

UNIVERSITÀ DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**STUDIO SUI BIOSENSORI PER LA RIVELAZIONE
DEL LATTATO**

Laureando: Alberto Demo

Relatore : Ch. Mo Prof. Alessandro Paccagnella

Corso di Laurea in Ingegneria dell'Informazione

27 Settembre 2011

Anno Accademico 2010 – 2011

*C'è una forza motrice più forte del vapore, dell'elettricità e dell'energia
atomica: la volontà.*

Albert Einstein

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO UNO – Elementi di Elettrochimica.....	3
• <i>1.1 – Interfaccia elettrificata.....</i>	<i>3</i>
• <i>1.2 – Conduttori ionici.....</i>	<i>16</i>
• <i>Bibliografia.....</i>	<i>22</i>
CAPITOLO DUE – Cinetica Enzimatica e Acido Lattico.....	23
• <i>2.1 – Enzimi.....</i>	<i>23</i>
• <i>2.2 – L’Acido Lattico.....</i>	<i>27</i>
• <i>Bibliografia.....</i>	<i>34</i>
CAPITOLO TRE – Biosensori.....	35
• <i>3.1 – Biosensori, un’introduzione.....</i>	<i>35</i>
• <i>3.2 – Generazioni di biosensori.....</i>	<i>38</i>
• <i>3.3 – Immobilizzazione enzimatica.....</i>	<i>43</i>
• <i>Bibliografia.....</i>	<i>48</i>
CAPITOLO QUATTRO – Voltammetrie.....	49
• <i>4.1 – Cronoamperometria.....</i>	<i>49</i>
• <i>4.2 – Voltammetrica Ciclica (o Ciclovoltammetria).....</i>	<i>52</i>
• <i>Bibliografia.....</i>	<i>67</i>
CAPITOLO CINQUE – Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica.....	69
• <i>5.1 – Premessa: concetti base ed ipotesi.....</i>	<i>69</i>
• <i>5.2 – Modelli interpretativi dei dati EIS.....</i>	<i>71</i>
• <i>5.3 – Elementi in circuiti equivalenti.....</i>	<i>72</i>
• <i>5.4 – Modelli elettrochimici notevoli.....</i>	<i>78</i>
• <i>Bibliografia.....</i>	<i>86</i>

CAPITOLO SEI – Comparazioni e Considerazioni sullo Stato dell’Arte.....87

- *6.1 – Detection limit.....87*
- *6.2 – Sensibilità.....89*
- *6.3 – Potenziale applicato all’elettrodo.....90*
- *6.4 – Stabilità.....93*
- *6.5 – Dispositivi FIA, dipendenza dal flow rate.....98*
- *6.6 – Descrizione di un dispositivo con caratteristiche peculiari.....101*
- *Bibliografia.....105*

CONCLUSIONI.....109

APPENDICI

- A. *TABELLA RIASSUNTIVA DEI DISPOSITIVI STUDIATI.....111*

INTRODUZIONE

La medicina moderna si basa sulla capacità di individuare precocemente i sintomi di una patologia, al fine di diagnosticarla per tempo e quindi poterla curare. In quest'ottica si rende evidente la necessità di rilevare agenti biologici nel sangue umano, con tempi di risposta estremamente brevi, senza ricorrere, almeno in un primo momento, alle analisi del sangue. Da questa esigenza nasce l'idea del biosensore. Pioniere in questo senso è stato, ad esempio, il biosensore per rilevazione del glucosio ematico in pazienti affetti da diabete. Negli ultimi anni, tuttavia, si è posta particolare attenzione allo sviluppo di metodi per rilevare l'acido lattico a livello ematico. Infatti la stretta correlazione fra acidemia lattica e stati patologici (quali shock, ipossia, avvelenamento, insufficienza epatica etc) sottolinea l'importanza di poterne determinare la concentrazione nel sangue per pazienti in terapia intensiva o sotto intervento chirurgico.

L'obiettivo di questa tesi è dare una base teorica e un confronto sullo stato dell'arte attuale per l'eventuale sviluppo futuro di un dispositivo amperometrico per rilevazione dell'acido lattico. Nel capitolo 1 si affrontano le basi teoriche di elettrochimica su cui si fonda il funzionamento di un biosensore. Nel capitolo 2 viene fatta dapprima una panoramica sugli enzimi e sulla cinetica delle reazioni enzimatiche, poi vengono trattate l'origine e le implicanze diagnostiche che coinvolgono l'acido lattico. Il capitolo 3 dà una definizione e una classificazione dei biosensori, secondo segnale di trasduzione e trasferimento elettronico. Nello stesso capitolo vengono anche presentate le più comuni tecniche di immobilizzazione utilizzate per immobilizzare enzimi sulla superficie dell'elettrodo. I capitoli 4 e 5 presentano le tecniche di analisi elettrochimica più utili per misurare la risposta amperometrica del sensore e caratterizzare i processi che avvengono all'elettrodo. Nella fattispecie, nel capitolo 4 si presentano due tecniche di voltammetria (cronoamperometria e ciclovoltammetria), mentre nel capitolo 5 si descrivono i concetti base e i modelli utilizzati per la spettroscopia di impedenza elettrochimica. Infine nel capitolo 6 viene fatta la comparazione in termini di tecnologia, capacità di rilevazione e stabilità di alcuni dispositivi tra quelli analizzati nello studio dello stato dell'arte.

1.1 – Interfaccia elettrificata [1, 2]

1.1.1 – Introduzione all'interfaccia

Quando si pongono a contatto due fasi differenti, la superficie di separazione, nonché punto di discontinuità tra le due, è detto interfaccia. Tali fasi possono essere di qualsiasi genere, sia immiscibili (solido/solido, solido/liquido, solido/gas, liquido/gas, liquido/liquido) che miscibili ma con proprietà chimiche differenti (liquido/liquido, gas/gas).

Dal momento che le due fasi sono diverse ci si aspetta che presentino proprietà chimico-fisiche differenti. La porzione di entrambe le fasi che si trova in prossimità dell'interfaccia è detta interfase e presenta molecole (dette appunto interfasali) soggette a interazioni chimico-fisiche non più bilanciate in tutte le direzioni, dal momento che da una parte hanno il bulk della propria fase mentre dall'altra hanno l'interfaccia.

Lo squilibrio provocato da questa condizione di discontinuità viene compensato da uno squilibrio nella composizione, infatti alcune particelle interfasali tendono ad accumularsi provocando un eccesso rispetto alla concentrazione del bulk, mentre altre generano una mancanza. Un esempio chiarificatore può essere quello delle particelle polari che tendono ad assumere una posizione preferenziale all'interfaccia, a differenza di quanto accade nel bulk dove l'orientazione è casuale.

Inoltre la presenza di particelle con proprietà elettriche, come quelle appena descritte, o vere e proprie cariche (elettroni o ioni) produce una elettrificazione della regione interfasale che si quantifica in due eccessi di carica opposta disposti parallelamente, separati dall'interfaccia e confinati in uno spazio molto limitato. Per questo motivo, pur non producendo una differenza di potenziale molto elevata, danno comunque origine ad un campo elettrico elevatissimo (dell'ordine dei 10^9 V/m).

1.1.2 – Classificazione dei conduttori

Se le due fasi sono conduttori elettrici, l'elettrificazione che si genera all'interfaccia risulta essere ovviamente più pronunciata, in quanto la presenza di cariche elettriche mobili facilita la realizzazione di accumuli nell'interfase.

In base al tipo di cariche mobili di cui dispongono, i conduttori elettrici possono essere distinti in:

- Conduttori elettronici (o di prima specie) in cui le cariche mobili sono esclusivamente gli elettroni (metalli, semi-conduttori, grafite...);
- Conduttori ionici (o di seconda specie) in cui le cariche mobili sono invece gli ioni, in genere sia positivi che negativi (soluzioni elettrolitiche, cristalli ionici, elettroliti polimerici).

Una serie formata da conduttore elettronico – conduttore ionico – conduttore elettronico rappresenta un modello estremamente semplificato di dispositivo elettrochimico, in cui un'interfaccia conduttore elettronico – conduttore ionico rappresenta l'elettrodo.

Il trasferimento di carica attraverso l'elettrodo è legato inevitabilmente ad un processo ossidoriduttivo (reazione di ossido riduzione), infatti le uniche cariche che possono attraversare l'interfaccia sono gli elettroni. Tuttavia le due specie di conduttori hanno comportamenti estremamente differenti: i conduttori elettronici si comportano come un pozzo di elettroni, dal quale questi possono entrare e uscire liberamente, mentre nel conduttore ionico gli elettroni sono allocati negli orbitali atomici della specie chimica e quindi non possono muoversi liberamente. Questo spiega il perché dell'inevitabilità del processo ossidoriduttivo: quando un elettrone attraversa l'interfaccia uscendo dal conduttore elettronico ed entra nel conduttore ionico, deve per forza posizionarsi in un orbitale e questo comporta una riduzione della specie chimica; quando invece un elettrone esce dal conduttore ionico, deve essere forzatamente uscito da un orbitale di una specie chimica, il che comporta una ossidazione della stessa. Quindi l'elettrodo è sede potenziale di processi di ossidoriduzione.

