell'idratazione	12
3. SENSORI PER LA MISURA DELL'IDRATAZIONE.....	16
3.1 Criteri da valutare durante la misurazione	16
3.2 Classificazione dei biosensori.....	18
4. MISURAZIONE DELL'IDRATAZIONE DAL SUDORE.....	22
4.1 Ghiandole eccrine	22
4.2 Sudore: meccanismo di secrezione e riassorbimento.....	24
5. SENSORI INDOSSABILI PER IL MONITORAGGIO DEL SUDORE	28
5.1 Criticità nella progettazione	29
5.2 Generalità: composizione e caratteristiche	30
5.3 Sensore colorimetrico: esempio con nanoparticelle d'oro.....	33
5.4 Sistema ibrido: sensore elettrochimico/colorimetrico	37
5.5 Esempio di sensore commerciale.....	40
6. MISURAZIONE DELL'IDRATAZIONE DALLA SALIVA.....	42
6.1 Ghiandole salivari e secrezione della saliva	42
6.2 Parametri di valutazione dell'idratazione	42
6.3 Sensori microcantilever piezoresistivi incorporati.....	45
6.4. Esempio di sensore commerciale.....	49
CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA.....	54

SOMMARIO

Mantenere un giusto livello di idratazione corporea è fondamentale per la salute del nostro organismo, per nutrirlo, per adattarlo alle condizioni fisiche esterne e per garantire il funzionamento di tutte le azioni interne. Nel momento in cui si sottopone il corpo a un forte stress, come può essere un'attività sportiva, questo aspetto risulta essere ancora più importante.

Oltre ad analizzare quali sono le possibili conseguenze che colpiscono un atleta nel momento in cui è disidratato e quali sono le cause che favoriscono tale condizione, l'obiettivo di questo studio è di individuare i dispositivi più adatti per eseguire un monitoraggio dell'idratazione. In particolare, si sofferma sull'analisi del sudore e della saliva, in quanto permettono di compiere un esame non invasivo sull'atleta e di mostrare in tempo reale un risultato. Vengono quindi presentate le tecnologie più adatte, a seconda del fattore preso in studio, con i vantaggi e gli svantaggi che presentano nel momento in cui vengono testate, per poter così verificare la qualità del dispositivo utilizzato e capire quale mezzo sia più adatto.

ABSTRACT

A correct level of hydration is essential for the health of our organism, to nourish it, to adapt it to external physical conditions and to ensure the functioning of all internal physical actions. The moment you put your body under a lot of stress, such as a sport activity, this aspect is even more important.

In addition to analyzing what are the possible consequences that affect an athlete when he is dehydrated and what are the causes that favor this condition, the goal of this study is to identify the most suitable devices for monitoring hydration. In particular, it focuses on the analysis of sweat and saliva, as they allow to perform a non-invasive examination on the athlete and to show a result in real time. Then the study presents the most suitable technologies, with their advantages and disadvantages, depending on the factor taken into consideration, and it shows how a device works under test, in order to verify its quality and to understand which one more appropriate.

1. L'ACQUA NEL CORPO UMANO: UN'INTRODUZIONE

L'acqua è il principale costituente del corpo umano ed è quindi presente in ogni cellula. Grazie alla sua elevata elettronegatività, è una molecola molto reattiva e si comporta da ottimo solvente per i composti ionici, i quali sono liberi di muoversi con un moto casuale, distribuendosi uniformemente all'interno della soluzione. L'acqua è inoltre coinvolta in diversi processi metabolici che permettono di estrarre, attraverso idrolisi, sostanze nutritive a partire da macronutrienti come carboidrati, proteine e grassi.

L'acqua si occupa poi del loro trasporto verso gli apparati cellulari, consentendo lo scambio tra cellule, liquido interstiziale e capillari. Oltre a ciò, mantiene pressoché costante il volume vascolare e consente quindi la circolazione sanguigna. I sistemi e gli apparati che costituiscono il nostro corpo dipendono perciò strettamente da un'adeguata idratazione per funzionare efficacemente. Un'altra sua proprietà è l'elevata capacità termica, che contribuisce a limitare le variazioni della temperatura corporea in un ambiente caldo o freddo. Tale caratteristica viene definita termoregolazione. Se si combina poi l'acqua con molecole viscosi, è in grado di formare fluidi lubrificanti come saliva e muco che sono sfruttati negli apparati gastrointestinale, respiratorio, genitale e urinario.

Il contenuto di acqua e lo stato di idratazione di un organismo sono concetti diversi che spesso vengono confusi. L'acqua corporea totale indica il volume in litri rispetto al peso corporeo. Nel corso della vita, può subire delle variazioni determinate dall'età, dai cambiamenti ormonali e dalla quantità di tessuto adiposo. In generale costituisce circa il 50-60% del peso corporeo. L'idratazione, invece, riflette la distribuzione dell'acqua e l'equilibrio dei principali elettroliti disciolti all'interno di essa. Negli adulti, circa due terzi dell'acqua totale si trova nello spazio intracellulare, mentre un terzo è acqua extracellulare. L'idratazione è strettamente controllata da un meccanismo omeostatico, ovvero dalla regolazione dell'ambiente interno. Il nostro organismo deve cioè garantire un giusto apporto e distribuzione dei soluti nella soluzione acquosa sia all'interno, che all'esterno della membrana cellulare. Il corpo umano è infatti in grado di monitorare il proprio stato interno e intraprendere le varie azioni atte a correggere le alterazioni che minacciano la sua normale funzione, tentando di compensare una generica perturbazione. Non si tratta di uno stato di equilibrio in quanto la composizione di una sostanza interna, ad esempio, non deve essere identica a quella del compartimento

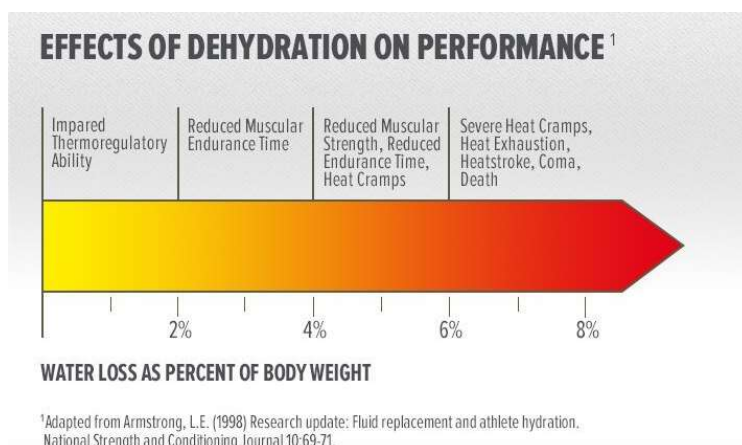
esterno, ma si deve presentare una certa dinamicità che permette di mantenere le variabili controllate entro una certa gamma di valori accettabili. Proprio per questa ragione l'omeostasi viene definita anche omeodinamica. Per garantire un corretto stato, l'organismo utilizza il principio dell'equilibrio di massa, ovvero ogni aumento deve essere compensato da una perdita di pari entità. Anche la termoregolazione fa parte del processo omeostatico. Essa permette di innescare dei meccanismi atti a regolare e a stabilizzare la temperatura interna, in modo tale che si assesti a 37 °C.

Quotidianamente, possiamo assumere il corretto quantitativo d'acqua attraverso l'alimentazione e bevande (circa 2,2 L) o attraverso funzioni metaboliche, specialmente grazie alla respirazione aerobica con cui è possibile ottenere acqua (circa 0,3 L) e anidride carbonica tramite la trasformazione del glucosio con l'ossigeno. Un altro metodo può essere tramite la cute ma la quantità di acqua assorbita è talmente poco significativa da poter essere trascurata. L'escrezione, ovvero la perdita del carico d'acqua, può avvenire per minzione e per defecazione, per sudorazione e in piccole parti, per respirazione tramite la cute e polmoni. In genere, attraverso le urine è possibile eliminare la quantità maggiore di carico, eccetto durante l'attività fisica o in condizioni di forte caldo, tale per cui la sudorazione svolge un ruolo molto importante per permettere al corpo di mantenersi fresco.

2. DISIDRATAZIONE ED ESERCIZIO FISICO

Nonostante sia ben nota l'importanza dell'acqua per la vita dell'organismo, molti atleti non considerano seriamente gli effetti che un'adeguata idratazione può avere durante e dopo la prestazione atletica. Infatti, una corretta idratazione viene spesso trascurata o sottovalutata in quanto si presta maggiore attenzione al miglioramento delle competenze specifiche, alla resistenza cardiovascolare e la forza muscolare per ottimizzare le prestazioni. Uno sforzo fisico, infatti, oltre a condurre il corpo più facilmente a uno stato di disidratazione, può ostacolare le principali funzioni svolte dall'organismo, rendendo quindi più scadente l'attività svolta e, in casi più gravi, causare danni a livello di salute dell'atleta. Una carenza di acqua, infatti, riduce il flusso ematico, limitando di conseguenza l'apporto nutritivo di sostanze e ossigeno ai vari tessuti, può creare degli squilibri sulla regolazione della temperatura interna, sviluppare crampi e affaticamenti muscolari.

Figura 1: la figura mostra schematicamente quelle che sono le possibili conseguenze della disidratazione per un atleta



2.1 Cenni di fisiologia della disidratazione

La disidratazione può essere classificata in tre categorie: la disidratazione isotonica in cui si ha un'analogia perdita netta di sale e acqua; la disidratazione ipertonica, caratterizzata dall'aumento di sodio nel sangue (maggiore a 145 mmol/L) e rappresenta la conseguenza di un'eccessiva sudorazione; e la disidratazione ipotonica, in cui la perdita di sali minerali è superiore a quella dell'acqua ed è in genere accompagnata da disturbi renali o gastrointestinali. Durante l'attività fisica, aumenta la probabilità di incorrere in una disidratazione ipertonica in quanto, attraverso la sudorazione, l'acqua

viene espulsa dall'organismo. L'esecuzione di un intenso allenamento, infatti, è uno dei fattori principali che attiva il processo di sudorazione.

Per eseguire un qualsiasi movimento, è necessario fornire energia attraverso la produzione di ATP. L'energia prodotta però non viene utilizzata totalmente per il processo: una parte di essa si dissipa sotto forma di calore, innalzando la temperatura interna e alterando così l'omeostasi. Grazie alla termoregolazione, si innescano due principali meccanismi: la dilatazione dei vasi sanguigni e la sudorazione. L'effetto di entrambi permette di eliminare il calore in eccesso in quanto si verificano le condizioni necessarie per innescare l'evaporazione che raffredda il corpo. Tuttavia, la dilatazione dei vasi non modifica la vasocostrizione negli altri tessuti e ciò modifica ulteriormente l'omeostasi, diminuendo le resistenze periferiche e sottraendo flusso ematico ai muscoli. La disidratazione, da un lato, fa sì che la temperatura corporea aumenti più velocemente durante l'esercizio fisico, attivando di conseguenza la termoregolazione, da un altro, compromette anche la capacità del corpo di perdere calore in quanto l'esposizione prolungata a condizioni ipertermiche e/o di esercizio prolungato al caldo possono indurre un deficit d'acqua dovuti a sudorazione profusa, con conseguente iperidratazione. Questo deficit idrico abbassa il volume sia intra che extra cellulare provocando iperosmolarità plasmatica e ipovolemia. Entrambi compromettono la sudorazione e l'evaporazione del fluido. L'effetto che si ottiene è una diminuzione del volume plasmatico in quanto elimina un abbondante quantitativo d'acqua che lo costituisce, per regolare l'ambiente interno. Di conseguenza, si ha un aumento della viscosità sanguigna che rappresenta la resistenza del fluido allo scorrimento. In questo modo, la pressione venosa rilevata risulta essere inferiore al normale e, durante i picchi di sforzo fisico, tutti questi cambiamenti possono diminuire la quantità di sangue che ritorna al muscolo cardiaco nella fase di diastole. Significa che sarà inferiore anche la quantità di sangue che lascerà il cuore a seguito della gittata sistolica e quindi i muscoli e tutti gli altri tessuti, scarsamente irrorati, non riceveranno una quantità adeguata di ossigeno e nutrimento. È interessante osservare poi come la capacità di resistenza cala molto di più in ambienti caldi rispetto a quelli freschi. Di fatto, anche le condizioni climatiche possono influire sulla termoregolazione in quanto, il corpo dall'interno risente delle alte temperature esterne. In tal caso, agisce l'acclimatazione ovvero la capacità di un organismo di adattarsi a un clima o a un ambiente geografico diverso da

quello originale. L'acclimatazione, in particolare, permette al corpo di abituarsi gradualmente a riassorbire, grazie ai dotti escretori ghiandolari, la maggior parte degli elettroliti del sudore, sebbene la produzione dello stesso sia accelerata a causa delle elevate temperature. Anche in questo caso, la disidratazione è causa di un mal funzionamento perché limita il riassorbimento dell'acclimatazione, rendendo più difficile l'adattamento alle diverse temperature.

2.2 Effetti della disidratazione sui muscoli

Oltre a limitare il nutrimento, a livello muscolare la disidratazione può comportare ulteriori conseguenze, come affaticamenti, crampi, accumuli di acido lattico o condizioni di stress che limitano la corretta crescita e sviluppo del muscolo. Tutto ciò è causato appunto proprio perché il muscolo non riceve sufficiente nutrimento per lo sforzo compiuto oppure per uno squilibrio nel livello di elettroliti nel sangue che irrorano poi la struttura. Tali conseguenze si riscontrano nel processo di produzione di ATP, per la contrazione muscolare. Nello specifico, la fonte principale di energia è la fosfocreatina. Tuttavia, l'energia prodotta da tale componente è limitata e quindi le fibre muscolari devono ricorrere al metabolismo delle biomolecole. Il metabolismo può essere aerobico quando è necessario ossigeno per ottenere energia dalle principali macromolecole, anaerobico quando il processo avviene in assenza di ossigeno. I carboidrati, in particolare, permettono di sviluppare ATP nel modo più veloce ed efficace. Attraverso la glicolisi, il glucosio viene metabolizzato fino a piruvato. In presenza di un adeguato apporto di ossigeno, dal piruvato è possibile ottenere ATP. Quando invece le concentrazioni di ossigeno sono troppo basse nelle fibre muscolari, il glucosio viene metabolizzato solamente per mezzo della glicolisi anaerobica, tale per cui la produzione di energia risulta essere inferiore, anche se molto veloce. Di conseguenza, i muscoli si possono contrarre soltanto per breve tempo senza mostrare segni di fatica. In tali condizioni, la scissione del glucosio comporta un maggiore accumulo di idrogeno, il quale si lega all'acido piruvico, per stabilizzarsi, formando acido lattico. In questo modo, il pH diminuisce causando il ben noto affaticamento muscolare che impiega qualche ora dopo lo sforzo fisico prima di cessare. Il fenomeno rischia di essere ancora più impattante quando il corpo è disidratato perché accompagna una maggiore risposta da parte di ammine aromatiche che, nel processo, favoriscono la disgregazione del glucosio. Oltre a ciò, attraverso un'eccessiva sudorazione, si può

verificare un'alterazione elettrolitica che causa uno scompenso e una progressiva carenza di sostanze, le quali sono necessarie per il normale funzionamento neuromuscolare. Tale conseguenza può sfociare nella formazione di un crampo: una contrazione muscolare involontaria e molto debilitante, che obbliga lo sportivo a interrompere l'attività.