1.1.3 – Potenziale elettrico all'interno di una fase [1, 2]

Per capire il comportamento degli elettroni all'interno di un conduttore, e, quindi, il trasferimento elettronico tra un conduttore elettronico e un conduttore ionico, è necessario esaminare il livello energetico degli stessi. È opportuno dare le seguenti definizioni:

- Potenziale interno φ_i : potenziale elettrico esistente all'interno della fase;
- Potenziale esterno ψ_i : potenziale elettrico dovuto ad un eccesso di cariche presente nella fase in questione;
- Potenziale superficiale χ_i : potenziale elettrico dovuto allo strato dipolare superficiale della fase.

L'energia degli elettroni dipende in prima istanza dal potenziale interno della fase.

Per una fase i -esima è valida la relazione:

$$\varphi_i = \psi_i + \chi_i \quad (1.1)$$

nella quale l'unica grandezza conoscibile è il potenziale esterno.

Per descrivere dal punto di vista energetico l'attraversamento dell'interfaccia, è utile considerare l'introduzione di una mole di elettroni e la fase i -esima un metallo. È ipotizzabile che all'interno del metallo esista un potenziale V_0 costante in tutti i punti del metallo stesso, dovuto a residui ionici, di conseguenza l'energia potenziale che possiedono gli elettroni all'interno del metallo è pari a “ $-eV_0$ ”, mentre all'esterno del metallo l'energia tende a zero.

Oltre all'energia potenziale si deve considerare che gli elettroni possiedano una determinata energia cinetica ε_F , detta livello energetico di Fermi¹. Di conseguenza il lavoro effettuato per introdurre una mole di elettroni in un metallo è esprimibile come:

$$(\mu_e^\theta)_M = -eV_0 + \varepsilon_F \quad (1.2)$$

Tale lavoro è definito potenziale chimico standard dell'elettrone nel metallo M. Dal momento che il potenziale chimico è definito come:

$$(\mu_j)_i = (\mu_j^\theta)_i + RT \ln a_j \quad (1.3)$$

e l'attività chimica a_j è unitaria per i metalli, il potenziale chimico standard dell'elettrone in un metallo coincide esattamente con il suo potenziale chimico.

¹ Livello di Fermi: livello energetico al quale si trovano gli elettroni coinvolti in processi di trasferimento elettronico da e verso un metallo. Tale livello è considerato essere lo stato standard degli elettroni.

Dopo aver considerato il lavoro chimico, è opportuno considerare anche il lavoro elettrico effettuato per attraversare l'interfaccia. Tale lavoro è strettamente legato al potenziale elettrico interno dell'interfaccia definito pocanzi, e risulta essere “ $-F\varphi$ ”. Di conseguenza il lavoro complessivo effettuato per introdurre una mole di elettroni in un metallo è:

$$(\tilde{\mu}_e)_M = -FV_0 + \varepsilon F - F\varphi \quad (1.4)$$

Tale lavoro è definito anche potenziale elettrochimico dell'elettrone nel metallo.

1.1.4 – Modello dell'interfaccia [1, 2]

Molti elettrochimici hanno dedicato la loro attenzione alla struttura delle interfaci elettrificate per ricavarne modelli utili; il primo scienziato cui si deve un modello per l'interfaccia elettrificata fu Helmholtz.

Il fisico tedesco ipotizzò di avere un'interfaccia tra metallo e soluzione elettrolitica formata da due eccessi di carica posti su piani paralleli (fig 1.1) :

- Un piano costituito dalla superficie del metallo sulla quale sono concentrate le cariche in eccesso del metallo;
- Un piano parallelo, luogo dei centri degli ioni (considerati cariche puntiformi) in eccesso presenti dalla parte della soluzione elettrolitica.

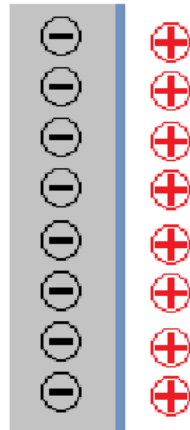


Fig 1.1: Rappresentazione grafica del modello di Helmholtz

Il modello era estremamente semplice anche se, in prima approssimazione, abbastanza aderente alla realtà e grazie proprio a questo modello la regione interfasciale prese il nome di doppio strato elettrico.

A Gouy e Chapman si dovette lo sviluppo di un modello più accurato; essi infatti svilupparono un modello che considerasse gli ioni come cariche puntiformi ma distribuiti in parte parallelamente alla superficie metallica (come nel modello di Helmholtz) e in parte nel resto della regione interfasciale a causa dell'agitazione termica (Fig 1.2):

- doppio strato compatto tra i piani paralleli ($\sigma_M \neq \sigma_S$);
- doppio strato diffuso tra il piano di Helmholtz e il bulk della soluzione.

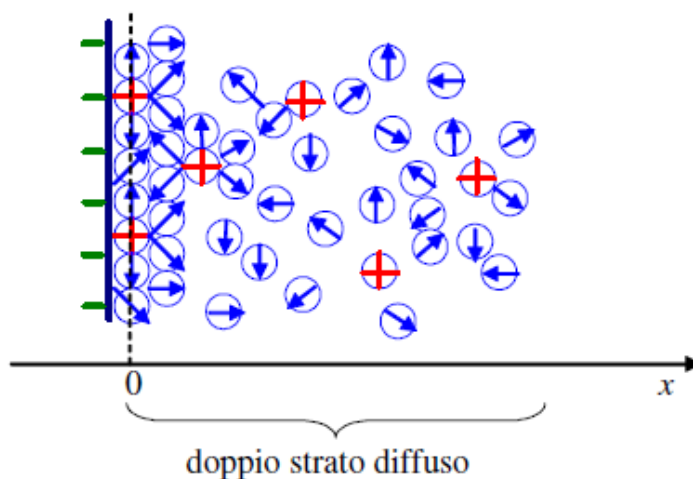


Fig 1.2: Rappresentazione grafica del modello di Guoy – Chapmann

Il modello di Gouy – Chapman risulta più accurato di quello di Helmholtz, ma tuttavia non ancora del tutto adeguato a causa dell'assunzione che gli ioni fossero cariche puntiformi. Infatti in queste ipotesi lo strato diffuso partiva esattamente dal punto di discontinuità dell'interfaccia.

Un'ulteriore evoluzione del modello si deve a Stern che assumeva:

- ioni con dimensioni finite;
- ioni generalmente solvatati quindi con le relative dimensioni maggiorate;
- presenza di uno strato di solvente sulla superficie dell'elettrodo.

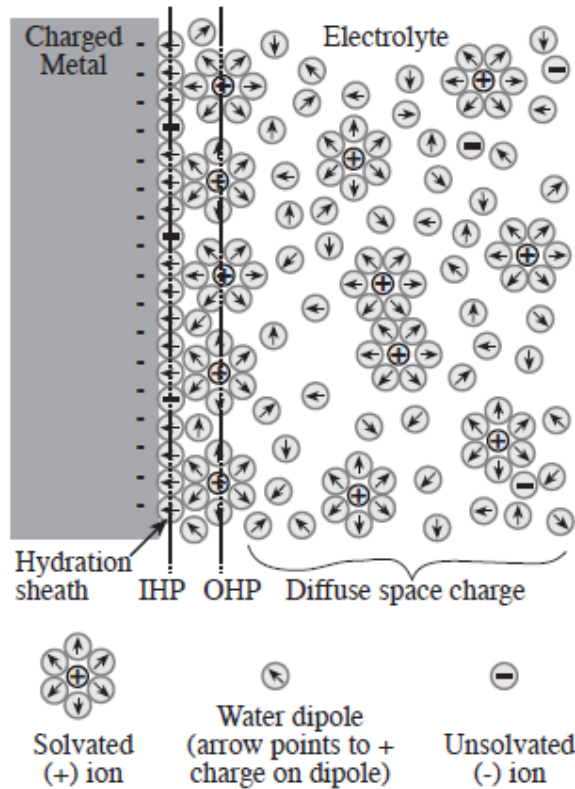


Fig 1.3: Rappresentazione grafica del modello di Stern dell'interfaccia elettrificata in cui si evidenziano lo strato idratato, i piani di Helmholtz e la regione di carica diffusa introdotta dal modello di Gouy – Chapmann [2].

Queste assunzioni permettevano di definire nuovamente la situazione in prossimità dell'interfaccia (riferimenti a figura 1.4):

- per $0 < x < x_2$ non ci sono cariche elettriche, c'è lo strato di solvente: vale il modello di Helmholtz anche se $\sigma_{x_2} < \sigma_M$;
- per $x \geq x_2$ si ha la distribuzione di Gouy – Chapman partendo però da un punto x_2 e non da 0;
- il potenziale φ varia linearmente con x da φ_0 a φ_2 nello strato compatto e esponenzialmente per $x > x_2$.

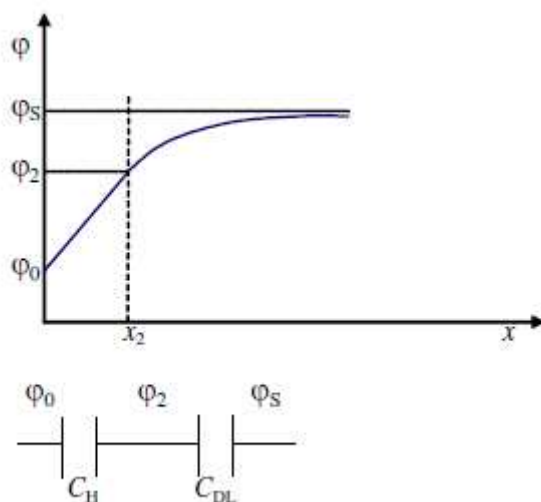


Fig 1.4: Rappresentazione del profilo di potenziale nella regione interfase. La capacità d'interfaccia è pari alla serie fra la capacità dello strato di Helmholtz (strato di carica fissa) e dello strato di Gouy – Chapman (strato di carica diffusa).