Con l'allenamento si vuole favorire una buona crescita dell'apparato muscolare, ma anche in questo caso, la disidratazione può ostacolarne lo sviluppo. Un atleta disidratato infatti, si trova in una condizione di forte stress fisico e ciò causa un'eccessiva produzione di cortisolo. Si tratta di un ormone steroideo ed è il principale glucocorticoide, secreto dalla corteccia surrenale. Il cortisolo è anche noto come ormone dello stress a causa del suo ruolo nella reazione di stress a lungo termine. Nella realtà però viene prodotto continuamente, con un forte ritmo circadiano. In particolare, la secrezione presenta un picco al mattino e diminuisce durante la notte. Il cortisolo è fondamentale per la vita. Uno dei più importanti effetti che ricopre è quello di prevenire l'ipoglicemia, ovvero un basso valore glicemico nel sangue che, come abbiamo visto, è fondamentale per la sintesi di ATP. Quando la concentrazione plasmatica di glucosio diminuisce, in risposta si ha la secrezione del glucagone che promuove la gluconeogenesi e la glicogenolisi. In entrambi i casi, si ottiene glucosio che verrà ovviamente sfruttato per produrre energia. L'assenza di cortisolo è un problema perché il glucagone non è in grado di contrastare efficacemente l'ipoglicemia. Tuttavia, anche un aumento importante di questa sostanza non è totalmente positivo. In particolare, inibisce la sintesi di diverse componenti come proteine, ormone della crescita (fondamentale per un adeguato sviluppo muscolo-scheletrico) e testosterone, e inoltre ostacola il catabolismo della massa cutanea, muscolare, ossea. Il catabolismo rappresenta l'insieme dei processi che portano alla degradazione proteica con liberazione di energia sotto forma di ATP. Quando si è affetti da una forma sintomatica di catabolismo muscolare, il corpo tende a perdere in modo significativo il quantitativo di fibre muscolari contrattili, che permettono la compensazione proteica e dunque uno stato di equilibrio del tessuto muscolare. Questo significa che per innalzare il livello di zuccheri nel sangue, si attiva la sua funzione catabolica che porta alla trasformazione degli aminoacidi in carboidrati, piuttosto che in proteine. Se tale situazione di

compensazione perdura nel tempo, a causa di una forma di stress cronico, si avrà inevitabilmente una demolizione delle strutture proteiche muscolari.

Le prestazioni fisiche sono compromesse quando un individuo è disidratato di appena il 2% del peso corporeo. Perdite superiori al 5% del peso corporeo possono diminuire la capacità di lavoro di circa il 30%. Gli atleti di sprint sono generalmente meno preoccupati per gli effetti della disidratazione rispetto agli atleti di resistenza, grazie alla brevità della loro attività. Tuttavia, la capacità di eseguire esercizi ad alta intensità, che si traduce in esaurimento in pochi minuti, è ridotta fino al 45% da una precedente disidratazione corrispondente a una perdita di solo 2,5% del peso corporeo.

2.3 Metodi tradizionali per la valutazione dell'idratazione

Per la rilevazione dello stato di idratazione si può agire su diversi aspetti. Una tecnica comunemente usata è quella di misurare i cambiamenti del peso corporeo (ovvero la percentuale di perdita di massa corporea %BML) che si verificano durante brevi periodi di tempo. Quando un individuo è in equilibrio calorico, una perdita di peso corporeo equivale essenzialmente alla perdita di acqua. Le misurazioni del peso corporeo devono essere effettuate in condizioni standard, preferibilmente al mattino a digiuno e dopo la minzione e la defecazione.

Si può misurare l'idratazione anche attraverso il calcolo dell'osmolarità (osmol/L) o osmolalità (osmol/Kg) in quanto, nelle soluzioni acquose diluite, le concentrazioni molari si avvicinano molto alle concentrazioni molali. La valutazione dell'osmolarità plasmatica o sierica risulta essere la tecnica maggiormente utilizzata per i test in laboratorio e indica la concentrazione di elettroliti e altre molecole come glucosio e urea nel sangue. All'aumentare dell'osmolarità cresce la secrezione dell'ormone diuretico ADH che permette di equilibrare i livelli dei soluti, assorbendo acqua dai reni. Per l'uomo, l'osmolalità sierica normale è compresa tra 282-295 mOsm /kg , mentre l'osmolalità della saliva generalmente si trova in un intervallo di 70-80 mOsm / kg. Quando si riscontra un caso di ipernatriemia, ovvero una condizione di disidratazione ipertonica, un aumento di urea nel sangue non è un valido indicatore del bilancio idrico poiché il rilascio di ADH e della sete non vengono avviati e il valore di osmolarità così rilevato dipende anche dalla funzionalità renale e dall'assunzione di proteine.

Figura 2: regolazione osmotica a livello delle cellule acinari, nelle ghiandole salivari

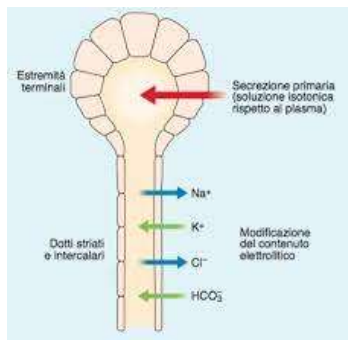
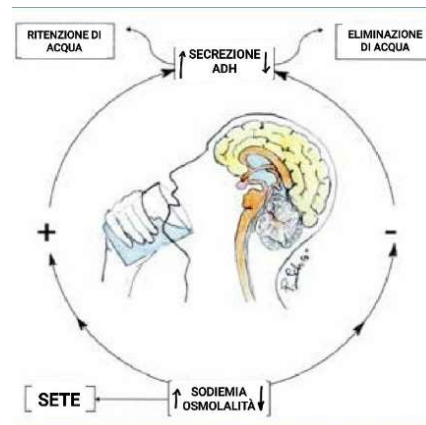
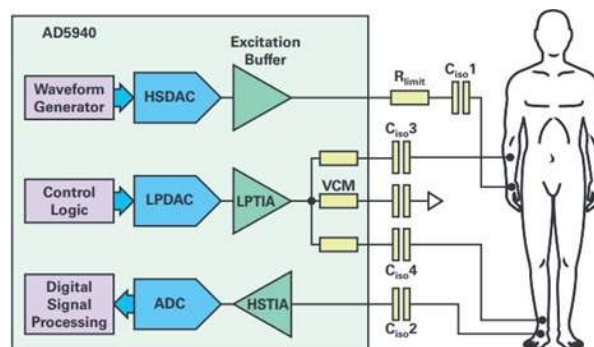


Figura 3: Regolazione osmolalità



Si può sfruttare anche il calcolo della bioimpedenza. Si tratta di una tecnica che misura la resistenza del tessuto corporeo e dell'acqua nel momento in cui vengono sottoposti a un corrente elettrica, di intensità nota, che scorre nel corpo. L'impedenza è determinata dal volume idrico, mentre il flusso è favorito dagli elettrodi disciolti in essa. Le membrane cellulari si comportano da condensatori e, a seconda della loro densità, sarà possibile andare a definire il valore della componente capacitiva. Il metodo utilizzato è facile e riproducibile però a causa di problemi come la postura scorretta del paziente, il posizionamento degli elettrodi, l'inadeguato contatto cutaneo, cambiamenti di osmolalità plasmatica e concentrazione plasmatica di sodio, non la rendono adatta a misurare le alterazioni del livello di acqua nel momento in cui è inferiore a un litro.

Figura 4: esempio di dispositivo per calcolare la bioimpedenza



Fonte: "Bioelectrical Impedance Analysis in Monitoring of the Clinical Status and Diagnosis of diseases"

Un ulteriore metodo utilizzato è quello dell'esame delle urine con cui si valuta l'osmolarità, il peso specifico o il volume in 24 ore. Da tale studio però, si rileva il volume recente dei liquidi ingeriti e non lo stato di idratazione. Anche il colore viene spesso utilizzato come parametro indicatore attraverso l'utilizzo di una tabella in cui vengono riportati i vari colori che l'urina può assumere.

Per l'applicazione in ambito sportivo, l'obiettivo è trovare un sistema che permetta di eseguire uno studio non invasivo, evitando ad esempio le analisi del sangue, che fornisca informazioni in tempo reale, quindi, senza che l'analisi dati sia eseguita in laboratorio, e che fornisca risultati accettabili, il più veritieri possibili sullo stato d'idratazione dell'atleta. Per soddisfare tutti questi requisiti, risulta essere utile lo studio di sudore e saliva. Dopo aver mostrato una panoramica sui criteri e sulle varie tipologie di biosensori utili per il monitoraggio dell'idratazione, applicabili anche su queste due componenti, verranno approfondite singolarmente le misurazioni attraverso il sudore e la saliva. Pertanto, sarà possibile valutare i loro punti di forza e le loro criticità, per verificare che siano effettivamente affidabili per l'utilizzo sportivo.

3. SENSORI PER LA MISURA DELL'IDRATAZIONE

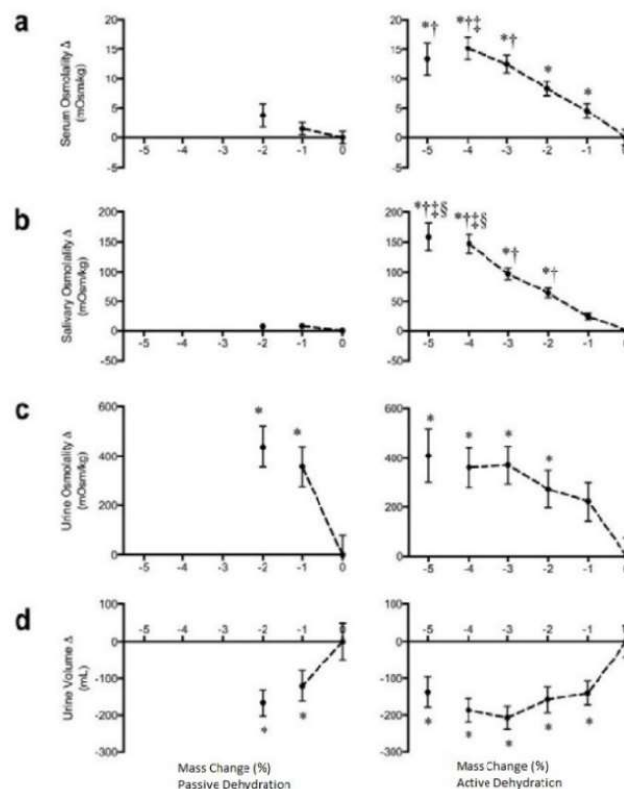
L'utilizzo di sensori in ambito sportivo risulta essere sempre più frequente in quanto permette agli atleti di ricevere informazioni riguardanti le loro prestazioni e le loro condizioni di salute fisica in tempo reale. È possibile misurare diversi parametri, come il classico cronometraggio ma anche la velocità, l'accelerazione, la frequenza cardiaca, la temperatura, l'idratazione etc. Un sensore è un dispositivo che rileva e risponde a un qualche tipo di input fisico dall'ambiente e lo converte in un dato che può essere interpretato sia da un computer, sia dall'essere umano stesso. L'atleta, in questo caso, è il generatore di dati, ovvero fornisce le informazioni necessarie al sensore, affinché esso sia in grado di inviare un output relativo all'analisi della prestazione appena compiuta. Il dispositivo costituisce quindi un vettore dei dati e si può sfruttare in via diretta o indiretta. Nel primo caso, il sensore viene applicato a contatto con la pelle o addirittura impiantato. Nel secondo caso, si usano sensori intelligenti (come pantaloncini, magliette, scarpe), dispositivi indossabili (orologi, cinturini) e attrezzature (sensori applicati a palloni, mazze).

3.1 Criteri da valutare durante la misurazione

Le analisi che vengono compiute fanno riferimento a biomarcatori, ovvero le molecole biologiche che si possono rilevare nel sangue, nei fluidi corporei o nei tessuti che sono un segno di un normale o anormale processo, o di una condizione di malattia. I biomarcatori che vengono maggiormente studiati per monitorare l'idratazione corporea sono l'osmolalità a livello sierologico, salivare e urinario, il volume e il peso specifico delle urine. È fondamentale poi valutare il contesto in cui vengono sottoposte le analisi. Innanzitutto, cambia a seconda che la rilevazione venga fatta prima o dopo l'allenamento ed è utile per definire le raccomandazioni sul consumo di liquidi per il recupero ottimale. Se si esegue un monitoraggio su più giorni, si vuole capire se l'assunzione di liquidi e cibo sia adeguata a garantire uno stato idratato anche durante i periodi critici dell'allenamento. Inoltre, si considera anche lo stato dell'atleta, cioè se è passivo o attivo. È passivo quando non sta compiendo alcuna attività motoria e in questo caso i cambiamenti progressivi e di grandi dimensioni si osservano più facilmente nelle variabili urinarie rispetto a quelle sieriche e salivari. Al contrario, durante l'attività, i marker sierici e salivari rispondono in modo più preciso alle perdite di acqua corporea. Tali risultati sono probabilmente spiegati attraverso

l'emoconcentrazione e la regolazione autonoma che, durante un esercizio fisico e un'esposizione al calore, fanno sì che i liquidi extracellulari siano maggiormente concentrati e che la gittata cardiaca sia deviata, limitando il suo accesso ai reni. Dalla figura 5 è interessante osservare che, a livello attivo, l'osmolalità della saliva del grafico b) presenta dei valori piuttosto alti, maggiori rispetto a quelli del sangue del grafico a). Questo la rende un buon indicatore per lo studio. Nello stato passivo invece, è più conveniente valutare le urine. Tuttavia, l'affidamento a un singolo indicatore rende lo studio piuttosto riduttivo a causa degli innumerevoli effetti che si possono manifestare dalla maggior parte dei biomarcatori. Anche l'analisi di test isolati o poco frequenti fornisce informazioni limitate, in quanto si riscontra una grande varietà interindividuale di misurazione e così facendo si hanno troppi pochi intervalli di riferimento. È importante quindi assumere una certa flessibilità associata alle sensazioni soggettive di affaticamento di un atleta e ai periodi di maggior stress fisico, come può essere ad esempio durante una stagione di gare.

Figura 5: Nella colonna di sinistra vengono riportati i risultati passivi, mentre a destra quelli attivi, rispettivamente di a) per l'osmolalità sierica, di b) per l'osmolalità salivare, di c) per l'osmolalità urinaria, di d) per il volume delle urine

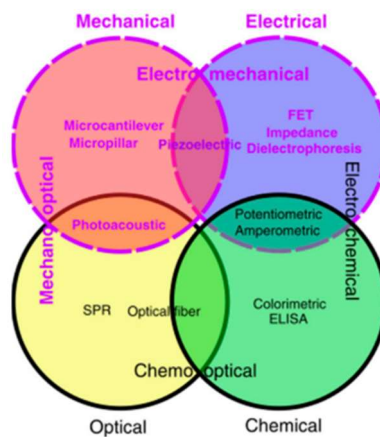


Fonte: "Optimal Hydration Biomarkers: Consideration of Daily Activities", aprile 2014

3.2 Classificazione dei biosensori

I biosensori sono caratterizzati da una particolare varietà sia in termini di principio di trasduzione, che in ambito applicativo. Il funzionamento di base prevede di convertire una stimolazione esterna di tipo fisica e/o biologica in una risposta facilmente lavorabile e identificabile, come può essere un segnale elettrico. La classificazione dei biosensori, più comunemente riportata, si basa sul tipo di trasduzione utilizzata per il rilevamento e l'analisi del segnale.

Figura 6: Biosensori categorizzati in diversi campi a seconda dei metodi di ispezione e di trasduzione del segnale



Fonte: " Biosensors Based on Mechanical and Electrical Detection Techniques", settembre 2020

1. I sensori elettrochimici sono costituiti da tre componenti principali: un campione o analita che rappresenta la componente che si vuole ispezionare, un recettore che permette di legare il campione con il dispositivo e un trasduttore che converte la reazione chimica in un segnale elettrico misurabile. A seconda che il segnale in uscita correlato con la quantità di analita sia una corrente, un potenziale o una variazione di impedenza, si parlerà rispettivamente di sensori amperometrici, potenziometrici o impedimetrici. Nella maggior parte dei sensori elettrochimici, può essere coinvolta una reazione elettrochimica che avverrà sulla superficie dell'elettrodo di lavoro, ovvero il principale della cella elettrochimica, generalmente composta da due o tre elettrodi. Questa tipologia di sensori permette di monitorare un'ampia gamma di biomarcatori, in modo

continuo e non invasivo, e probabilmente sono tra i più utilizzati in ambito sportivo, in quanto sono facilmente adattabili su componenti indossabili. Infatti, sono stati sviluppati sotto forma di accessori, abbigliamento integrato, attacchi e inserzioni per il corpo. I dispositivi diagnostici basati su tessuti, incorporano sensori come elettrodi che vengono direttamente cuciti su di essi, ma anche attuatori e unità di controllo. Tali dispositivi sono specialmente utilizzati per lo studio di saliva e sudore, entrambi facilmente accessibili senza ostacolare le prestazioni di un atleta. Hanno il vantaggio di essere tendenzialmente poco costosi, sono facili da reperire e riprodurre, possono essere piuttosto specifici per un'analisi di interesse. Tuttavia, il grado di selettività dipende dal tipo di sensore utilizzato e dal target in studio e può subire delle interferenze a causa di altri fattori esterni quali la temperatura, movimenti bruschi, umidità e altro.

2. I biosensori ottici sono in grado di rilevare una stimolazione luminosa e convertirla in un segnale elettrico, sfruttando quindi l'interazione del campo ottico con un elemento di riconoscimento, con l'obiettivo di produrre un segnale che sia proporzionato alla concentrazione di una sostanza. Il rilevamento può essere suddiviso in due modalità generali. Con il label-free, il segnale rilevato viene generato direttamente dall'interazione del materiale analizzato con il trasduttore. Al contrario, con il label-based, il segnale ottico si ottiene con un metodo colorimetrico, di fluorescenza o di luminescenza. In sintesi, la colorimetria mostra come una stimolazione esterna fa cambiare lo stato attuale dell'ambiente analizzato, attraverso una variazione di colore del sensore. Con la fluorescenza invece, si sfruttano delle particolari biomolecole marcate che vengono immobilizzate ed emettono una fluorescenza in seguito alla reazione con un'analisi. Infine, la luminescenza si basa sull'emissione di luce da parte di batteri vitali in risposta a un qualsiasi cambiamento chimico, biologico o fisico dell'analisi. Per il monitoraggio dell'idratazione la tecnica maggiormente utilizzata è quella colorimetrica in quanto permette di ottenere un risultato in tempo reale, facilmente interpretabile e a basso costo. Questo metodo verrà maggiormente approfondito nella sezione 5.3.
3. I biosensori meccanici misurano le forze meccaniche di origine chimica, gli spostamenti e i cambiamenti di massa dei processi cellulari e subcellulari.

L'elemento centrale in molti biosensori meccanici è un piccolo cantilever sensibile alla biomolecola di interesse. Il cantilever è una sorta di trave che è in grado di rilevare una sollecitazione superficiale o di agire in modalità dinamica. Nel primo caso, delle molecole si legano alla superficie e sviluppano uno stress dovuto a una repulsione o attrazione elettrostatica. Tale interazione causa una deflessione della struttura che viene poi misurata per definire lo sforzo. Questo aspetto verrà maggiormente approfondito nella sezione 6.3. Nel secondo caso invece, i dispositivi non sono statici e oscillano con una certa frequenza che varia quando le molecole si posano sul cantilever. A seconda dell'ambito di applicazione seguirà delle modalità di funzionamento differenti. Seppur i sensori meccanici siano molto utili grazie alla loro robustezza e alla facilità con cui si possono adattare in ambito biologico, presentano delle limitazioni che riguardano la loro specificità. Infatti, può capitare che alcune specie siano presenti a concentrazioni molto più elevate rispetto alla molecola target, facendo sì che siano proprio quelle in quantità maggiori che si legano al sensore, rilevando quindi molte interazioni non specifiche.

4. MISURAZIONE DELL'IDRATAZIONE DAL SUDORE

Il sudore viene prodotto da due tipi principali di ghiandole sudoripare: eccrine e apocrine. Le ghiandole eccrine sono le più numerose, distribuite su quasi tutta la superficie corporea e sono responsabili della maggiore secrezione di sudore. Al contrario, le ghiandole apocrine hanno un ruolo minore nella produzione complessiva poiché sono limitate a regioni specifiche del corpo, come nel cuoio capelluto, nelle ascelle e nell'inguine. Le loro secrezioni possono comunque influire sulla composizione del sudore raccolto sulla superficie della pelle, ma non svolgono funzioni rilevanti per la termoregolazione dell'organismo. Si limitano infatti a produrre un fluido, dall'odore pungente, ricco di feromoni, a cui si attribuisce la risposta a stimoli emotivi, tra cui ansia e paura o di attrazione sessuale.

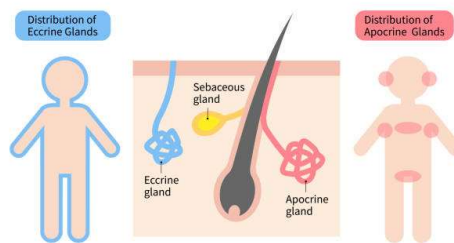


Figura 7: Distribuzione delle ghiandole eccrine e apocrine nel corpo umano

4.1 Ghiandole eccrine

Gli esseri umani hanno circa 2-4 milioni di ghiandole eccrine in totale. La densità della loro distribuzione sulla superficie corporea non è uniforme. La maggior parte delle ghiandole si localizza sui palmi delle mani e sulla pianta dei piedi ($\sim 250\text{--}550$ ghiandole/cm²) ed esse sono responsabili delle risposte agli stimoli emotivi, oltre che termici. In corrispondenza del viso, del tronco e degli arti, la densità è circa 2-5 volte inferiore ma è distribuita su una superficie molto più ampia.

Le ghiandole eccrine hanno una struttura glomerulare, di diametro variabile tra 0.1 mm e 1 mm, e presentano un dotto escretore che sbocca sulla superficie cutanea. Il glomerulo è composto da due strati cellulari. Un primo strato esterno, di cellule mioepiteliali, il cui compito principale è quello di premere le ghiandole per permettere

la fuoriuscita del sudore. Lo strato più interno invece, è costituito da cellule secernenti, che si suddividono a loro volta in cellule chiare e scure. Quelle chiare sono a contatto con le cellule mioepiteliali e sono responsabili della produzione della componente idrosalina del sudore, che ha quasi lo stesso livello isotono del plasma sanguigno. L'azione delle cellule scure, invece, è poco chiara, si pensa che possano agire come deposito di vari materiali bioattivi coinvolti nella regolazione della formazione delle cellule chiare e dei dotti. La funzione principale del dotto è di ottenere il sudore a partire da un riassorbimento di elettroliti dalla soluzione che vi scorre all'interno.

Le ghiandole eccrine sono il mezzo principale di termoregolazione del nostro corpo in quanto riescono a rispondere efficacemente agli stimoli termici, in particolare all'aumento della temperatura interna del corpo, ma in piccola parte anche della temperatura cutanea e all'aumento associato al flusso sanguigno cutaneo. Un aumento della temperatura corporea viene rilevato dai termocettori centrali e cutanei e tale informazione viene elaborata dall'area preottica dell'ipotalamo, per innescare la risposta sudomotoria. La sudorazione termica è mediata prevalentemente dalla stimolazione simpatica. I nervi simpatici, distribuiti attorno alle ghiandole sudoripare, sono costituiti da un gran numero di terminali colinergici e da alcuni terminali adrenergici. L'azione dei neuroni colinergici si può osservare quando aumenta la temperatura interna. In risposta a ciò, viene rilasciata acetilcolina, il principale neurotrasmettitore responsabile della sudorazione corporea. Una sua somministrazione, o comunque di suoi analoghi, può stimolare direttamente i recettori permettendo di attivare una risposta da parte dell'ipotalamo. In particolare, agisce attraverso una vasodilatazione periferica e una vasocostrizione dei vasi viscerali, in modo tale da deviare il sangue verso la regione in cui si ha un maggior accumulo di calore, che andrà poi disperso proprio attraverso la sudorazione. L'azione dei terminali adrenergici, invece, si verifica meno frequentemente e si attiva nel momento in cui la temperatura cala. L'effetto che si ottiene è una vasocostrizione che permette ai vasi di aumentare la loro resistenza e di dirottare il flusso verso quelli con una resistenza inferiore. Tale risposta mantiene il sangue più caldo lontano dalla superficie più fredda, riducendo così la perdita di calore, in modo tale da conservarlo. Le ghiandole eccrine svolgono dunque anche un controllo sull'osmosi, ovvero il fenomeno che permette alla soluzione acquosa di diffondersi attraverso la membrana semipermeabile, tale per cui è possibile il fenomeno della

sudorazione. L'acqua è in grado di muoversi liberamente tra le cellule e il liquido extracellulare e si distribuisce per diluire la soluzione più concentrata, affinché la differenza intra ed extracellulare si eguagli. Si spostano quindi secondo gradiente di concentrazione. L'assestamento della soluzione si ha grazie alla pressione osmotica, che permette di opporsi al processo, una volta che è stato stabilizzato il livello di concentrazione.

4.2 Sudore: meccanismo di secrezione e riassorbimento

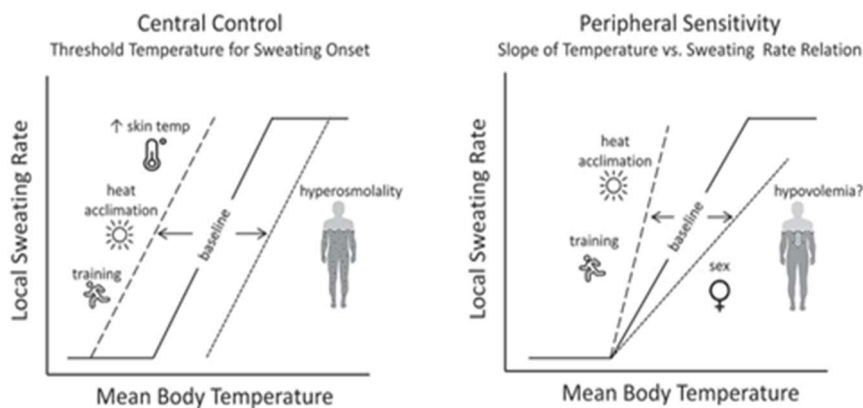
Il sudore è una soluzione elettrolitica diluita composta per il 99% da acqua, cloruro di sodio, potassio, bicarbonato, calcio, magnesio, lattato, ammoniaca e urea, tra i principali. La sua produzione ha inizio dalla secrezione di un fluido isotonico nel corpo globulare della ghiandola, a partire dalle cellule chiare, per poi spostarsi verso il dotto. In primo luogo, si ha l'attivazione del cotrasporto Na-K-2Cl, tale per cui la maggior parte degli ioni Na^+ e Cl^- vengono riassorbiti, mentre il sudore scorre attraverso il dotto. Il risultato è un fluido ipotonico escreto sulla superficie della pelle. Il trasporto di Na^+ attraverso le membrane cellulari è un processo attivo, regolato dalla concentrazione plasmatica di aldosterone e/o dalla sensibilità delle ghiandole sudoripare a esso. La quantità di aldosterone circolante cambia in modo acuto in risposta a fattori come l'esercizio fisico e la disidratazione. Infatti, la sua concentrazione nel sangue può diminuire in seguito all'acclimatazione al calore. Al contempo però, il riassorbimento del sodio aumenta grazie all'esercizio e l'acclimatazione. La ghiandola sudoripara dipende quasi esclusivamente dal glucosio, come sua fonte di carburante. Sebbene essa sia in grado di utilizzare il lattato e il piruvato come fonti di energia, questi intermedi sono meno efficienti del glucosio. Infatti, la rimozione di glucosio e ossigeno inibisce la produzione di sudore. Di conseguenza, le concentrazioni di lattato (come prodotto finale della glicolisi) e NaCl nel sudore aumentano bruscamente, destabilizzando il corretto bilancio osmotico e omeostatico.