Questa variazione di potenziale denota dei contributi capacitivi riuniti sotto la capacità differenziale totale C_d :

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{DL}}$$

Affinché una specie i -esima possa attraversare l'interfaccia deve valere la condizione di equilibrio

$$(\tilde{\mu}_i)_A = (\tilde{\mu}_i)_B \quad (1.5)$$

Tale condizione è sempre vera per gli elettroni, in quanto essi sono in grado di attraversare qualsiasi interfaccia.

L'interfaccia tra due metalli quindi realizza sempre la condizione (1.5).

Se consideriamo invece un elettrodo, la condizione di equilibrio deve essere ancora verificata, ma gli elettroni che possono attraversare l'interfaccia non esistono liberi in entrambe le fasi, per cui si deve realizzare l'equilibrio elettrochimico per il sistema:



che si ottiene annullando somma algebrica dei potenziali elettrochimici (con i coefficienti stechiometrici positivi per i prodotti e negativi per i reagenti). Si giunge quindi alla seguente equazione:

$$(\tilde{\mu}_R)_S - (\tilde{\mu}_{Ox})_S - n(\tilde{\mu}_e)_M = 0 \quad (1.7)$$

Ognuno dei tre potenziali elettrochimici si può scomporre in somma di contributo chimico (caratterizzato dal potenziale chimico) e contributo elettrico (caratterizzato dalla carica trasportata e dal potenziale interno della fase).

A sua volta il potenziale chimico è esprimibile come somma di potenziale chimico standard e di un contributo dovuto all'attività chimica della specie (ricordando che l'attività chimica di un metallo è unitaria) e si ottiene:

$$\begin{aligned} (\tilde{\mu}_R)_S &= (\mu_R)_S + (z - n)F\varphi_S = \mu_R^\theta + RT \ln a_R + (z - n)F\varphi_S \\ (\tilde{\mu}_{Ox})_S &= (\mu_{Ox})_S + zF\varphi_S = \mu_{Ox}^\theta + RT \ln a_{Ox} + zF\varphi_S \\ (\tilde{\mu}_e)_M &= (\mu_e)_M - F\varphi_M = \mu_e^\theta - F\varphi_M \end{aligned}$$

Da queste equazioni si possono isolare i termini di potenziale interno e porli in funzione dei potenziali standard e attività chimica

$$nF(\varphi_M - \varphi_S) = \mu_{Ox}^\theta + n\mu_e^\theta - \mu_R^\theta + RT \ln \frac{a_{Ox}}{a_R} \quad (1.8)$$

$${}^M\Delta^S \varphi = \varphi_M - \varphi_S \quad (1.9)$$

Posto che $\Delta_r G = \Delta_r G^\theta + RT \ln \frac{a_{Ox}}{a_R}$

e che ${}^M\Delta^S \varphi^\theta = \frac{\mu_{Ox}^\theta + n\mu_e^\theta - \mu_R^\theta}{nF} = -\frac{\Delta_r G^\theta}{nF} = E^\theta$

si può arrivare all'importante relazione che lega la differenza di energia libera di reazione di Gibbs e la differenza di potenziale interno dell'interfaccia:

$$-\frac{\Delta_r G}{nF} = -\frac{\Delta_r G^\theta}{nF} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{Ox}}{a_R} \right) = E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{Ox}}{a_R} \right) \quad (1.10)$$

Ove E è detto anche potenziale redox e E^θ potenziale redox standard [3].

1.1.5 – Elettrodi e celle elettrochimiche

Un elettrodo rappresenta un caso particolare di cella elettrochimica. In questo paragrafo si tratterà un caso più generale di cella elettrochimica, ovvero una cella galvanica (rappresentata in figura 1.6), che permetterà di studiare l'andamento dei potenziali all'interno del sistema elettrochimico, conoscenza che si rivela molto utile il fase di progettazione del biosensore (cfr Cap. 4 Potenziale formale).

Se si considera un'interfaccia elettrificata e due punti ognuno appartenente ad una fase, tra i punti due sarà misurabile una differenza di potenziale $\Delta\phi$ detta differenza di potenziale di Galvani o differenza di potenziale interno, esprimibile come somma dei contributi (vedi (1.1)):

- $\Delta\psi$ differenza di potenziale esterno o di Volta dovuta agli eccessi di cariche elettriche accumulate nella regione interfasele;
- $\Delta\chi$ differenza di potenziale superficiale dovuta alla presenza dei due strati dipolari superficiali.

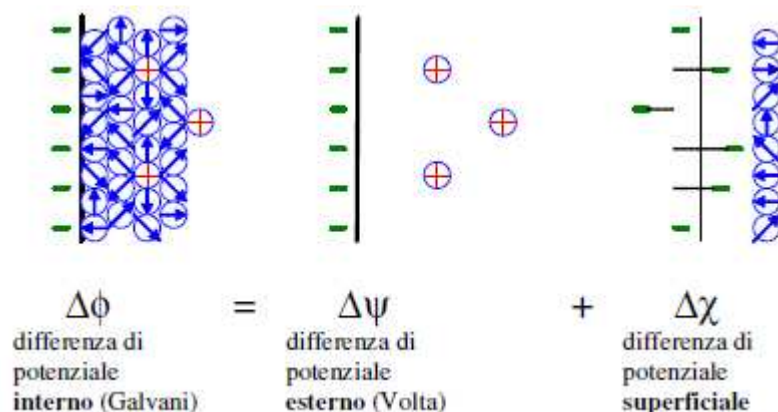


Fig 1.5: Rappresentazione grafica della scomposizione dei potenziali nell'interfaccia elettrificata.

Posto che $\Delta\phi$ non si possa conoscere e/o ricavare, si può constatare che esistono interfacce che consentono il trasferimento di elettroni, attraverso l'interfaccia stessa, con elevata velocità ($v \rightarrow \infty$). Tali interfacce sono dette impolarizzabili.

La loro caratteristica è che $\Delta\phi$ è costante: dipende solo dalle fasi che costituiscono l'interfaccia, ma è indipendente dal sistema in cui l'interfaccia è inserita.

Viceversa le interfacce polarizzabili sono quelle alle quali il trasferimento di elettroni risulta difficoltoso. In tal caso $\Delta\phi$ può essere condizionato arbitrariamente dall'esterno e assumere qualsiasi valore.

L'interfaccia tra due metalli è ovviamente impolarizzabile, ma esistono taluni elettrodi che si comportano come interfacce sufficientemente impolarizzabili, quando la costante cinetica del processo catodico k_+ e quella del processo anodico k_- sono molto elevate ($k_+, k_- \rightarrow \infty$).

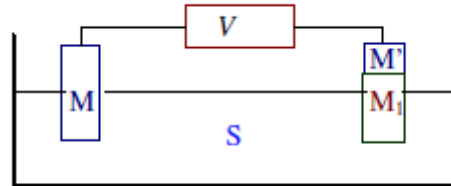


Fig 1.6: Rappresentazione schematica della cella galvanica

Nel sistema di figura 1.6 l'interfaccia $M_1 | M'$ è senz'altro impolarizzabile. Se si suppone che anche l'interfaccia $M | S$ sia impolarizzabile, si avrà:

$$V = {}^{M'}\Delta^M\varphi = {}^S\Delta^M\varphi + {}^{M'}\Delta^{M_1}\varphi + {}^{M_1}\Delta^S\varphi \quad (1.11)$$

con i contributi $[{}^S\Delta^M\varphi]$ e $[{}^{M'}\Delta^{M_1}\varphi]$ costanti perché provenienti da facce impolarizzabili, per cui si può ricavare l'importante risultato:

$$\delta V = \delta {}^{M'}\Delta^M\varphi = \delta {}^{M_1}\Delta^S\varphi \quad (1.12)$$

ovvero è possibile misurare variazioni di $\Delta\varphi$ attraverso l'interfaccia $M_1 | S$.

Se si estende il risultato considerando un'interfaccia $M | S$ impolarizzabile accoppiata ad una serie di interfacce $M_i | S$ (per semplicità assumiamo che siano tutte nella stessa soluzione), in ogni sistema si può misurare un potenziale elettrodico relativo all'interfaccia di riferimento (ovvero l'elettrodo a H). Il valore del potenziale elettrodico relativo:

$$V = {}^{M'}\Delta^M\varphi = {}^{M'}\Delta^{M_i}\varphi + {}^{M_i}\Delta^S\varphi - {}^M\Delta^S\varphi \quad (1.13)$$

non riflette però più il valore relativo di $\Delta\varphi$, a causa della presenza di tre interfacce. Dal punto di vista termodinamico (all'equilibrio elettrochimico) V viene definito come forza elettromotrice del sistema elettrochimico ed è collegata alla $\Delta_r G$ del processo chimico complessivo, la quale tutta via non è la somma delle $\Delta_r G$ dei due processi di

ossidazione e riduzione che avvengono alle due interfacce. Questo costituisce un problema non indifferente, infatti in ogni processo elettrodico, per ricavare la relazione tra $\Delta\phi$ e $\Delta_r G$, si considerano gli elettroni nel loro stato standard, ovvero il livello di Fermi del metallo con cui si costituisce l'interfaccia. Tuttavia quando si confrontano processi elettrodici differenti, i $\Delta_r G$ corrispondenti sono relativi agli elettroni nello specifico stato standard di ciascun processo per cui non sono tra loro confrontabili.