È possibile individuare diversi fattori che modificano il controllo della sudorazione.

L'acclimatazione aumenta il tasso di sudorazione di tutto il corpo, mentre presenta effetti variabili a livello regionale. In particolare, permette di ridistribuire la sudorazione in modo più uniforme su tutto il corpo, migliorando quindi quella che è la risposta dell'organismo. Con un allenamento aerobico invece, permette di diminuire la soglia di insorgenza del sudore, favorendo il processo di raffreddamento del corpo. La

disidratazione al contempo ritarda la risposta della sudorazione a causa dell'iperosmolarità che aumenta la soglia della temperatura corporea per l'inizio della sudorazione. I fattori ambientali e una continua esposizione ai raggi UV causano un aumento della sudorazione a causa dello stress termico, così come un'intensa attività fisica, per cui la produzione di calore metabolico è proporzionale al dispendio energetico. Anche la massa corporea e il sesso di un individuo sono fattori determinanti. In particolare, un uomo tende a sudare di più rispetto a una donna poiché presenta un'elevata reattività colinergica e anche una maggiore massa, che produce più calore metabolico. Si ritiene che i cambiamenti nella soglia della temperatura di sudorazione siano di origine centrale (ipotalamica), mentre i cambiamenti nella sensibilità siano periferici (a livello delle ghiandole sudoripare).

Figura 8: mostra come cambia il livello della sudorazione a seconda della condizione fisica a cui viene posto l'organismo e a seconda di come risponde il sistema nervosa centrale (a sinistra), periferico (a destra)



Fonte: "Wearable Sensors for Monitoring the Physiological and Biochemical Profile of the Athlete", pubblicato nel luglio 2019

Il sudore rappresenta una ricca e conveniente fonte di biomarcatori sia grazie alla sua abbondanza a livello di composizione che a livello di semplicità di estrazione totalmente non invasiva, a differenza di quanto invece avviene con i tipici prelievi di sangue venoso. Tuttavia, lo studio di tale fluido corporeo presenta delle limitazioni, importanti da considerare. Innanzitutto, non è ben nota la correlazione tra sangue e sudore, in quanto presentano valori di concentrazioni di sostanze differenti. La sua composizione, inoltre, può variare molto a seconda della persona, in quanto ciascuno ha un proprio stile di vita e abitudini. Può cambiare notevolmente a seconda dello stato di idratazione, dall'acclimatazione al calore, dall'ambiente in cui si vive, dalla dieta, dallo stato attivo o

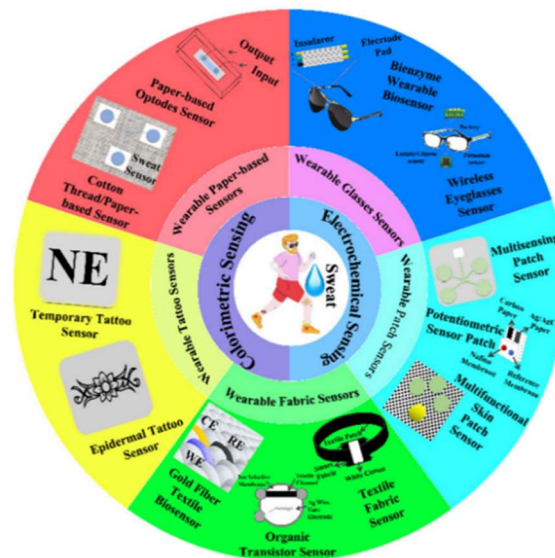
passivo, ma anche dal metodo di raccolta di sudore che viene utilizzato. In alcuni casi le concentrazioni possono essere alterate da carenze o da disturbi del sistema omeostatico.

L'accuratezza e l'affidabilità della metodologia utilizzata per l'esecuzione della misurazione può cambiare a seconda degli accorgimenti che vengono attuati. Il risultato dipende innanzitutto dallo stato di preparazione e pulizia della pelle. Il sudore raccolto sulla superficie della cute può contenere, non solo sudore termico secreto dalla ghiandola sudoripara eccrina, ma anche dal contenuto residuo del dotto sudorifero, secrezioni di sebo, cellule epidermiche e altri contaminanti. La concentrazione di tali costituenti può essere in diversi casi non trascurabile, tale da alterare l'intero studio. Anche la tecnica utilizzata per la stimolazione della secrezione di sudore può manifestare riscontri differenti. L'esercizio fisico può essere un esempio (stimolazione termica attiva), ma anche grazie a saune (stimolazione termica passiva) o farmaci che inducono una risposta colinergica locale delle ghiandole. Un'altra importante condizione di protocollo è la posizione anatomica della raccolta del sudore, che deve essere specifica per la ricerca di interesse. Ad esempio, nella parte bassa della schiena è possibile raccogliere la quantità maggiore del sudore. La variabilità regionale della velocità di sudorazione e delle concentrazioni dei suoi costituenti fa sì che i dati ottenuti non possano essere generalizzati ad altre superfici o all'intero corpo. Infine, uno degli aspetti più importanti, è che i risultati ottenuti da persone diverse, anche se con le stesse condizioni di analisi, non saranno mai uguali, perché il livello di sudorazione, la velocità dell'azione e le concentrazioni dei suoi marcatori cambiano da individuo a individuo.

5. SENSORI INDOSSABILI PER IL MONITORAGGIO DEL SUDORE

Le tipologie di sensori per il monitoraggio e l'analisi del sudore, per quanto variegata, sono accumulate nello specifico da tre componenti: una porzione per la raccolta del sudore, una per la determinazione dell'analita presa in esame e per la processione dei dati, infine una componente per la trasmissione dei risultati ottenuti. La *figura 9* mostra come è possibile classificare questi dispositivi, anche a seconda della tecnologia e della tecnica di rilevamento utilizzata. Quelli più comuni e adoperati sono sicuramente i patch e i sensori indossabili in quanto risultano essere comodi per l'atleta e consentono di avere un risultato in tempo reale.

Figura 9: schema riassuntivo delle varie tipologie di sensori utilizzati per la rilevazione del sudore



Fonte: "Wearable sensor for continuous sweat biomarker monitoring", luglio 2022

I cerotti assorbenti possono essere utili per misurare il volume del sudore locale nei punti di adesione e nel complesso si tratta di sensori semplici, flessibili e a basso costo, che permettono un'ottima riproducibilità. Si potrebbero riscontrare però dei problemi legati alla precisione poiché il sudore in superficie si asciuga molto velocemente, limitando il tempo a disposizione per la rilevazione. Inoltre, le caratteristiche dinamiche della pelle, incline a formare rughe e irregolarità, può essere spesso una complicanza nel mantenere il giusto contatto tra cerotto e pelle. Proprio per queste ragioni, si utilizzano i sensori indossabili, applicabili sottoforma di bracciali o banda, ma anche in

abbigliamento tessile. Per la realizzazione di sensori tessutali si utilizzano spesso dei fili di cotone con silicato organico, integrati poi con dispositivi elettronici a bassa potenza. Sono molto duttili ed hanno quindi una buona resistenza alla trazione, permettendo inoltre di eseguire misure continue e forniscono informazioni utili per conoscere i protocolli di recupero dell'atleta. Tuttavia, i transistor elettrochimici convenzionali, utilizzati in questi casi, hanno un'insufficiente selettività e rispondono con difficoltà a una grande varietà di ioni. Entrambe queste tipologie di dispositivi fanno riferimento a tecniche di rilevazione microfluidica, ovvero di controllo della meccanica dei fluidi, molto utile in quanto la raccolta del sudore è relativamente difficile da compiere a causa del basso volume di secrezione, della rapida volatilizzazione e della varia quantità di secrezioni in diverse parti del corpo.

5.1 Criticità nella progettazione

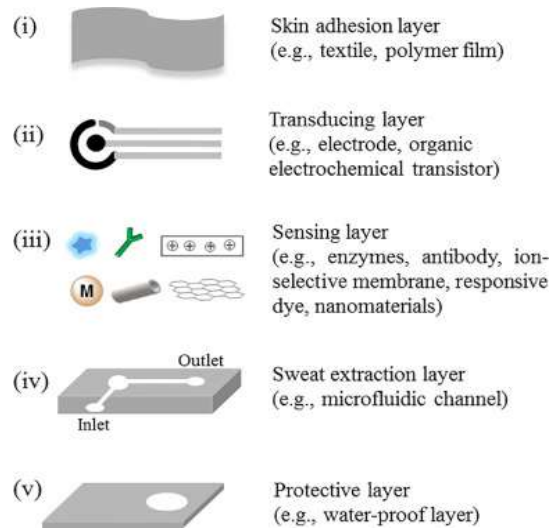
In generale, per la progettazione di sensori indossabili è fondamentale tenere in considerazione diversi aspetti. Un dispositivo di questo tipo è influenzato dalla temperatura, sia dell'ambiente esterno sia del calore ceduto dal lavoro fisico, che influenzerà di conseguenza più o meno la conduttività, le prestazioni di rilevamento e la trasmissione dati. È necessario quindi incorporare all'apparecchiatura un sistema di auto-calibrazione della temperatura. Inoltre, certi sensori necessitano di potenza/energia per funzionare correttamente e allo stato attuale, la capacità delle batterie è generalmente molto bassa. Sfruttare l'attrito e il movimento umano oppure raccogliere energia da radiofrequenze dall'ambiente circostante è inefficiente. Bisogna quindi studiare dei metodi per ridurre il carico e il consumo di energia per limitare il più possibile la dispersione di questa fonte. L'intelligenza attuale dei sensori, che consente cioè di integrare un'ampia gamma di sistemi elettronici come transistor, diodi, componenti a RF, di amplificazione e di ADC non sono facili da produrre. A ciò si aggiunge anche il fatto che si vuole tutto in un unico, piccolo dispositivo, che deve essere flessibile per potersi adattare all'anatomia umana. Molte funzioni complesse però non si riescono a compiere ed è quindi necessario l'utilizzo di chip rigidi, limitando di conseguenza le proprietà meccaniche. Un ulteriore aspetto riguarda le tipologie di informazioni che si vogliono raccogliere, in quanto dal sudore è possibile rilevare molti fattori, però spesso i sensori sono in grado di soddisfare solo il rilevamento di un singolo specifico segnale. Inoltre, le caratteristiche fisiologiche del sudore variano da

persona a persona e anche le informazioni misurate in aree diverse del medesimo individuo sono diverse, influenzate da fattori oggettivi come dieta e farmaci. Quando l'attrezzatura è a contatto con la pelle umana, è importante valutare l'usura, la resistenza del dispositivo, il movimento costante del corpo indotto dalla respirazione, l'adesione e se è dannoso per la pelle. Per il futuro si sta cercando ottenere degli strumenti ancora più completi e adattabili, in modo che siano personalizzabili, ma allo stesso tempo accurati, indipendentemente dal soggetto che li sta utilizzando e dai dati che si vogliono rilevare.

5.2 Generalità: composizione e caratteristiche

Un sensore indossabile è generalmente costituito da una sottile piattaforma che va posta a contatto con la pelle. La base è formata da tre strati, sovrapposti l'uno sull'altro: un'unità di elaborazione, per l'estrazione e il trasporto del sudore in tempo reale; un'interfaccia di rilevamento flessibile che permette al sensore di avere una buona compatibilità con la pelle; un dispositivo elettronico miniaturizzato che può essere indossato oppure formato da un sistema di circuiti per elaborare e trasmettere il segnale, in modo tale da visualizzare il responso da computer o da smartphone. L'interfaccia per il rilevamento flessibile è solitamente anch'essa costituita da più strati, come lo strato di adesione con la pelle, realizzato tramite materiali tessili o sottili film polimerici; lo strato di trasduzione, che comprende l'elettrodo vero e proprio; lo strato di rilevamento in cui sono disposti enzimi, anticorpi, ioni selettivamente permeabili e nanoparticelle; lo strato per l'estrazione del sudore, formato da canali microfluidici; e infine uno strato protettivo, per rendere il sensore impermeabile all'acqua e all'umidità. La varietà delle interfacce permette di ottenere prestazioni migliori e di eseguire più operazioni.

Figura 10: tutti i vari layer che costituiscono il sensore indossabile



Fonte: "Progress in wearable sweat sensors and their Application", gennaio 2019

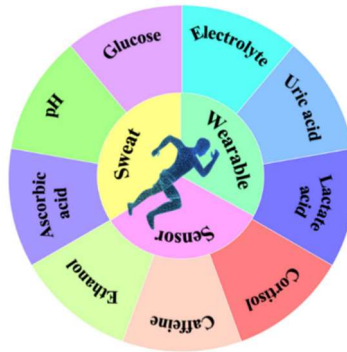
L'integrazione diretta dei biosensori con la superficie della pelle richiede un'attenta progettazione in modo tale da garantire l'utilizzo del dispositivo senza interruzioni e un'acquisizione affidabile dei dati, durante l'allenamento. È fondamentale, infatti, che il sensore sia costituito da materiali morbidi ed elastici per avere una buona adesione e conformabilità in qualsiasi posizione del corpo, a prescindere dal movimento compiuto, senza irritare la pelle e interferire con il rilevamento dei dati. La strategia migliore per ottenere un dispositivo con tutte queste caratteristiche è di combinare più materiali diversi, a partire sia da sostanze organiche che inorganiche e composti ingegnerizzati che uniscono assieme fili nanometrici, membrane e componenti di diverse nature. Per far ciò, sono molto diffuse le tecniche di elettronica stampata, che consentono infatti di sfruttare una più ampia varietà di substrati, rispetto alle tecniche tradizionali. Si può utilizzare la stampa a contatto o senza contatto. Nel primo caso, rientrano tutte le tecniche basate sull'utilizzo di maschere in cui le strutture superficiali sono a contatto con il substrato tatuato. Alcuni esempi possono essere il rotocalco, la serigrafia, la flessografia, offset ed erogazione di micro-contatti. Grazie al loro basso costo e alla rapidità di fabbricazione, sono state per molto tempo le tecniche maggiormente utilizzate. Tuttavia, sono una grande fonte di spreco di materiale (substrati, inchiostri e solventi) e proprio per tale ragione, è stata posta maggiore attenzione sulle tecniche di stampa senza contatto. In questo caso, il sensore viene realizzato attraverso l'erogazione dell'inchiostro, da appositi ugelli, che permette di formare un disegno precedentemente

definito tramite un software CAD, mettendo in movimento la struttura dello strumento. Consente quindi una riduzione degli sprechi e allo stesso tempo semplifica il processo di stampa e migliora la risoluzione.

Le tecniche di stampa permettono di realizzare degli ottimi sensori, con conducibilità, ripetibilità e riproducibilità competitive anche rispetto a quelli più tradizionali realizzati con materiali conduttivi bulk. Inoltre, il fatto di poter combinare insieme diversi materiali favorisce un'integrazione di circuiti microfluidici stampati direttamente con componenti elettroniche integrate, che permettono ad esempio di formare uno strato isolante o strade di conduzione, migliorando i costi e l'efficienza del dispositivo. Per lo studio e il rilevamento dei principali elettroliti presenti nel sudore, per valutare al meglio lo stato d'idratazione, è fondamentale che il sensore abbia un'alta selettività. A tale fine, si sfruttano delle membrane selettive oppure, tecnologie più all'avanguardia, stanno cercando di produrre dei materiali stampabili sensibili per poter sostituire questa componente e migliorare l'accoppiamento elettrochimico tra la superficie di rilevamento e gli analiti bersaglio.

Utilizzando tutti questi accorgimenti è possibile realizzare dei sensori indossabili che sono in grado di misurare direttamente le diverse componenti che costituiscono il sudore e di generare energia, a partire dal sudore stesso. Le concentrazioni dei vari elettroliti presenti nel substrato sono quantificate rilevando i cambiamenti di un segnale elettrico, come la corrente, la tensione o l'impedenza della pelle, a seconda del sistema di lavoro utilizzato. I principi di rilevamento sfruttati sono due: di tipo elettrochimico, che fa spesso uso di celle a biocombustione, e di tipo ottico, con sensori colorimetrici. L'impiego di sensori indossabili è favorito durante un'attività fisica grazie alle grandi quantità di sudore prodotto, che permettono di monitorare in modo dinamico e continuo le composizioni del sudore in movimento, cosa impossibile da ottenere con i metodi di laboratorio convenzionali. I sensori accoppiati con elettrodi iono-selettivi consentono di monitorare in tempo reale i vari marcatori del sudore. I biomarcatori maggiormente rilevati sono il cloruro, il glucosio, il lattato e il pH. Risulta essere spesso utile misurare la velocità di sudorazione locale, per capire quanto sia stata rilevante la perdita, ma si tratta di un processo impegnativo, non implementabile al di fuori del laboratorio.

Figura 11: Schema riassuntivo dei possibili biomarcatori che si possono rilevare attraverso uno studio della composizione del sudore



Fonte: "Wearable sensor for continuous sweat biomarker monitoring", luglio 2022

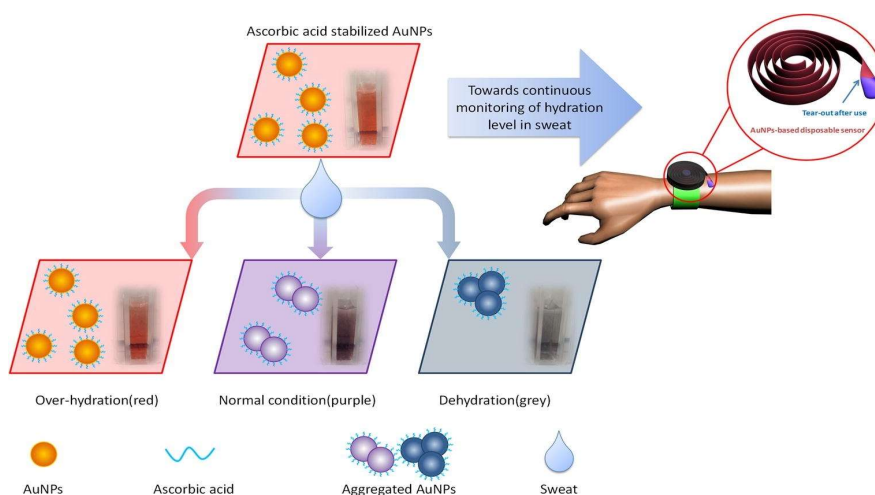
5.3 Sensore colorimetrico: esempio con nanoparticelle d'oro

Per l'analisi di questa tipologia di sensore, è stato preso come riferimento lo studio: *Real-time colorimetric hydration sensor for sport activities*, pubblicato nel febbraio del 2015 da Zhou Yubin, e altri collaboratori, in cui si adopera la colorimetria per definire il livello di disidratazione. In particolare, si utilizza del sudore artificiale come soluzione di riferimento, in cui si disciolgono nanoparticelle d'oro a 0,35 g/L.

La colorimetria esegue un'analisi quantitativa che indica la capacità di assorbimento di una sostanza, una volta che viene irradiata da un fascio elettromagnetico, nel campo visibile. Le sostanze che interessano la colorimetria devono essere colorate o colorabili con l'aggiunta di additivi. Per garantire il massimo assorbimento, conviene scegliere una lunghezza d'onda per la radiazione che corrisponde al colore complementare a quello applicato sulla sostanza. In tale fase è indispensabile lavorare in condizioni di monocromaticità. L'utilizzo di sensori colorimetrici è mirato a monitorare la variazione della concentrazione degli elettroliti nel sudore. Tra gli elettroliti si individuano sali e ioni disciolti, come ad esempio i cationi di sodio che costituiscono la maggior parte degli ioni disponibili. Le nanoparticelle d'oro (AuNP), di dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, presentano buone proprietà ottiche e biologiche; perciò, sono adatte per la trasduzione colorimetrica delle interazioni molecolari. Si preparano principalmente attraverso la riduzione chimica, utilizzando sali d'oro come $HAuCl_4$, come precursore, e citrato, come agente riducente. La loro interazione con la luce, a una certa lunghezza d'onda, può provocare un'oscillazione collettiva di elettroni sulla superficie delle nanoparticelle, nota come risonanza plasmonica di superficie (SPR) che porta a una

forte estinzione del fascio di luce, per assorbimento e per diffusione. La lunghezza d'onda in questione dipende dalle dimensioni, dai cambiamenti locali sulla superficie delle nanoparticelle e dal loro stato di aggregazione/dispersione. In particolare, l'aggiunta di sale può indurre l'aggregazione di AuNP, con conseguente cambiamento di colore a causa dell'alterazione della risonanza. Attraverso la concentrazione di NaCl nel sudore, è possibile quindi valutare lo stato di idratazione nel sudore. Anche solo a occhio nudo si riesce facilmente a osservare il risultato della misurazione, in quanto, a seconda del livello di disidratazione e del tempo di attesa, la soluzione cambia colore.

Figura 12: schema semplificato di come varia il colore della soluzione a seconda dell'aggregazione di AuNP e NaCl, a vari livelli di idratazione corporea.

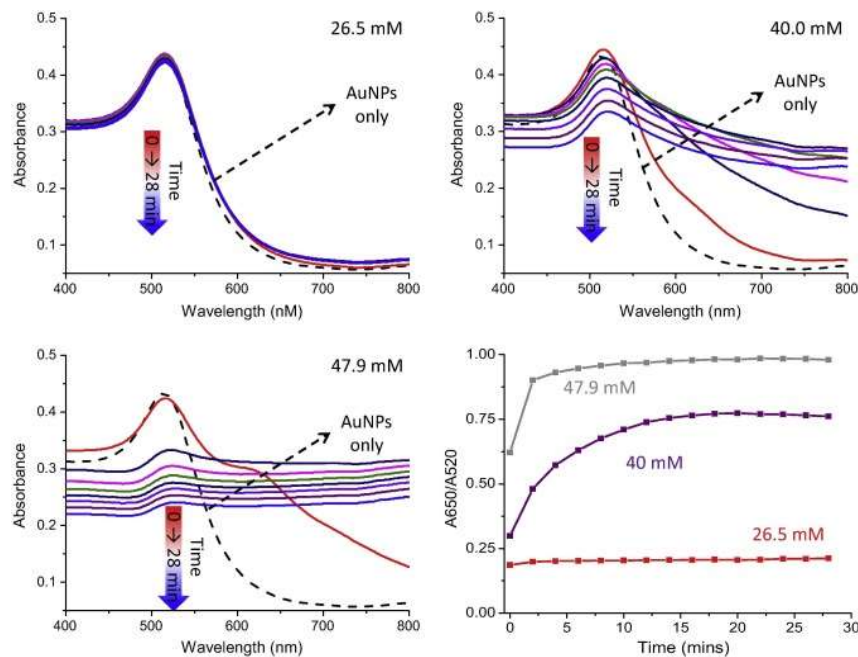


Fonte: "Real-time colorimetric hydration sensor for sport activities", pubblicato nel febbraio 2015

Nello studio, come indicatori di normalità di NaCl sono state adoperate concentrazioni a 47,9 mM, 40 mM, 26,5 mM che corrispondono rispettivamente alle condizioni di disidratazione, normalità fisiologica, iperidratazione. La formulazione finale ottimizzata del pH è di 6,7. La variazione di colore è stata poi verificata misurando gli spettri mediante lo spettrometro UV-Vis. Si tratta di un dispositivo in grado di quantificare l'assorbimento delle radiazioni luminose, appartenenti al campo visibile (350-700 nm) e del vicino ultravioletto (200-350 nm) da parte delle molecole presenti nella soluzione colpita. Esse producono in questo modo delle transizioni energetiche a livello degli elettroni che si trovano nei gusci più esterni, sia se sono impegnati o meno in un legame.

La *figura 13* mostra come cambia l'assorbimento dello spettro nel tempo, in funzione della lunghezza d'onda utilizzata. Si può osservare che a partire da 40 mM di NaCl nella miscela, l'intensità della banda a 520 nm diminuisce e appare una banda intorno ai 650 nm, che indica l'aggregazione delle nanoparticelle. Il miglior indicatore dello stato di aggregazione delle nanoparticelle viene quindi segnato attraverso rapporto di assorbanza a 650-520 nm, il cui comportamento è riportato anche nell'ultimo riquadro in basso a destra in funzione del tempo, a diversi livelli di idratazione. Nel momento in cui le concentrazioni di NaCl aumentano, anche il rapporto aumenta indicando la diminuzione delle particelle disperse e quindi l'incremento delle particelle di AuNP. È proprio l'aggregazione che induce la variazione del colore della miscela ed essa si verifica maggiormente tanto più è elevata la concentrazione di sale nel rapporto. Inoltre, si nota come dopo circa 5-10 minuti viene raggiunto l'equilibrio della soluzione, facendo sì che il colore sia stabile per almeno 30 minuti.

Figura 13



Un'ulteriore analisi che viene eseguita in merito è la misurazione del potenziale Zeta. Si tratta della misura della carica elettrica effettiva sulla superficie della nanoparticella, quantificando le cariche. Intorno alla superficie di tutte le particelle disperse c'è un sottile strato di ioni, di carica opposta. Nella regione circostante sono presenti altri ioni,

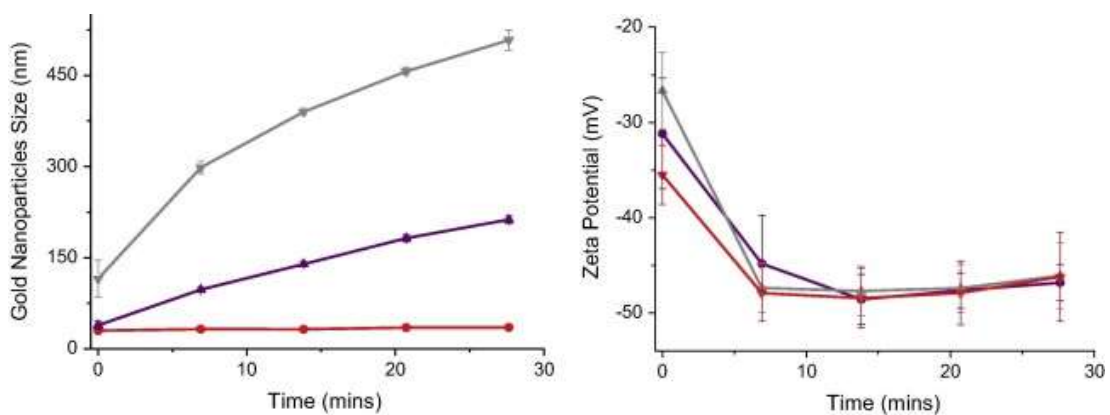
sempre di carica opposta, che si muovono con la particella, mentre viaggia nel mezzo. Il potenziale Zeta indica quindi la tensione che si sviluppa sul piano di scorrimento, tra la superficie della particella e la regione del mezzo in cui si trovano i due strati di carica opposta. Se due particelle adiacenti hanno un potenziale sufficientemente elevato, esse non si agglomerano a causa delle forze di repulsione elettrostatica che si sviluppano. Le particelle cariche all'interno della cellula di muovono nel mezzo a una velocità che è proporzionale al loro potenziale zeta. La relazione che lega la mobilità al potenziale è espressa con:

$$U_e = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta}$$

in cui U_e indica la mobilità della particella, ε è la costante dielettrica, ζ è il potenziale Zeta, $f(ka)$ è la funzione di Henry e η è la viscosità del solvente. È utile realizzare questo studio perché permette di prevedere la stabilità a lungo termine delle particelle.

Nel monitoraggio del sudore, dopo l'aggiunta di NaCl nella soluzione, si osserva con il potenziale Zeta una stabilizzazione dopo appena 10 minuti. In particolare, il comportamento a basse concentrazioni di sale è analogo al ciò che si rileva con lo spettrometro UV-vis, mentre per concentrazioni più elevate si verifica una discrepanza in quanto non si raggiunge il plateau. Tale disuniformità di risultati possono essere dovute dalla difficoltà di misurare accuratamente le dimensioni degli aggregati. Ciò nonostante, i cambiamenti nell'uno e nell'altro caso sono in accordo, mostrando quindi la dipendenza delle particelle con la fase di aggregazione.