Per risolvere tale problema è necessario considerare gli elettroni sempre nello stesso stato standard. Per fare ciò sono state proposte due alternative:

- Considerare gli elettroni nel vuoto (cioè in fase gassosa) (g);
- Considerare gli elettroni nella stessa soluzione S dell'elettrodo di riferimento (s).

In tali ipotesi la forza elettromotrice del sistema elettrochimico e la corrispondente $\Delta_r G$ del processo globale sono scindibili in due contributi indipendenti, ciascuno riferito ad un elettrodo.

La $\Delta_r G'$ (ovvero quella alle varie interfacce) descritta non è più collegata al $\Delta\phi$ della corrispondente interfaccia, non essendo $\Delta\phi$ conoscibile, tuttavia la si può ricavare tramite il potenziale elettrodico:

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}$$

$$nFE = -\Delta_r G$$

Il potenziale elettrodico E, moltiplicato per nF, rappresenta il valore relativo (alla convenzione dell'elettrodo standard ad idrogeno) della $\Delta_r G'$, ovvero della $\Delta_r G$ del processo redox che avviene all'interfaccia (con gli elettroni nel vuoto o in una soluzione di riferimento) [3, 4, 5]. Nel capitolo 4 si mostrerà che tale potenziale sarà ricavabile tramite il ciclo voltammogramma: infatti si vedrà che per processi reversibili (vedi sotto), il potenziale redox è la media matematica dei potenziali di ossidazione e riduzione.

1.1.6 – Processi agli elettrodi [1, 3]

Nel passaggio di corrente in una cella elettrochimica, possono aver luogo diversi processi. Tra questi i principali sono:

- Trasporto di reagenti attraverso l'elettrodo tramite diffusione o migrazione ionica;
- Trasferimento di carica attraverso l'interfaccia soluzione – elettrodo;
- Trasporto di prodotti di reazione lontano dall'elettrodo.

Ognuno dei processi menzionati pocanzi, in base alla propria velocità di svolgimento, può controllare di conseguenza la velocità di reazione e quindi anche l'ampiezza della corrente. Se il trasferimento di carica è il processo più lento, e quindi è quello che controlla la reazione, si dice che la reazione è controllata cinematicamente. Si suole anche dire che un processo controllato cinematicamente è un processo irreversibile. Viene utilizzata spesso anche l'espressione "reazione elettrochimica irreversibile", nonostante questa non sia la denominazione esatta per questo processo.

Tuttavia quando entrano in gioco fenomeni cinetici, dal punto di vista analitico diventa estremamente complicato riuscire ad associare tramite una relazione matematica la corrente elettrolitica e la concentrazione delle specie reagenti. Per questo motivo durante gli esperimenti si cerca di rendere più rapida possibile la cinetica della reazione, anche attraverso l'applicazione di strati catalitici sulla superficie elettrodica.

Se la cinetica della reazione è invece veloce (detta reazione elettrodica reversibile), allora i processi di trasporto sono i più lenti tra quelli coinvolti nella reazione. Tuttavia anche in questo caso non è semplice ricavare una relazione che colleghi corrente e concentrazione, di conseguenza si impone come ipotesi di lavoro che la diffusione sia l'unico processo di trasporto, sopprimendo quindi la migrazione. Tale condizione si ottiene aggiungendo una grossa quantità di elettrolita di supporto (quindi non coinvolto nella catalisi) inerte, che tenda a sopprimere le forze del campo elettrico nel bulk della soluzione. A causa di quest'ipotesi di lavoro, si dice che in una reazione elettrodica reversibile la velocità di reazione è controllata in diffusione. Per spiegare questo fenomeno dal punto di vista analitico esistono due leggi scoperte dal fisiologo tedesco Fick; la più importante ai fini dell'attuale trattazione è la prima legge di Fick (1.14), la seconda verrà introdotta più avanti nella tesi; tali leggi sono valide tanto per particelle cariche quanto per quelle neutre, infatti esse tendono a diffondere nella direzione in cui c'è mancanza di sostanza,

ovvero verso il gradiente negativo di concentrazione. Appena una sostanza viene consumata alla superficie dell'elettrodo (ad esempio da riduzione elettrochimica di ioni), le particelle cominciano a muoversi per compensare tale carenza.

$$\frac{dn}{dt} \cdot \frac{1}{A} = -D \frac{dc}{dx} \quad (1.14)$$

L'espressione (1.14) esplica come il flusso di particelle (dn/dt , misurato in moli per secondo) attraverso un'area A , sia proporzionale al gradiente di concentrazione dc/dx (ove x è la posizione, o la lunghezza, in metri) secondo una costante D definita coefficiente di diffusione.

Come detto pocanzi, in tali condizioni esiste una relazione tra il flusso di particelle e la corrente elettrolitica molto semplice. Tale relazione (1.16) è una conseguenza della legge di Faraday (1.15) che esprime la quantità di carica q corrispondente alla quantità di sostanza n che è stata trasformata nel corso di un processo elettrolitico:

$$q = zF \cdot n \quad (1.15)$$

$$I = \frac{dq}{dt} = z \cdot F \cdot \frac{dn}{dt} \quad (1.16)$$

Il gradiente di concentrazione è quindi origine e preconditione per la presenza di corrente elettrolitica, ma è anche una limitazione per la corrente stessa.

Infine, nella corrente all'elettrodo, secondo la condizione di additività o disaccoppiamento (cfr Cap. 5 "Ipotesi di lavoro di natura elettrochimica"), si possono riconoscere due componenti:

- Una corrente faradica (in quanto obbedisce alla legge di Faraday (1.15)) associata a fenomeni di trasporto di massa (anche diffusivi, come detto pocanzi) per la scarica della specie elettroattiva;
- Una corrente capacitiva dovuta alla formazione del doppio strato elettronico (figura 1.3). Tale doppio strato si comporta da condensatore con capacità molto elevata con conseguente corrente di trasferimento di carica (o capacitiva).

1.2 – Conduttori ionici [1, 6, 7]

I conduttori ionici sono quei materiali nei quali le cariche elettriche mobili sono gli ioni. Si può inoltre affermare che il trasporto di carica in questi conduttori è associato al trasporto di sostanza chimica. Esistono diverse classi di conduttori ionici: soluzioni elettrolitiche, solidi ionici, sostanze fuse (sali, ossidi) e polimeri (anche se ci sono anche polimeri conduttori elettronici) ciascuno con differenti modalità di conduzione. Ai fini della trattazione della tesi, verranno presentate le soluzioni elettrolitiche e i polimeri in quanto più inerenti allo sviluppo di un biosensore per rivelazione amperometrica degli analiti di interesse.

1.2.1 – Soluzioni Elettrolitiche

Nelle soluzioni liquide il componente maggioritario è detto solvente. Questi non sono tutti uguali e si possono distinguere due grandi famiglie:

- solventi ionici: costituiti da specie completamente dissociate in ioni (tipo sali fusi) sia in forma monoatomica che poliatomiche, e presentano una elevata conducibilità elettrica;
- solventi molecolari: sono costituiti da molecole; si comportano quasi come isolanti, avendo una ridotta conducibilità elettrica (provocata da una possibile dissociazione ionica).

Entrambi i liquidi non sono completamente amorfi, ma mantengono in parte la struttura originaria della forma cristallina dello stato solido da cui derivano.

Una soluzione elettrolitica è formata da un solvente molecolare e dagli ioni in esso disciolti. In questo caso la conducibilità elettrica raggiunge valori elevati (anche se non confrontabili con quelli dei metalli) grazie alla discreta mobilità degli ioni. La soluzione elettrolitica quindi si forma grazie alla dissoluzione di un elettrolita in un solvente molecolare. Esistono peraltro due tipi di elettroliti:

- elettroliti ionofori: sono cristalli ionici, sostanze che già nel loro stato naturale sono costituite da ioni; si tratta di sali, ossidi, idrossidi nei quali la struttura cristallina è costituita da ioni di carica opposta legati da forti interazioni coulombiane (ad esempio il cloruro di sodio, NaCl);

- elettroliti ionogeni: sono sostanze costituite da molecole neutre, che producono ioni tramite una reazione chimica con il solvente nel quale vengono disciolti (in genere si tratta di reazioni acido-base ad esempio $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{Cl}^-$)

L'interazione solvente-soluto è definita in generale solvatazione² o idratazione nel caso in cui il solvente sia acqua. Si tratta prevalentemente di interazioni ione-dipolo che portano alla costituzione della cosiddetta sfera primaria di solvatazione: un guscio di molecole di solvente fortemente legate allo ione, tanto da costituire un tutt'uno per cui gli ioni si muovono insieme alla sfera di solvatazione e di fatto le dimensioni sono quelle degli ioni solvatati. Va tuttavia sottolineato che tale sfera primaria è costituita generalmente da un numero esiguo di molecole. Non va scordato peraltro che ci possono essere anche delle interazioni di tipo prettamente chimico (ad esempio nel caso dell'acqua, la formazione di legami ad idrogeno con gli anioni rende, a parità di carica e dimensioni, più rilevante l'idratazione dei cationi).