Figura 14: dimensione e variazione del potenziale Zeta di AuNP in funzione del tempo, in presenza di diverse concentrazioni di NaCl (rosso per 26,5 mM, viola per 40 mM e grigio per 47,9 mM)



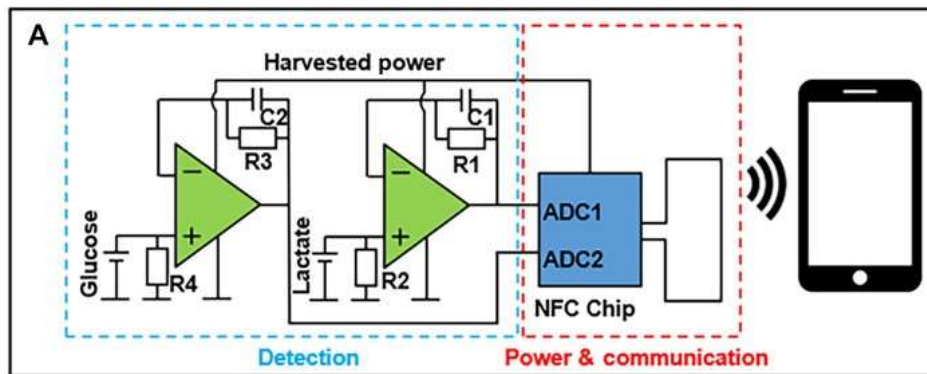
Lo studio analizzato è stato fatto a laboratorio, con del sudore artificiale per l'appunto, però questo sistema permette di ottenere dei risultati in tempo reale, se applicato a un display di rilevamento. Promette un'elevata stabilità e bassi tempi di risposta, con una facile interpretazione da parte dell'atleta, il quale può valutare il suo stato di idratazione semplicemente osservando il colore rilevato dallo spettrometro.

5.4 Sistema ibrido: sensore elettrochimico/colorimetrico

L'articolo pubblicato da Amay J. Bandodkard e collaboratori, nel gennaio del 2019, *Battery-free, skin-interfaced microfluidic/electronic system for simultaneous electrochemical, colorimetric and volumetric analysis of sweat*, presenta un interessante sensore che non fa uso di batteria e che è in grado di analizzare simultaneamente gli aspetti elettrochimici, colorimetrici e anche volumetrici del sudore. Si tratta di un dispositivo ibrido tra un modello colorimetrico e una cella di combustione. Le celle di biocombustione sfruttano le componenti del sudore come fonte da convertire, attraverso reazioni biochimiche, in energia elettrica. Il risultato è un sensore in grado di rilevare in tempo reale la concentrazione di cloruro, lattato e glucosio, contemporaneamente al pH, alla velocità del sudore e alla sua perdita totale, permettendo quindi un monitoraggio completo dello stato di salute. Il dispositivo è costituito da una piattaforma formata da una componente microfluidica morbida, monouso e da un modulo elettronico NFC, i quali si accoppiano magneticamente grazie a sensori elettrochimici già incorporati nel substrato microfluidico. La componente microfluidica inoltre presenta canali e valvole apposite per indirizzare e raccogliere piccoli volumi di sudore, immessi nel sistema dall'azione delle ghiandole stesse. Dispone anche delle componenti circuitali necessarie per l'acquisizione dei dati relativi al lattato e glucosio, su celle a biocombustione. Il supporto elettronico invece, viene utilizzato sia per l'erogazione di energia wireless che per la trasmissione di dati a qualsiasi dispositivo abilitato NFC, come smartphone, orologi o tablet. Tale componente permette di ottenere i dati acquisiti, attraverso la visualizzazione colorimetrica delle varie componenti presenti nel sudore. Il sistema elettronico NFC è costituito da una piattaforma formata da un doppio strato, di rame su poliimmide, che presenta un sistema a radiofrequenza disposto su un chip in grado di far funzionare un microcontrollore e un convertitore analogico-digitale con front-end, ovvero una componente circuitale adatta per filtrare i dati prima della loro conversione ADC. L'elettronica, in via semplificativa, è costituita da un buffer con un filtro ad alta

frequenza che elimina le fluttuazioni introdotte dal campo elettrico durante il debole accoppiamento NFC dell'antenna. Il suo comportamento è piuttosto stabile. Il front-end, infatti, grazie alla sua indipendenza dalla tensione di alimentazione, consente un funzionamento costante e stabile nel momento in cui il trasferimento di potenza causa variazione della risonanza magnetica. Inoltre, l'amplificatore a crossover permette di mantenere operativo un ampio range di tensione che condiziona il segnale del sensore senza distorsioni, a prescindere dalla tensione di alimentazione. Tale stabilità fa sì che le curve tensione-corrente presentino un comportamento regolare durante cicli ripetuti di attacco/distacco magnetico e durante variazione nella risposta di fase, in seguito, ad esempio, a una flessione della piattaforma.

Figura 15: Illustrazione schematica semplificata della lettura del sensore elettrochimico. ADC, convertitore analogico-digitale



Fonte: "Battery-free, skin-interfaced microfluidic/electronic systems for simultaneous electrochemical, colorimetric, and volumetric analysis of sweat", pubblicato nel gennaio 2019

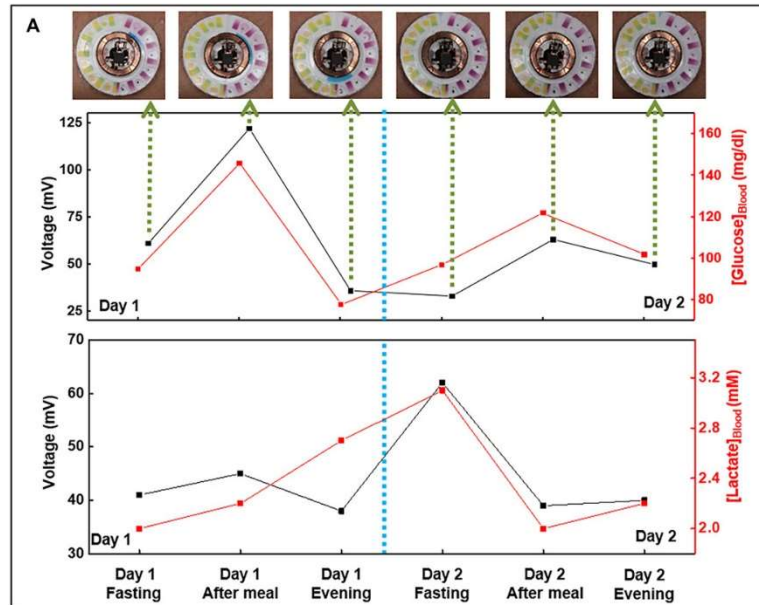
Per la rilevazione del lattato e del glucosio si utilizzano sensori molto simili. Sono infatti costituiti da un anodo e un catodo che interagiscono tra loro attraverso reazioni che permettono di generare correnti elettriche, proporzionali alla concentrazione della sostanza che si desidera misurare. La corrente viene trasformata da un resistore in una tensione per il rilevamento e la trasmissione wireless sempre con l'elettronica NFC. La tensione di uscita aumenta linearmente all'aumentare del carico. Tuttavia, a carichi più elevati, aumenta anche il tempo di risposta. Pertanto, il segnale di tensione generato rimane compreso nell'intervallo 0-1 V.

Uno dei vari test che è stato svolto per la verifica del funzionamento di tale dispositivo, ha messo alla prova sei maschi e due femmine, di età compresa tra i 18 e i 45 anni.

L'analisi si divide in due parti. Sia nella prima che nella seconda serie di studi, i soggetti indossano il dispositivo per due giorni consecutivi sull'avambraccio e ogni mattina eseguono un all'allenamento in bicicletta da 15-20 minuti, a digiuno. Dopo aver consumato una bevanda zuccherata da 150 g, segue il secondo allenamento, sempre da 20 minuti e poi ancora 2 ore dopo pranzo e dopo la cena. Nella prima analisi, si vogliono valutare i valori di concentrazione grazie allo studio colorimetrico sul sudore, in particolare di glucosio e lattato, confrontando i risultati con rilevazioni eseguite tramite strumenti di uso commerciale. La seconda parte invece, si concentra sul monitoraggio delle variazioni temporali dei livelli di glucosio e lattato nel sudore, dovute al consumo di cibo e/o all'esercizio fisico, confrontate invece con i valori misurati dalle analisi del sangue.

La concentrazione del lattato e del glucosio nel sudore variano gradualmente e su scale temporali molto lunghe, consentendo ai sensori basati su celle di biocombustione di avere sufficiente tempo per produrre una risposta stabile. La presenza di altre sostanze chimiche può interferire con la risposta, ritardando il tempo di stabilizzazione. Per il lattato bastano pochi minuti e i segnali rimangono quasi coerenti con quelli ottenuti senza interferenze. Per il glucosio invece, il ritardo è notevole, se confrontato con i dati acquisiti attraverso le analisi del sangue, circa di 30-60 minuti. Tuttavia, le prestazioni del sensore del glucosio diminuiscono minimamente e quindi non reca un grande problema. La sensibilità del dispositivo può variare anche a seconda del pH, in particolare ha un effetto maggiore sulla misurazione del glucosio rispetto a quella del lattato. Invece, se il dispositivo viene posto su una superficie curva, i dati rilevati non vengono particolarmente falsati grazie alla natura sottile e flessibile dei sensori e dalle interconnessioni a serpentina progettate per sopportare sollecitazioni meccaniche. In generale, la deviazione standard relativa dei valori delle concentrazioni si aggira attorno al 6%, il che evidenzia la linearità e la reversibilità della risposta del sensore, con un'isteresi minima per le variazioni nel tempo per intervalli fisiologicamente rilevanti.

Figura 16: Correlazione dei dati acquisiti dai sensori del sudore del glucosio e del lattato basati su celle a biocombustibile con quelli acquisiti dai misuratori di glicemia e lattato, rispettivamente, in un periodo di due giorni



Fonte: "Battery-free, skin-interfaced microfluidic/electronic systems for simultaneous electrochemical, colorimetric, and volumetric analysis of sweat", pubblicato nel gennaio 2019

Uno dei problemi riscontrati con tali dispositivi è la mancanza di batteria poiché questo permette di fornire dati solo quando si ha un lettore nella vicinanza, limitando quindi il campo di utilizzo. Inoltre, le concentrazioni di lattato e glucosio nel sudore seguono dinamiche sì simili a quelle ottenute dagli esami del sangue, ma mostrano maggiore mutabilità da persona a persona. La variabilità può derivare dal fatto che le concentrazioni dei vari biomarcatori nel sangue definiscono gli stessi presenti nel sudore, attraversando però complesse vie biologiche, sensibili a diversi fattori come l'attività metabolica, il livello di insulina e di forma fisica. Per risolvere il problema, servirebbero apposite calibrazioni rispetto ai valori ematici, che richiederebbero però studi su un'ampia popolazione di soggetti impegnati in varie attività fisiche, per ora non ancora associati.

5.5 Esempio di sensore commerciale

Due esempi di biosensori che si possono effettivamente trovare in commercio sono *GX Sweat Patch* e il *Nix Biosensor*. Il primo è stato progettato dall'azienda Gatorade e si tratta di un patch monouso che si applica sul braccio dell'atleta prima dell'allenamento

e mantenuto per tutta la durata della performance sportiva, per un massimo di due ore. Si tratta di un sensore elettrochimico, in grado di rilevare il flusso di sudore e la sua concentrazione di sodio. Il risultato può essere visualizzato immediatamente attraverso la progressiva comparsa di linee, arancioni per valutare il flusso e viola per la concentrazione di Na^+ , oppure scaricando l'apposita applicazione è possibile avere stime più precise e consigli per riequilibrare il livello di idratazione corporea.

Figura 17: Sensore GX Sweat Patch



Il secondo esempio, il *Nix Biosensor*, è stato sviluppato da Nix, un'azienda statunitense e si tratta anche in questo caso di un sensore costituito da un patch. Il dispositivo si suddivide in un cerotto sensibile monouso, a base di idrogel, in grado di restringersi in presenza di sudore, e in un'unità elettronica che si collega al patch di rilevamento. Tale componente permette di acquisire e visualizzare i dati rilevati che possono poi essere anche trasmessi in uno smartphone o tablet. Anche in questo caso, si tratta di un sensore elettrochimico che rileva il flusso di sudore, la sua composizione e la perdita di elettroliti. Attraverso l'applicazione è poi possibile avere un'analisi più dettagliata e anche in questo caso, vengono dati consigli su cosa, quando e quanto bere durante l'allenamento, per mantenersi sempre idratati.

Figura 18 : Componenti del Biosensore Nix



6. MISURAZIONE DELL'IDRATAZIONE DALLA SALIVA

La saliva è prodotta a livello della cavità orale e permette di trasferire dall'interno verso l'esterno dell'organismo fluidi ed elettroliti, generalmente in risposta a una stimolazione neuronale. È secreta principalmente da tre ghiandole maggiori: parotidea, sottomandibolare e sottomandibolare, ma è coinvolto anche un gran numero di ghiandole salivari minori. Il volume di saliva prodotto giornalmente dalle principali si aggira attorno ai 750 ml: un 65% è secreto dalla ghiandola sottomandibolare, 23% dalla parotidea, 4% dalla sottomandibolare ed il restante 8% dalle ghiandole secondarie.

6.1 Ghiandole salivari e secrezione della saliva

Le ghiandole salivari assumono la forma di un tubulo alveolare, contenti acini e un sistema di ramificazioni di dotti che collegano la regione in cui si collocano gli acini con la cavità orale. A partire dagli acini avviene l'effettiva secrezione della ghiandola. Questa prima produzione del fluido viene poi modificata durante il passaggio attraverso i dotti, in cui avviene un considerevole flusso di elettroliti.

La saliva è un fluido incolore, costituita principalmente da acqua (circa 98-99%) e per la restante parte da molecole organiche e inorganiche. Tra queste, le principali sono gli ioni sodio, potassio, cloro e bicarbonato che sono fondamentali per un corretto bilancio osmotico della saliva. Si possono trovare anche proteine che permettono di formare la componente mucosa, oltre che enzimi, batteri e ormoni, in quantità inferiori. Le ghiandole parotidiche producono solo secrezioni sierose, mentre le sottomandibolari e sottomandibolari generano una soluzione costituita sia da muco che da siero. La secrezione salivare è per lo più sotto il controllo del sistema nervoso autonomo e dipende dalla simultanea cooperazione dei nervi simpatici e parasimpatici, seppur non si trovino distribuiti allo stesso modo su tutte le ghiandole. I nervi parasimpatici sono i principali responsabili della secrezione, che generano un fluido contenente bassi livelli di composti organici ed inorganici. Al contrario, dalla stimolazione simpatica, si produce un quantitativo inferiore in volume di saliva, ma che contiene molte proteine e potassio.

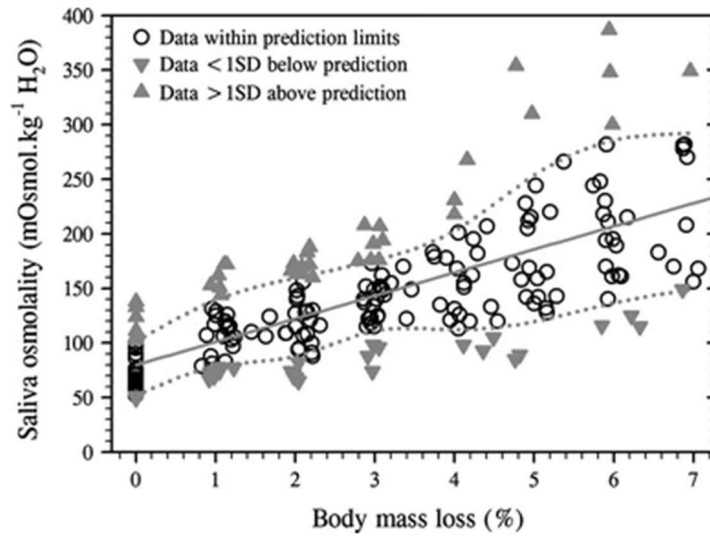
6.2 Parametri di valutazione dell'idratazione

Durante la progressiva disidratazione, indotta dalla combinazione di attività fisica e stress termico, l'osmolalità plasmatica e la concentrazione di proteine plasmatiche aumentano. Quindi, maggiore è lo stato di disidratazione, maggiore è la concentrazione

di questi due fattori nel sangue, proprio perché si riduce il volume plasmatico. Tale effetto, è stato osservato anche a livello della secrezione del flusso salivare. Se si esegue un allenamento prolungato (superiore alle 2 ore) si può raggiungere una perdita di acqua corporea equivalente al 1-3% che si traduce in una minore portata salivare, per effetto della disidratazione o dall'evaporazione della saliva per iperventilazione oppure per l'incremento dell'attività adrenergica da parte dell'organismo. Di conseguenza si verifica un aumento della concentrazione di sostanze, come proteine e NaCl, e dell'osmolalità della saliva. Quando si eseguono invece degli allenamenti brevi ma intensi, la riduzione del flusso può essere spiegata da un aumento dell'attività simpatica durante l'esercizio fisico, in quanto l'innervazione simpatica causa una significativa vasocostrizione nelle arteriole che irrorano le ghiandole salivari e quindi, come risultato, conducono a una diminuzione in volume della secrezione. Inoltre, l'attività fisica comporta un incremento di vasopressina nel sangue, un antidiuretico, che potrebbe ulteriormente diminuire il flusso salivare. Durante la disidratazione acuta e progressiva è possibile trovare una buona correlazione tra la percentuale della perdita di massa corporea %BML e la concentrazione proteica totale nella saliva, l'osmolalità e la portata salivare. Tuttavia, quest'ultimo indicatore non viene considerato valido per poter valutare lo stato di disidratazione in un atleta. Questo perché, sempre considerando un soggetto disidratato, la variazione interindividuale della velocità di secrezione della saliva è piuttosto ampia. Ciò significa che, affinché si possa sfruttare la portata come parametro dello studio, è necessario determinare un range specifico per ciascun individuo, il che lo rende poco pratico. Proprio per questa ragione, gli indicatori più usati per l'analisi sono solo la concentrazione proteica e l'osmolalità, strettamente correlati alla perdita di massa corporea, causata dalla disidratazione, come già spiegato in precedenza. Se misurata insieme alla %BML, l'osmolalità fornisce delle misure più accurate sulla disidratazione acuta rispetto a un test delle urine.

La *figura 19* mostra la relazione tra l'osmolarità della saliva e i cambiamenti nella massa corporea, durante la disidratazione progressiva indotta dall'esercizio fisico e stress termico (nello specifico di questo caso 35,6°C e 56% di umidità). La deviazione standard, sia sopra che sotto della linea tratteggiata prevista dal target, è pari all'1%. Si può notare come all'aumentare della percentuale di massa corporea, aumenta anche l'osmolalità.

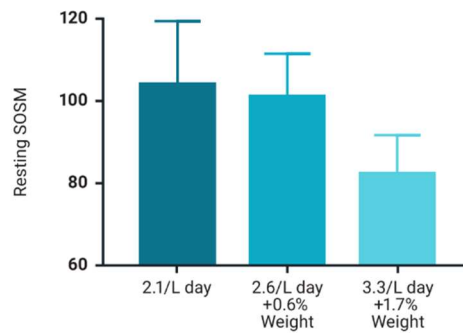
Figura 19: come varia l'osmolalità in funzione della variazione della perdita d'acqua corporea



Fonte: "Observations on saliva osmolality during progressive dehydration and partial rehydration", gennaio 2012

Dalla figura 20 invece si può evincere che un aumento dell'assunzione di acqua su più settimane aumenta il contenuto di acqua corporea che si riflette di conseguenza sull'osmolalità. Per tale ragione, si ha la conferma della capacità di tale parametro di monitorare i cambiamenti acuti e cronici dello stato d'idratazione.

figura 20



Fonte: "The MX3 Hydration Testing System Valutation Test"

L'osmolalità di una soluzione è la sua molalità moltiplicata per il fattore di Van't Hoff (indicato con la lettera i), definita quindi dall'equazione:

$$O = \frac{n_{\text{soluto}} \cdot i}{V_{\text{soluzione}}}$$

Mentre per le soluzioni diluite è semplicemente la molalità totale di tutte le specie ioniche nella soluzione (questo può includere anche materiali organici solubili come zuccheri, peptidi, proteine, etc.). Per una persona idratata, l'osmolalità della saliva è generalmente compresa tra 70 e 80 mOsm/Kg . Le misurazioni dell'osmolalità della saliva sono state in grado di rilevare la disidratazione ipertonica, ipotonica e isotonica con sensibilità rispettivamente del 70%, 78%, 76% e con specificità rispettivamente del 68%, 72% e 68%.

6.3 Sensori microcantilever piezoresistivi incorporati

Uno dei mezzi principali per misurare l'osmolalità della saliva è il sensore microcantilever piezoresistivo (EPM) incorporato. Si tratta di un dispositivo costituito da una piattaforma mobile, il cantilever, che viene utilizzato per misurare fattori di tipo fisico, chimico o biochimico. Su un lato del sensore vengono immobilizzate delle molecole di riconoscimento che interagiscono con un analita, disposto sulla superficie, in modo tale da sollecitare la struttura che subisce deformazione di tipo flessionale. La deflessione è direttamente proporzionale alla concentrazione del target sul piano di ricezione e dipende dalla natura del legame chimico che si sviluppa tra i due. La misura di tale spostamento viene spesso indicata in nanometri e può essere sfruttata da dei fotodiodi per determinare una tensione di uscita proporzionale alla deflessione stessa. In altri casi, si può far uso di un multimetro di precisione, in grado di misurare la variazione di resistenza indotta dalla deformazione, tale per cui:

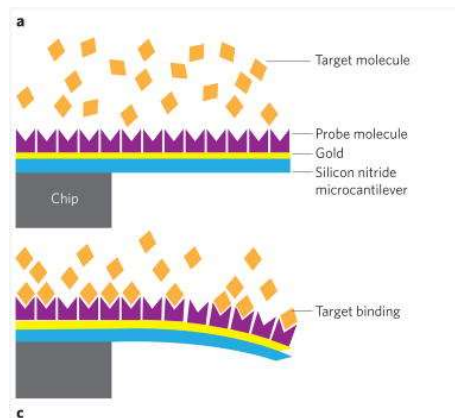
$$\frac{\Delta R}{R} = K\delta$$

Cioè la variazione della resistenza R del materiale è proporzionale di un fattore K alla deformazione δ .

A seconda del materiale di rivestimento che viene applicato alla piattaforma, sarà possibile avere un sensore più o meno sensibile alle variazioni volumetriche di uno o più analiti. Vengono utilizzati polimeri, idrogel, biomateriali o altri materiali ibridi o compositi.

Lo stadio di trasduzione invece, è generalmente costituito da un ponte di Wheatstone e da un amplificatore operazionale differenziale, in cui la variazione della resistenza è misurata su una differenza di tensione.

Figura 21: immagine stilizzata di come funziona un microcantilever

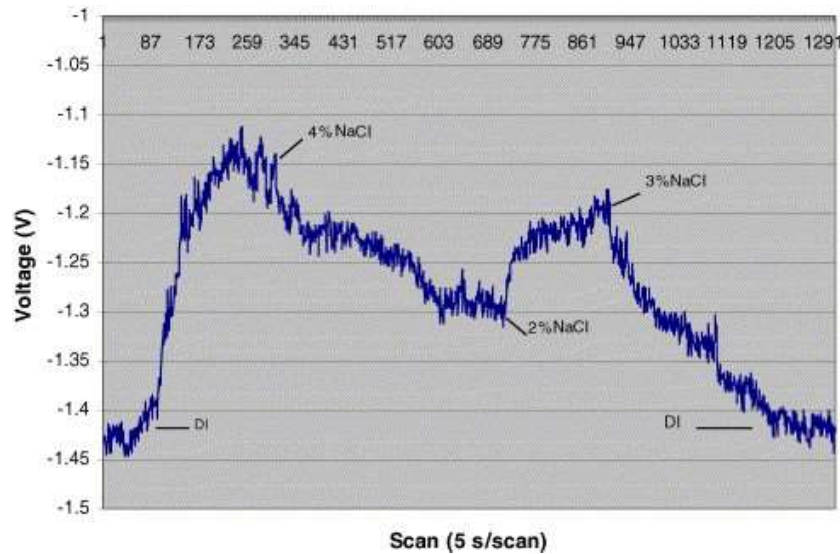


Fonte: "Comparative advantages of mechanical biosensors", marzo 2011

L'articolo *Hydration level monitoring using embedded piezoresistive microcantilever sensor* pubblicato nell'aprile del 2004 da R.L. Gunter, e collaboratori, riporta proprio uno studio in cui si utilizza questa tipologia di sensore. In particolare, il materiale di rilevamento utilizzato è un poliacetato di vinile reticolato ai raggi UV (PVAc) e si adoperava un multimetro di precisione, interfacciato a un PC per la registrazione in tempo reale della risposta del cantilever. La configurazione che però si fa assumere al microcantilever piezoresistivo è a ponte di Wheatstone, in modo da rilevare le variazioni volumetriche del materiale come variazioni di tensione anziché come variazioni di resistenza. I sensori PVAc EPM sono stati poi immessi in soluzioni con concentrazioni di cloruro di sodio variabili, per ricreare un ipotetico scenario intraorale, a diretto contatto con la saliva. La temperatura viene mantenuta costante invece, a circa 23°C (74 F).

Nella *figura 22* viene mostrata come cambia la tensione quando la soluzione da acqua deionizzata pura (DI) varia la concentrazione di NaCl al 2%, 3% e 4%. Questi piccoli cambiamenti nell'osmolalità corrispondono ai cambiamenti nello stato di idratazione di una persona. Si può notare che la risposta del sensore è piuttosto rumorosa, dovuta probabilmente all'immersione nella soluzione di NaCl, parzialmente conduttrice.

Figura 22: Risposta del sensore a piccoli cambiamenti nella concentrazione di NaCl mentre è immerso



Fonte: "Hydration level monitoring using embedded piezoresistive microcantilever sensor"

Tuttavia, il dispositivo è in grado di distinguere chiaramente i valori di tensioni tra concentrazioni di cloruro di sodio che differiscono appena dell'1%. Si è inoltre stimato che il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio è circa di 2000-3000 s. Questo aspettato cambia a seconda dello spessore assunto dallo strato polimerico. Infatti, con un rivestimento più sottile il tempo di risposta sarà inferiore ma diminuirà anche la variazione di resistenza misurata nel microcantilever, e quindi l'osmolalità rilevata. Bisogna quindi prestare attenzione a come progettare il sensore in modo da ottenere un segnale non troppo rumoroso, in relazione al tempo di equilibrio per la risposta massima.

Un altro articolo, *Human hydration level monitoring using embedded piezoresistive microcantilever sensors* pubblicato nel 2006 da R. Stewart e collaboratori, fa riferimento a un sensore con caratteristiche molto simili. Il materiale di rilevamento utilizzato è un idrogel a base di alcol polivinilico (PVA) e gli studi hanno misurato delle resistenze con un multimetro a 6,5 cifre di precisione o con un circuito a ponte di Wheatstone. I dati sono stati poi raccolti da un PC. Il sensore è stato immerso in acqua deionizzata, in soluzioni a base di NaCl, per imitare la saliva, o in vera saliva umana. La temperatura è stata mantenuta costante a 25°C per poi variare la resistenza del

microcantilever, realizzando diversi rivestimenti più o meno spessi (dai 12 ai 13 μm). Esattamente come prima, i sensori sono stati immersi nella soluzione di NaCl e si è rilevato che il tempo di risposta totale è di circa 180 s per ottenere una risposta del 90% da parte di tutti i dispositivi, al variare dello spessore.

Sono poi stati testati su due soggetti maschi, A e B, che hanno fornito un proprio campione di saliva durante un processo di lenta disidratazione. Nel caso A, si parte da una condizione di corpo idratato, con un'osmolalità di 77 mOsm per arrivare a 114 mOsm da disidratato. Nel caso B invece abbiamo un range più ampio: lo stato iniziale si trova a 73 mOsm e arriva a 139 mOsm.

Ai due atleti sono stati applicati due sensori distinti e dalla *figura 23* è possibile notare come la risposta per entrambi i dispositivi, durante il processo di disidratazione, sia molto simile. Una maggiore differenza si verifica a livello del sensore numero 77 nel soggetto B, il quale però raggiunge valori di osmolalità maggiori. Durante lo studio, infatti, il soggetto B ha prelevato i suoi campioni dopo otto senza aver bevuto, mentre il soggetto A è stato sottoposto a un allenamento di un'ora e mezza. Le condizioni di prelievo sono diverse per cui è evidente che anche i risultati lo siano. Inoltre, la composizione chimica della saliva può variare leggermente da persona a persona e questo fa sì che i risultati riportati risentono dell'offset, che rappresenta uno dei principali problemi di questa tipologia di sensori. Nel momento in cui si valutano i livelli di osmolalità su una gamma più ampia, lo strumento perde di linearità, rendendo quindi difficile il raggiungimento di una stima precisa del risultato.