L'interazione tra ioni e molecole del solvente può essere quantificata tramite il modello di Born che ha le seguenti assunzioni:

- le interazioni ione-solvente sono esclusivamente elettrostatiche;
- la soluzione è un dielettrico continuo con permittività costante;
- gli ioni sono sfere di raggio r_i con carica elettrica $z_i \cdot e$.

1.2.2 – Conducibilità delle soluzioni elettrolitiche [1, 6, 7]

Il trasporto di specie disciolte in un solvente avviene casualmente con moti di tipo Browniano.

Le specie disciolte in soluzione vibrano attorno ad una posizione di equilibrio, quando hanno accumulato energia sufficiente (grazie al numero elevato di vibrazioni) compiono un salto in una posizione adiacente nella struttura semi-cristallina, qualora ci sia uno

² Per sciogliere un cristallo è necessario eliminare le forze d'interazione elettrostatica tra gli ioni; ciò avviene per effetti di due contributi entrambi rilevanti:

- da una parte l'aumento della permittività diminuisce l'effetto delle forze coulombiane (basti ricordare che $\vec{F} = \frac{q_1 q_2}{r^2} * \frac{1}{4\pi\epsilon}$) per cui maggiore è la costante dielettrica ϵ del solvente, maggiore sarà la capacità di separare gli ioni;
- d'altro canto è necessario avere interazioni sufficientemente forti tra ioni e molecole del solvente, così da compensare il lavoro necessario per vincere le forze coulombiane residue comunque rilevanti.

spazio disponibile sufficiente. La frequenza dei salti dipende dall'energia richiesta per fare il salto dalla posizione di equilibrio alla nuova posizione e dall'energia richiesta per formare una posizione vuota in un sito adiacente (vacanza).

La risposta di una specie sottoposta a una forza viene descritta in termini di flusso di materia J . La relazione tra il flusso e la forza che lo origina si può esprimere come serie di potenze, assumendo il caso più comune in cui le molecole di soluto sono più grandi di quelle di solvente, di forma sferica e con un'interazione tra soluto e solvente trascurabile. In tal caso il movimento delle particelle si può ipotizzare simile a quello di una sfera di raggio r_i in un mezzo viscoso con coefficiente di viscosità η . Sulla molecola agisce una forza f_i che induce un'accelerazione, quindi la molecola si muoverà di moto uniformemente accelerato lungo la direzione della forza agente. A questo moto si oppone la resistenza dovuta all'attrito viscoso del mezzo, che genera quindi una forza resistente con stessa direzione e verso opposto della forza agente. Tale forza viene quantificata dalla legge di Stokes: $f_r = 6\pi\eta r_i v$. Come visto la forza resistente dipende dalla velocità della particella, che essendo sottoposta ad un moto uniformemente accelerato, farà crescere f_r fino ad eguagliare e quindi annullare la forza agente f_i . La velocità in condizioni stazionarie è quindi quella descritta dalla legge di Stokes:

$$v_0 = \frac{f_i}{6\pi\eta r_i} \quad (1.17)$$

A tale velocità stazionaria corrisponde un flusso di massa $J_i = c_i v_0$ ove c_i è la concentrazione della specie i -esima.

Nel caso di presenza e azione di un campo elettrico, la forza agente sulla specie ionica i -esima determina il precedente flusso. La forza elettrica per un elettrone vale $f_i = -z_i e \text{ grad}(\varphi)$ e conseguentemente per una grammoparticella vale $f_i = -z_i F \text{ grad}(\varphi)$.

Considerando il caso normale di gradiente monodirezionale, si può scrivere

$$\begin{aligned} J_i = c_i v_0 &= c_i \frac{f_i}{6\pi\eta r_i} = -c_i \frac{z_i F \text{ grad}(\varphi)}{6\pi\eta r_i} = -c_i \frac{z_i F}{6\pi\eta r_i} \frac{d\varphi}{dx} = -c_i u_i^* z_i F \frac{d\varphi}{dx} \\ &= -c_i u_i \frac{d\varphi}{dx} \end{aligned} \quad (1.18)$$

dove $u_i^* = \frac{1}{6\pi\eta r_i}$ è la mobilità assoluta dello ione i -esimo, cioè la velocità stazionaria che

si ha in presenza di una forza agente unitaria, mentre $u_i = u_i^* z_i F$ è la mobilità ionica elettrochimica, cioè la velocità in presenza di una gradiente di potenziale unitario.

Dal punto di vista elettrico la densità di corrente i è correlata a questo flusso di materia, in quanto non è altro che un flusso di particelle cariche così definito:

$$i = -\sigma \text{ grad}(\varphi)$$

dove il coefficiente fenomenologico σ , è la conducibilità elettrica specifica.

Ora, posto che $i = \sum_i z_i F J_i$, si può definire il contributo alla densità di corrente totale di uno ione i -esimo:

$$i_i = -c_i u_i^* z_i^2 F^2 \text{ grad}(\varphi) = -u_i |z_i| c_i F \text{ grad}(\varphi) \quad (1.19)$$

Per cui la densità di corrente totale sarà data da:

$$i = \sum_i z_i F J_i = - \left(\sum_i u_i |z_i| c_i F \right) \text{ grad}(\varphi) \quad (1.20)$$

da cui si ricava la definizione di conducibilità specifica totale: $\sigma = \sum_i u_i |z_i| c_i F$.

Un'altra causa del moto di particelle è la presenza di gradiente di concentrazione che provoca la cosiddetta diffusione

$$f_d = -\text{grad}(\mu) = -\frac{\delta\mu}{\delta x} = -\frac{RT}{c} \frac{\delta c}{\delta x}$$

Posto che la forza di diffusione e la forza resistente provocata dal mezzo viscoso si eguagliano, si ottiene $6\pi\eta r v = -\frac{RT}{c} \frac{\delta c}{\delta x}$ dalla quale si può formulare la prima legge di Fick:

$$J = cv = -\frac{RT}{c} \frac{\delta c}{\delta x} = -D \frac{\delta c}{\delta x} \quad (1.21)$$

ove D è detto coefficiente di diffusione.

Nel caso di soluzioni diluite è possibile utilizzare sia per la migrazione che per la diffusione lo stesso valore di u_i^* ; si ha pertanto:

$$J_{i,diff} = -u_i^* c_i \text{ grad}(\mu_i) = -u_i^* RT \text{ grad}(c_i) \quad (1.22)$$

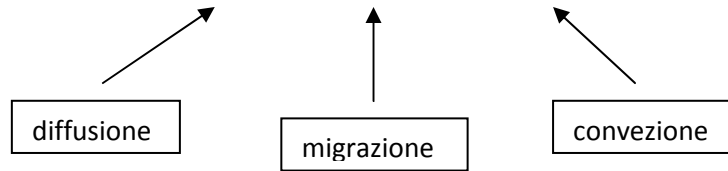
da cui si ricava $D_i = u_i^* RT$ che mostra la diretta relazione tra il coefficiente di diffusione e la mobilità. Inoltre dalla precedente equazione si ricava anche l'equazione di Einstein:

$$\frac{D_i}{u_i} = \frac{RT}{|z_i| F} \quad (1.23)$$

che fornisce la relazione tra diffusione e mobilità ionica in soluzioni diluite.

Il flusso complessivo di una specie ionica in soluzione è dato dall'equazione di Nernst-Planck:

$$J = -D \frac{dc}{dx} - \frac{zF}{RT} Dc \frac{d\phi}{dx} + cv \quad (1.24)$$



nella quale si considera anche il possibile contributo della convezione.

1.2.3 – Polimeri conduttori elettronici

Gli elettroliti polimerici sono composti ottenuti da diversi tipi di polimeri organici. Solitamente un polimero è isolante, con una conducibilità specifica fino a 10^{12} volte più piccola di quella di un metallo. Tuttavia però, con opportuni trattamenti, alcuni polimeri possono diventare dei buoni conduttori.

Esistono diversi polimeri organici che presentano conducibilità specifiche molto elevate (di tipo elettronico) confrontabili con quelle dei metalli.

Il meccanismo della conduzione può essere abbastanza diverso a seconda del tipo di polimero e del tipo di trattamento che gli viene riservato.

Il raggiungimento di una elevata conducibilità si può realizzare tramite tre diverse metodologie:

- Polimeri redox;
- Materiali con ionomeri³ caricati;
- Polimeri conduttori elettronici.

I polimeri redox contengono un gruppo redox attaccato, ad intervalli regolari, alla catena polimerica. Il movimento di elettroni avviene tramite la modifica dello stato redox dei gruppi in questione. Ovviamente il numero di gruppi nello stato ridotto (Red) e dei gruppi nello stato ossidato (Ox) dipende dal potenziale applicato al polimero.

È facilmente intuibile che quando il potenziale è vicino al suo valore standard, si avrà la conducibilità massima in quanto si ha la massima concentrazione di entrambe le forme

³ Ionomero: particolare polimero contenente ioni. È un copolimero avente sia unità ripetitive neutre, sia una piccola parte (il 15 % di tutti i monomeri costituenti lo ionomero) di unità ripetitive contenenti specie ioniche. Vengono utilizzati per formare membrane ione-selettive.