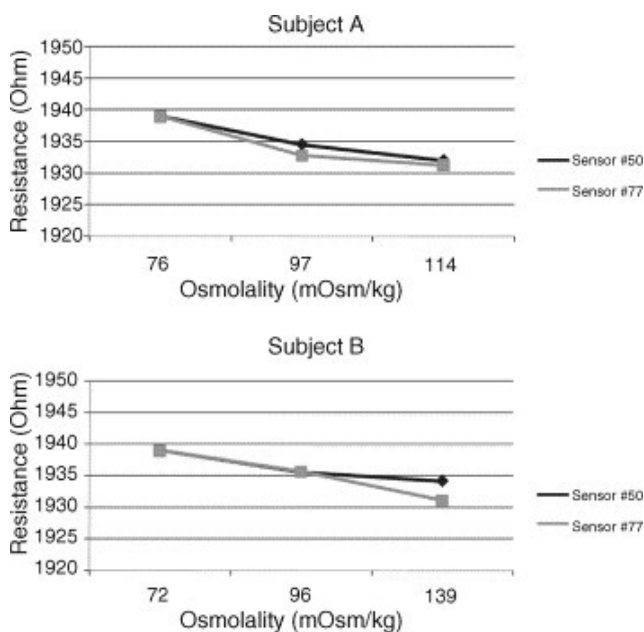


Figura 23: Risposta dei sensori applicati sul soggetto A e B, per valutare la variazione dell'osmolalità durante un'attività fisica

Fonte: "Human hydration level monitoring using embedded piezoresistive microcantilever sensors" di R. Stewart

Dai due articoli analizzati, è chiaro che l'utilizzo dei microcantilever piezoresistivi è vantaggioso. Oltre a essere dei dispositivi, piccoli ma robusti, economici e portatili quindi perfetti per essere utilizzati durante un allenamento, permettono di rilevazione variazioni dell'osmolalità anche dell'ordine dell'1% o meno. Sicuramente necessitano di essere adattati con schermi di correzione dell'offset e magari algoritmi per la correzione della non linearità e della temperatura, per adattarsi all'ambiente intraorale.

6.4. Esempio di sensore commerciale

L'azienda statunitense MX3 Diagnostics, espansa poi anche in Australia, si dedica alla progettazione di sensori per la valutazione della salute personale, in particolare di atleti che supportano alte prestazioni. È stata la prima azienda a proporre sul mercato un sistema per il monitoraggio dell'idratazione in tempo reale. Tale dispositivo si chiama *MX3 Hydration Testing System* ed è stato sviluppato dai ricercatori dell'università di Melbourne. Il sensore è stato testato dalla squadra di calcio svedese della coppa del mondo, da membri delle forze armate statunitensi, squadre sportive professionali statunitensi e numerosi programmi atletici della NCCA (National Collegiate Athletic Association). Nel 2019, l'azienda è stata anche partner dell'evento sportivo *Ironman Asia-Pacific Championship*, a Cairns, dove è stato valutato dagli atleti più forti del mondo.

Figura 24 : componenti del MX3 Hydration Testing System



Al corpo centrale del sensore vanno collegate le strisce usa-e-getta che permettono di raccogliere un campione di saliva direttamente della lingua dell'atleta. Il risultato dell'analisi può essere trasmesso a uno smartphone, scaricando l'apposita applicazione,

oppure direttamente visualizzato dell'MX3 Lab. La misura si basa sulla valutazione dell'osmolalità della saliva: più alto è il valore riportato, maggiore è lo stato di disidratazione. Siccome il range dell'osmolalità e la risposta di idratazione per ogni atleta sono uniche, si consiglia di eseguire prima una misurazione base, come riferimento, per determinare la propria zona di idratazione ottimale e per poi confrontare i risultati futuri con questi valori. Uno studio eseguito su 33 campioni di saliva ha permesso di rilevare un'ottima correlazione tra le stime ottenute con l'MX3 Hydration Testing System e l'osmolalità determinata direttamente dai laboratori certificati. Infatti, è stato calcolato un coefficiente di correlazione di Pearson pari a $R=0.95$, praticamente identici. È stato misurato anche un coefficiente di variazione medio (CV) del 3,3% ($\pm 2,1\%$). In particolare, si è notato che si ha una variabilità maggiore nei risultati quando i campioni vengono prelevati direttamente dalla saliva. Questo a causa dell'alterazione biologica nel suo processo di produzione. Finché le variazioni dell'osmolalità si aggirano attorno al 15% possono essere considerate normali.

Le figure 25 e 26, mostrano bene l'attendibilità dei dati in confronto a test da laboratorio.

Figura 25: Confronto della variabilità tra i risultati dell'osmolalità ottenuti dal sensore analizzato e da test in laboratorio

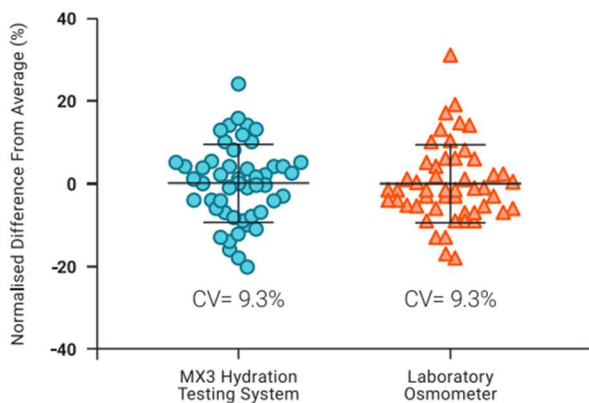
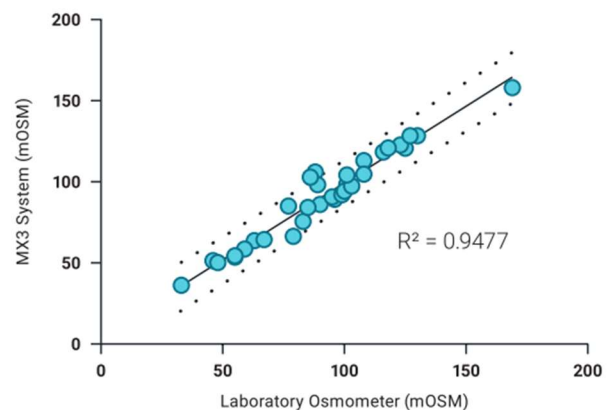


Figura 26: Accuratezza dei valori dell'osmolalità ottenuti dal sensore



Fonte di figure 25-26: Validation study 2019, MX3 Hydration Testing System

CONCLUSIONI

Nel presente elaborato è stata proposta una panoramica di alcune delle possibili tecnologie adatte a eseguire il monitoraggio dell'idratazione corporea, sia tramite l'utilizzo di sensori per il rilevamento del sudore, sia per il rilevamento della saliva. La sfida attuale dei ricercatori è la progettazione di dispositivi che non si focalizzino sull'analisi del flusso ematico o delle urine, come comunemente viene fatto per il monitoraggio dell'idratazione a scopo diagnostico e/o clinico, in quanto si vuole evitare che lo studio venga necessariamente svolto in laboratorio. Da queste due fonti, infatti, è generalmente possibile ricavare informazioni più precise, oltre che estrarre altri dati utili, attraverso ulteriori analisi. Una parte della ricerca bibliografica svolta si è focalizzata sulla verifica di fattibilità di questo monitoraggio, valutando i sensori progettati per l'analisi di sudore e saliva, meno invasivi e di facile estrazione. Si è trovato un buon responso in quanto questi riportano molti biomarcatori simili. Il fine è quello di capire quali sensori sono più adatti per ricavare le stesse informazioni, o comunque affini, dei test da laboratorio, in modo che la misurazione possa essere eseguita in loco, senza troppe accortezze o conoscenze, adatta quindi per un atleta durante l'allenamento. Diverse aziende sono riuscite a mettere in commercio dispositivi appositi e che vengono usati soprattutto per prestazioni ad alto livello, al fine di indicare lo stato attuale di idratazione e di fornire le informazioni necessarie per un corretto recupero. Le difficoltà maggiori che la ricerca attuale sta riscontrando riguardano in particolare la miniaturizzazione, ovvero il conciliare in un unico piccolo dispositivo, tutte le componenti necessari per soddisfare le richieste. Il sensore, infatti, non deve andare a compromettere la prestazione dell'atleta, deve resistere bene alle condizioni fisiche esterne come umidità, secchezza, pioggia, ma anche a movimenti bruschi ed eventuali contatti, soprattutto se applicato in uno sport di squadra. Allo stesso tempo, deve eseguire misurazioni precise e affidabili, e questo aspetto risulta essere particolarmente critico in quanto i parametri rilevati sono molto variabili: le condizioni da valutare sono diverse e soprattutto dipendono dall'individuo stesso. Si tratta di un settore ancora in via di sviluppo, in quanto il monitoraggio dell'idratazione in ambito sportivo è stato sottovalutato per molti anni e la richiesta è ancora bassa. Proprio per queste ragioni, tale settore presenta un ampio spazio aperto per nuove innovazioni e per una forte crescita: sempre più aziende cercano di stare al passo con la ricerca e di

integrare alla misurazione altri parametri, per ottenere strumenti ancora più completi e favorendo l'utilizzo di smartphone o dispositivi simili, per rendere ancora più pratico e allettante il loro impiego.

BIBLIOGRAFIA

- SilverThorn D. U., edizione italiana a cura di Colombini B., Perego C., Rufini S., *Fisiologia umana, un approccio integrato*, Pearson, 2017
- Gleeson M., Jeukendrup A., *Sport Nutrition*, Human Kinetics, 2018
- Constant F., Jéquier E. (2010), *Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration*, European Journal of Clinical Nutrition ,
<https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.111>
- Maset M., *Acqua corporea e idratazione: metodi di valutazione*, nurse24.it, 2021
- Effetti del cortisolo sulla performance*, Scienze motorie, 2018
- Casa D. J., Lee E.C., Fragala M. S., Kavouras S. A., Queen R. M., Pryor J. L. (2017), *Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking Health, Performance and Recovery in Athletes*, National Library of Medicine, doi: 10.1519/JSC.0000000000002122
- Armstrong L. E., McKenzie A. L., Muñoz C. X. (2014), *Optimal Hydration Biomarkers: Consideration of Daily Activities*, National Library of Medicine, doi: 10.1159/000360655
- Hoe Y. Y. G., Johari B. H., Ju M., Kang T. G., Kim S., Vaidyanathan K. (2011), *A microfluidic sensor for human hydration level monitoring*, in Defence Science Research Conference and Expo (DSR), publisher IEEE, DOI: 10.1109/DSR.2011.6026879
- Baker L. B. (2019), *Physiology of sweat gland function: the roles of sweating and sweat composition in human health*, National Library of Medicine, DOI: 10.1080/23328940.2019.1632145
- Crandall C. G., Shibasaki M. (2011), *Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans*, National Library of Medicine, DOI: 10.2741/s94
- Brodell R.T., Hodge B. D., Sanvictores T. (2021), *Anatomy Skin Sweat Glands*, National Library of Medicine
- Gerrett N., Griggs K., Redortier B., Voelcker T., Kondo N., Havenith G. (2018), *Sweat from gland to skin surface: production, transport and skin absorption*, Journal of applied Physiology, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00872.2017>
- Cinti S. (2018), *Elettrodi stampati e sostenibilità*, La chimica e l'industria online, DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/CI.2018.100.2.46>
- Zhou J., Men D., Zhang X. (2022), *Progress in wearable sweat sensors and their applications*, ScienceDirect, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2021.11.004>
- Ray T., Choi J., Reeder J., Lee S. P., Aranyosi A. J., Ghaffari R., Rogers J. A. (2019), *Soft, skin-interfaced wearable systems for sports science and analytics*, ScienceDirect, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.01.003>

- Seshadrj D. R., Li R. T., Voos J. E., Rowbottom J. R., Alfes C. M., Zorman C. A., Drummond C. K. (2019), *Wearable sensors for monitoring the physiological and biochemical profile of the athlete*, npj digital medicine
- Bandodkar A. J., Gutruf P., Rogers J. A. (2019), *Battery-free, skin-interfaced microfluidic/electronic systems for simultaneous electrochemical, colorimetric and volumetric analysis of sweat*, ScienceAdvances, DOI: 10.1126/sciadv.aav3294
- Chicharro J. L., Lucía A., Pérez M., F. Vaquero A. F., Ureña R. (1998), *Saliva Composition and Exercise*, Sports Med
- Garrett D. C., Rae N., Fletcher J. R., Zarnke S., Thorso S. (2017), *Engineering approaches to assessing hydration status*, IEEE, DOI: 10.1109/RBME.2017.2776041
- Stewart R., Reed J., Zhong J., Morton K., Porter T. L. (2007), *Human hydration level monitoring using embedded piezoresistive microcantilever sensors*, ScienceDirect, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2006.11.003>
- Zhou Y., Han H., Naw H. P. P., Lammy A. V., Goh C. H., Boujday S., Steele T. W. J. (2016), *Real-time colorimetric hydration sensors for sport activities*, ScienceDirect, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.06.078>
- Walsh N. P., Montague J. C., Callow N., Rowland A. V. (2004), *Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans*, ScienceDirect, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2003.08.001>
- Taylor N. A. S., van den Heuvel A. M., Kerry P., McGhee S., Peoples G. E., Brown M. A., Patterson M. J. (2012), *Observation on saliva osmolality during progressive dehydration and partial rehydration*, SpringerLink
- Validation Study (2019), The MX3 Hydration Testing System
- Alagic A., Tabibi T. (2020), *Introduction to Electrochemical Sensors*, Analytical Sciences Digital Library
- Damborsky P., Švitel J., Katrlík J. (2016), *Optical biosensors*, National Library of Medicine, DOI: 10.1042/EBC20150010
- Arlett J. L., Myers E. B., Roukes M. L. (2011), *Comparative advantages of mechanical biosensors*, National Library of Medicine, DOI: 10.1038/nnano.2011.44
- Chalklen T., Jing Q., Narayan S. K. (2020), *Biosensors Based on Mechanical and Electrical Detection Techniques*, MDPI Open Access Journals, DOI: <https://doi.org/10.3390/s20195605>
- Sardini E., Serpelloni M., Tonello S. (2020), *Printed Electrochemical Biosensors: Opportunities and Metrological Challenges*, National Library of Medicine, DOI: 10.3390/bios10110166

Qiao Y., Qiao L., Chen Z., Liu B., Gao L., Zhang L. (2022), *Wearable sensors for continuous sweat biomarker monitoring*, MDPI Open Access Journals, <https://doi.org/10.3390/chemosensors10070273>