Copolimero: polimero formato da monomeri di diverse specie

(Ox e Red). Altrimenti ad un potenziale al quale fosse presente solo una delle due forme, il polimero risulterebbe isolante:

$$E = E^{\theta} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{c_{Ox}}{c_{Red}} \right) \quad (1.25)$$

I materiali con ionomeri caricati sono costituiti da polimeri che contengono unità monometriche con carica elettrica (ionomeri appunto), che viene bilanciata da un controione libero. Per diventare conduttori elettronici è necessario che gli ionomeri inglobino una coppia redox con carica complessiva opposta a quella dello ionomero. In tali condizioni il movimento di elettroni avviene nello stesso modo dei polimeri redox. Per quanto concerne i polimeri conduttori elettronici, ci limiteremo a trattare il caso delle poliolefine coniugate, ovvero il caso di polimeri con una serie di doppi legami coniugati, intercalati da legami semplici. In questo caso la conducibilità è dovuta alla delocalizzazione degli elettroni π realizzata dal sistema coniugato. Grazie a questa gli elettroni possono muoversi liberamente nel polimero. Il problema si pone quando gli elettroni devono passare da una catena polimerica ad un'altra; il polimero in se è neutro e quindi privo di conducibilità, dato che tutti gli orbitali di legame sono occupati e gli orbitali di antilegame vuoti sono ad un livello energetico più elevato. In pratica si pone la stessa situazione di un semiconduttore con la banda di valenza piena e la banda di conduzione vuota ma con un band gap elevato.

I polimeri conduttori elettronici vengono impiegati in diversi dispositivi come nell'elettrocatalisi, grazie alla capacità della sintesi organica di funzionalizzare la superficie dei materiali elettrodici per attaccare al polimero qualsiasi gruppo funzionale. Particolarmente importante è il loro uso in bioelettrochimica, per la possibilità di realizzare biosensori (si può attaccare sulla loro superficie enzimi in grado di riconoscere sostanze specifiche) e per la maggiore compatibilità biologica rispetto ai metalli [1, 6, 7].

Bibliografia

1. Encyclopedia of Electrochemistry, (Malestrom)
2. D. A. Borkholder, Cell Based Biosensors using Microelectrodes, Stanford University, 1998
3. Peter Gründler, Chemical Sensors An Introduction for Scientists and Engineers, Ed. Springer, 2007
4. L. Calligaro, A. Mantovani, Chimica per ingegneria, Ed. Libreria Cortina, 1989
5. A. Post Baracchi, A. Tagliabue, Chimica Progetto Modulare, Ed. Lattes, 2005
6. A. Baracca, M. Fischetti, R. Rigatti, Fisica e Realtà 2 Forze, Campi, Movimento, Ed. Cappelli, 1999
7. H. Saechtling, Manuale delle materie plastiche, Ed. Tecniche nuove, 2006

2.1 – Enzimi

Un enzima è una proteina (sequenza di amminoacidi organizzati in una struttura terziaria e quaternaria ben definita) in grado di accelerare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità. Chimicamente si parla di catalizzatore biologico.

L'enzima partecipa attivamente alla relativa reazione chimica: il substrato (la molecola su cui agisce l'enzima) va a legarsi al sito attivo (la zona dell'enzima in cui avvengono le reazioni), formando un complesso attivato. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per agire nuovamente.

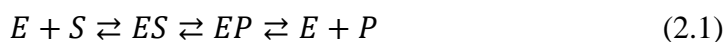
Gli enzimi vengono classificati in base alla reazione che catalizzano e per questo sono stati divisi in classi:

1. *Ossidoreduttasi*: catalizzano reazioni di ossido-riduzione.
2. *Trasferasi*: catalizzano il trasferimento di un gruppo ben preciso (metile, acile, ammino, fosfato) da una sostanza ad un'altra.
3. *Idrolasi*: catalizzano reazioni di idrolisi.
4. *Liasi*: accelerano le addizioni ai doppi legami.
5. *Isomerasi*: catalizzano reazioni di riarrangiamento di struttura carboniosa.
6. *Ligasi*: accelerano la formazioni di alcuni legami con acquisto di energia per rottura di un legame fosfato dell'ATP.

Ogni classe di appartenenza è poi suddivisa in sottoclassi in base al substrato che prende parte alla reazione e al prodotto formato [1].

2.1.1 – Parametri cinetici delle reazioni enzimatiche

Dal punto di vista analitico gli enzimi sono caratterizzati da studi cinetici sulla loro attività. Questo viene realizzato monitorando la variazione della velocità di reazione modificando le concentrazioni di reagente e le condizioni sperimentali. Nelle reazioni enzimatiche la conversione del reagente (indicato con S) è catalizzata dall'enzima, che al termine della reazione da uno o più prodotti (P) [2]. Si consideri una generica reazione catalizzata ad un solo substrato:



e introduciamo delle semplificazioni che diventano condizioni operative: ES è l'unico complesso che reagisce cataliticamente (cataliticamente competente) e la reazione

$ES \rightleftharpoons E + P$ è irreversibile, quindi diventa $ES \rightarrow E + P$. Si può dunque riscrivere l'equazione (2.1) :



Ove le k rappresentano le costanti di velocità della reazione.

Le condizioni di irreversibilità della reazione $ES \rightarrow E + P$ sperimentalmente si ottengono sfruttando la legge di azione di massa e considerando la velocità iniziale della reazione, definita come $v = k_p[ES]$. A questo punto ci sono due modi in cui può avvenire la reazione (2.2) in base alla velocità che assume la reazione $ES \rightarrow E + P$: se E, S ed ES si equilibrano molto rapidamente fra loro rispetto alla velocità con cui ES va a dare E + P, si parla di *rapido equilibrio*, se invece la velocità della reazione $ES \rightarrow E + P$ non è trascurabile, per cui non si è in presenza di situazione di rapido equilibrio, si parla di *stato stazionario*. Generalmente per l'analisi teorica ci si pone nelle condizioni di stato stazionario, potendo questo considerarsi una sorta di caso generale dello stato di rapido equilibrio. In tali ipotesi si considera che:

- la variazione di concentrazione del complesso ES sia nulla, quindi $\frac{d[ES]}{dt} = 0$;
- che la concentrazione di substrato sia molto maggiore delle forme in cui è presente l'enzima totale: $[S] \gg [E_{tot}]$ posto che $[E_{tot}] = [E] + [ES]$ e infine si definiscono:
 - Velocità di formazione di ES : $v = k_1[E][S]$;
 - Velocità di scomparsa di ES : $v = k_{-1}[ES] + k_p[ES] = (k_{-1} + k_p)[ES]$.

Nelle condizioni sopra delineate si avrà che la velocità di formazione è pari alla velocità di scomparsa, quindi:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_p)[ES] \quad (2.3)$$

da cui si ha che:

$$[ES] = \left(\frac{k_1}{k_p + k_{-1}} \right) [E][S] \quad (2.4)$$

con $K_M = \frac{k_p + k_{-1}}{k_1}$ detta costante di Michaelis.

Si può quindi riscrivere, dopo alcuni passaggi matematici, la velocità iniziale della reazione:

$$v = [E_{tot}] \frac{k_p[S]}{K_M + [S]} \quad (2.5)$$

Definendo la velocità massima di reazione (o velocità di saturazione) come la velocità ottenibile quando tutto l'enzima è nella forma ES: $V_{max} = k_p[E_{tot}]$, si ottiene una corrispondenza diretta fra v e V_{max} , detta equazione di Michaelis e Menten

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.6)$$

che rappresenta un'iperbole equilatera nel piano $V - [S]$ (fig 2.1)

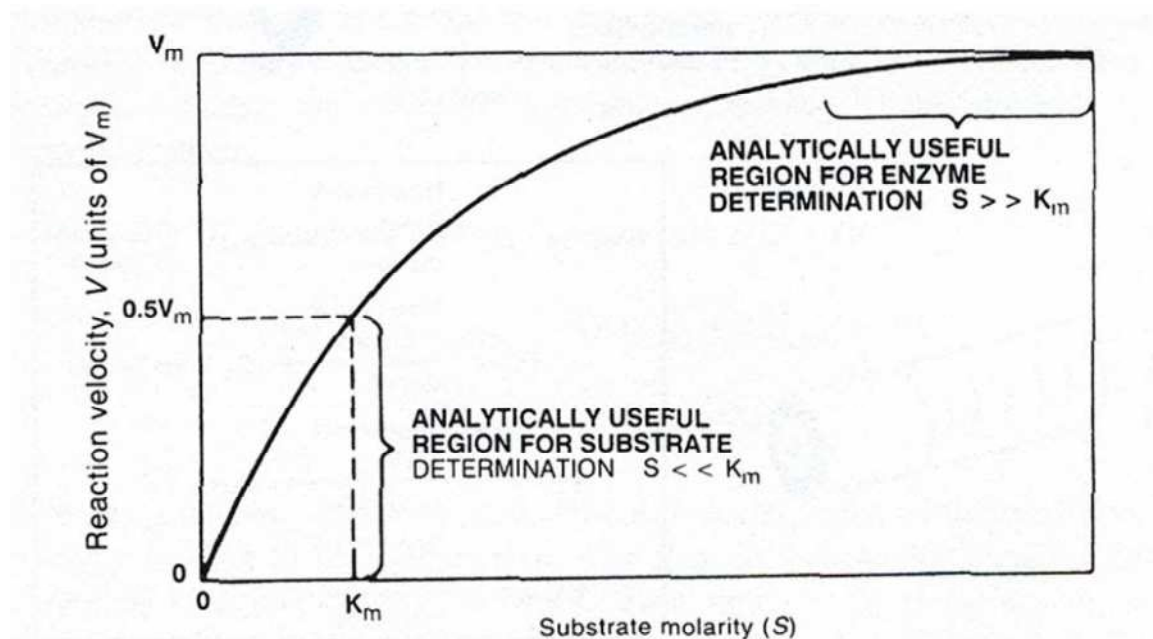


Fig. 2.1: dipendenza della velocità di una reazione enzimatica dalla concentrazione di substrato (V_m corrisponde a V_{max}) [2].

Nella figura viene evidenziato il caso di $v = \frac{1}{2}V_{max}$ ove si è posto $K_m = [S]$ ovvero, si è imposto che K_m coincidesse con la concentrazione di substrato a cui la velocità è la metà della velocità massima di reazione. Si nota quindi che K_m è un parametro cinetico caratteristico per un determinato substrato in determinate condizioni di reazione [3].

Poiché attraverso il grafico di figura 2.1 il calcolo dei parametri cinetici K_m e V_{max} solitamente risulta complicato, vengono utilizzati dei grafici derivati dall'equazione (2.6) che rappresentano equazioni di rette (nelle ipotesi che la cinetica analizzata obbedisca alle'equazione (2.6)). Il grafico più semplice è il cosiddetto grafico dei doppi reciproci (o grafico di Lineweaver – Burk), così chiamato in quanto mette in ascissa il reciproco della concentrazione di substrato $\left(\frac{1}{[S]}\right)$ e in ordinata il reciproco della velocità iniziale

misurata $\left(\frac{1}{v}\right)$. Riprendendo l'equazione (2.6) e facendone il reciproco si ottiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.7)$$

Tale relazione esprime una retta del tipo $y = ax + b$ ove l'intercetta sull'asse y è $\frac{1}{V_{max}}$, la pendenza è $\frac{K_M}{V_{max}}$ e l'intercetta sull'asse x è $-\frac{1}{K_M}$ (vedi grafico di figura 2.2)

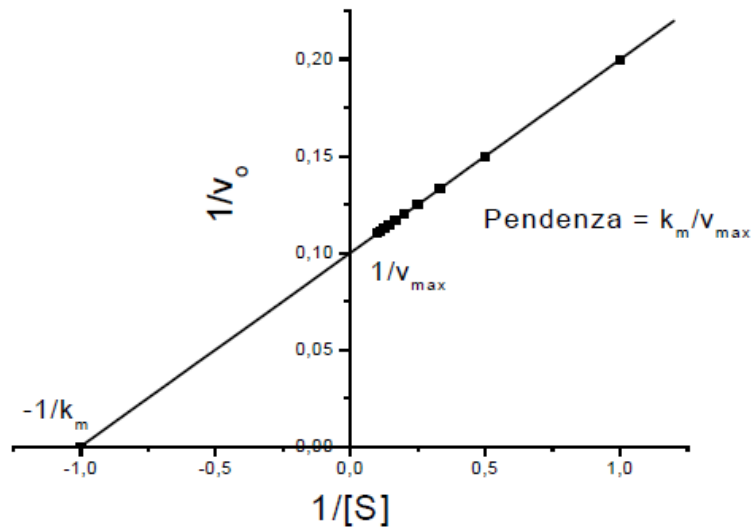


Fig 2.2: Grafico della funzione matematica corrispondente al reciproco dell'equazione di Michaelis Menten. Riportando in ascissa i valori sperimentali del reciproco della concentrazione del substrato e in ordinata i valori determinati sperimentalmente del reciproco della velocità iniziale di una reazione enzimatica, si ottiene una retta la cui intersezione con l'ordinata fornisce il reciproco della velocità massima e con l'ascissa il reciproco negativo della costante di Michaelis (K_m) [1].

Determinare tale valore risulta fondamentale ai fini di conoscere l'affinità dell'enzima immobilizzato con il substrato e quindi risalire al range di concentrazione del substrato all'interno del quale la risposta elettrodica è lineare [7].

2.2 – L'Acido Lattico

L'acido lattico (peso molare 90,10 u) è un acido carbossilico e la sua formula chimica è $C_3H_6O_3$. La sua deprotonazione da origine allo ione lattato.

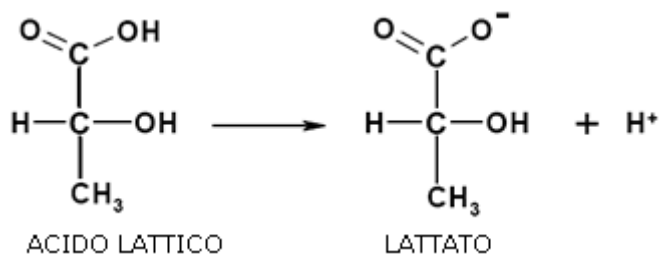


Figura 2.3 : deprotonazione dell'acido lattico e successiva trasformazione in lattato + H^+

La molecola dell'acido lattico è chirale, ne esistono dunque due enantiomeri⁴; dei due tuttavia solo uno è coinvolto nei cicli biologici ed è l'acido S-(+)-lattico o acido L-(+)-lattico.

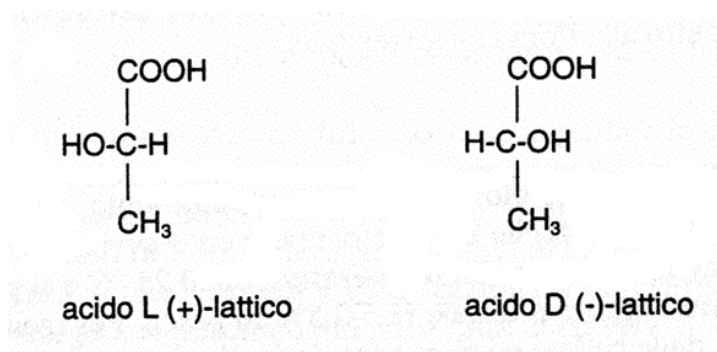


Figura 2.4 : enantiomeri dell'acido lattico

2.2.1 – Glicolisi anaerobica e formazione dell'acido lattico[4]

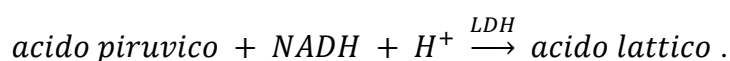
Quando un soggetto è in carenza o mancanza d'ossigeno, la fosforilazione ossidativa⁵ non può avere luogo. Tuttavia, anche in queste condizioni una piccola quota di energia può essere liberata nelle cellule mediante la glicolisi, perché le reazioni chimiche della degradazione glicolitica del glucosio ad acido piruvico non richiedono ossigeno. Questo

⁴ Enantiomero: sono detti enantiomeri due entità molecolari che sono immagini speculari ciascuna dell'altra e non sono sovrapponibili (come l'acido L-(+)-lattico e l'acido D-(-)-lattico in fig (2.4)).

⁵ Fosforilazione ossidativa: processo biochimico cellulare, intermedio di glicolisi e ciclo di Krebs, di formazione di ATP mediante il trasferimento diretto di un gruppo fosfato ($-PO_4$) da una molecola organica all'ADP(vedi nota 3).

processo comporta un enorme dispendio di glucosio, perché da ogni molecola vengono utilizzate solo 24.000 cal per produrre 2 molecole di ATP⁶ che rappresentano poco più del 3% dell'energia totale contenuta in una molecola di glucosio, ciononostante, questa energia liberata mediante la glicolisi, definita energia anaerobica, può essere d'importanza vitale per le cellule per alcuni minuti quando manca la disponibilità dell'ossigeno.

La legge dell'azione di massa stabilisce che quando i prodotti finali di una reazione chimica si accumulano nel mezzo in cui avviene la reazione, la velocità della reazione stessa tende a zero. I due prodotti terminali delle reazioni glicolitiche sono acido piruvico e atomi di idrogeno combinati con NAD⁺ per formare NADH⁷ + H⁺. L'accumulo di uno dei due o di entrambi questi prodotti tenderebbe a fermare il processo glicolitico impedendo così l'ulteriore formazione di ATP. Quando questi due prodotti terminali cominciano a essere in eccesso, reagiscono l'uno con l'altro per formare acido lattico, secondo la reazione:



⁶ ATP & ADP: L'adenosintrifosfato (ATP) è diffuso in tutti gli organismi animali e vegetali e partecipa a numerose reazioni biochimiche. Esso rappresenta, nella grandissima maggioranza degli organismi viventi, la principale fonte intracellulare di energia chimica, utilizzabile per una vasta gamma di attività cellulari. Uno o più gruppi fosforici dell'adenosintrifosfato possono essere trasferiti enzimaticamente ad altri composti (compresa l'acqua, nel caso della idrolisi), con liberazione di una considerevole quantità di energia ($\Delta G^\circ = -7,3$ kcal/mol). Il trasferimento dei gruppi fosforici dell'adenosintrifosfato, generalmente attraverso reazioni accoppiate, rappresenta il meccanismo principale mediante il quale viene ottenuta l'energia per le biosintesi, il lavoro muscolare, il lavoro osmotico, la bioluminescenza, ecc. L'adenosintrifosfato può essere sintetizzato da adenosindifosfato e ortofosfato durante il catabolismo di vari substrati nella fosforilazione ossidativa a livello di substrato, oppure nella catena respiratoria mitocondriale.

L'Adenosindifosfato (ADP) può formarsi per idrolisi dell'adenosintrifosfato (ATP) durante i processi biosintetici come l'attività muscolare. L'adenosindifosfato esercita un'importante azione di regolazione sulla catena respiratoria in quanto la sua concentrazione, assieme a quella del fosfato inorganico, rappresenta il fattore limitante il processo. Il livello intracellulare di adenosindifosfato, inoltre, influisce sulla regolazione della glicolisi e di altre importanti vie metaboliche.

⁷ NAD, NADH: Nicotinammide adenina dinucleotide (a cui ci si riferisce spesso con la formula NAD o NADH, a seconda dello stato di ossidazione) è una biomolecola il cui ruolo biologico consiste nel trasferire gli elettroni, quindi nel permettere le ossido-riduzioni; essa svolge il suo importante ruolo tramite lo spostamento di atomi di idrogeno. È un coenzima ossidoriduttivo.

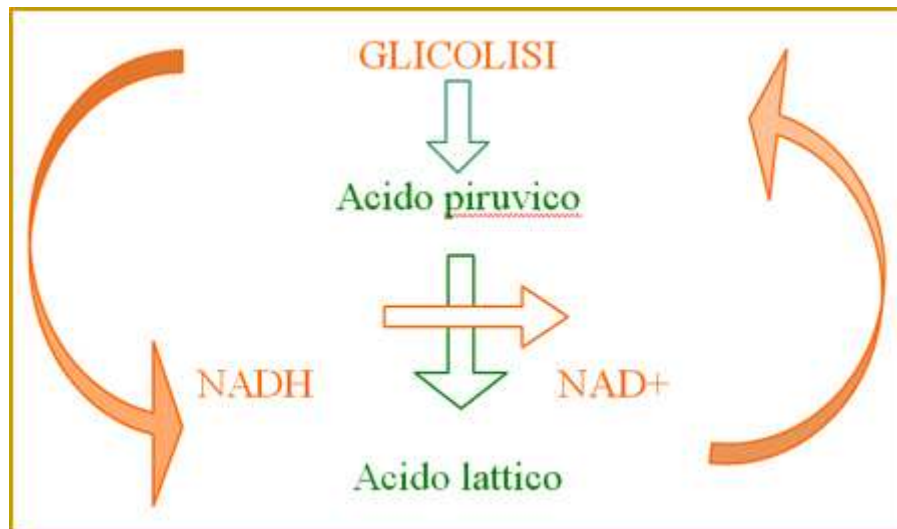


Fig 2.5 : ciclo di formazione dell'acido lattico e rigenerazione dell' -NAD

In condizioni anaerobiche la maggior parte dell'acido piruvico prodotto viene pertanto convertita in acido lattico, che diffonde facilmente dalla cellula nel liquido extracellulare e anche nel liquido intracellulare di altre cellule meno attive. Perciò l'acido lattico rappresenta una sorta di valvola di scarico per i prodotti terminali della glicolisi, che consente a quest'ultima di procedere molto più a lungo di quanto non potrebbe avvenire se l'acido piruvico e l'idrogeno non venissero rimossi dal mezzo di reazione. In effetti, la glicolisi potrebbe procedere soltanto per pochi secondi senza questa conversione, mentre grazie ad essa può procedere per diversi minuti, erogando all'organismo una considerevole quantità di ATP anche in assenza di ossigeno respiratorio. Tale processo viene chiamato fermentazione omolattica (per distinguerla da quella eterolattica che come prodotto finale della reazione ha altri prodotti collaterali oltre all'acido lattico) e si incontra principalmente in alcuni batteri della famiglia delle Lactobacillacee⁸ e nel metabolismo anaerobico di alcuni tessuti (muscolo) degli organismi pluricellulari.

⁸ Le Lactobacillacee sono divise in quattro gruppi:

- Streptococcus;
- Pediococcus;
- Lactobacillus;
- Leuconostoc.

Il lactobacillus a sua volta è diviso in tre sottogeneri:

- Thermobacterium;
- Streptobacterium;
- Betabacterium.

2.2.2 – Riconversione dell'acido lattico quando l'ossigeno è nuovamente disponibile

Una volta che il soggetto riprende a respirare ossigeno dopo un periodo di metabolismo anaerobico, l'acido lattico viene rapidamente riconvertito in acido piruvico più $\text{NADH} + \text{H}^+$, che vengono in gran parte immediatamente ossidati per formare grandi quantità di ATP. Questo eccesso di ATP fa sì che circa i $\frac{3}{4}$ della rimanente eccedenza di acido piruvico vengano riconvertiti in glucosio.

In questo modo la grande quantità di acido lattico che si forma durante la glicolisi anaerobica non viene perduta dall'organismo: quando l'ossigeno è di nuovo disponibile l'acido lattico può essere riconvertito in glucosio oppure viene utilizzato direttamente per fornire energia. Questa riconversione avviene prevalentemente nel fegato e in misura minore in altri tessuti.

Il muscolo cardiaco, ad esempio, è particolarmente efficiente nel convertire l'acido lattico in acido piruvico per poi utilizzarlo per scopi energetici. Ciò si verifica soprattutto nel corso di attività fisiche molto pesanti, durante le quali da parte dei muscoli scheletrici vengono liberate nel sangue grandi quantità di acido lattico, che rappresenta perciò un sorgente supplementare di energia per il cuore [4].

2.2.3 – Implicazioni diagnostiche

Generalmente sono considerati normali valori di acido lattico intorno ai 4,5 – 19,8 mg/100ml per il sangue venoso e 4,5 – 14,4 mg/100ml per quello arterioso (che equivalgono circa a 1 – 2 mmol/l) [8].

L'aumento del livello ematico dell'acido lattico può essere sintomatico di diverse cause. Quella che si verifica più spesso, ad esempio durante uno sforzo fisico, è l'ipossia

In tabella si dà una caratterizzazione delle lactobacillacee secondo fermentazione e prodotti della fermentazione.

Batterio	Tipo di fermentazione	Prodotti
Streptococcus	Omolattica	Acido lattico
Pediococcus	Omolattica	Acido lattico
Lactobacillus Thermobacterium	Omolattica	Acido lattico
Lactobacillus Streptobacterium	Eterolattica	Acido lattico + Acido acetico
Lactobacillus Betabacterium	Eterolattica	Acido lattico + Acido acetico + CO_2
Leuconostoc	Eterolattica	Acido lattico + Acido acetico + CO_2

(generalizzata o tissutale), ovvero la carenza di ossigeno in tutto l'organismo o solo in una parte di esso. Altre cause che possono comprendere l'iperlattacidemia sono: i vari tipi di shock (cardiogeno, ipovolemico, settico), l'insufficienza epatica, il deficit di tiamina, l'avvelenamento da monossido di carbonio, farmaci e/o tossine⁹ [5].

La misurazione dell'acido lattico, effettuata nel sangue o nel plasma, può quindi fornire informazioni fondamentali sullo stato di salute di un paziente. Ad oggi numerosi studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra i livelli di lattato, il grado di acidosi e la

⁹ Ipossia: è la mancanza di ossigeno a tessuti o cellule. Può avere diverse cause tra le quali:

- inadeguata ossigenazione del sangue nel polmone dovuta a cause extrapolmonari (rarefazione dell'aria, ipoventilazione da disturbi neuromuscolari);
- malattie polmonari;
- shunt veno-arterioso (come gli shunt cardiaci da ventricolo destro a ventricolo sinistro)
- inadeguato trasporto o liberazione di ossigeno nei tessuti da parte del sangue (insufficienza circolatoria, anemia);
- inadeguata capacità dei tessuti di utilizzare l'ossigeno (avvelenamento degli enzimi ossidativi cellulari, avvelenamento da cianuro).

Gli effetti sull'organismo sono principalmente depressione dell'attività mentale, con possibile sopraggiunta di coma, riduzione della capacità di lavoro muscolare e nei casi più gravi morte delle cellule in tutto l'organismo.

Shock: la maggior parte delle alterazioni metaboliche che compaiono nei tessuti durante lo shock possono provocare acidosi nell'organismo. L'acidosi è dovuta alla marcata diminuzione delle reazioni ossidative nelle quali vengono coinvolti i substrati a livello dei tessuti, conseguente all'insufficiente apporto di ossigeno che essi ricevono. In queste condizioni le cellule ricavano la maggior parte dell'energia dal processo di glicolisi anaerobica nel corso della quale vengono prodotte grandi quantità di acido lattico, che si accumula nel sangue. L'acidosi generalizzata o localizzata in alcuni tessuti è quindi un fattore negativo che interviene nello shock ed è anche responsabile della sua progressione.

Tiamina (vitamina B₁₂): la carenza di tiamina fa diminuire l'utilizzazione dell'acido piruvico e di alcuni amminoacidi da parte dei tessuti. Questo comporta quindi un aumento della concentrazione di acido piruvico che viene poi riconvertito in acido lattico per produrre energia.

La carenza tiaminica indebolisce di molto l'attività del sistema nervoso in quanto l'utilizzo del glucosio da parte di questo può ridursi addirittura del 50-60%. In tali condizioni le cellule del sistema nervoso centrale manifestano le caratteristiche dell'iponutrizione neuronale che comporta una compromissione della trasmissione dei segnali nervosi in molte aree del sistema nervoso centrale. Infine a livello neuronale può anche causare degenerazione della guaina mielinica delle fibre nervose nel sistema nervoso centrale e periferico.

Anche il cuore può risentire molto di questo deficit. In primis la muscolatura cardiaca tende ad indebolirsi e nei casi più gravi si può incorrere anche nell'insufficienza cardiaca. Inoltre si verifica una vasodilatazione periferica in tutto il sistema circolatorio che provoca un eccessivo ritorno di sangue venoso al cuore.

Infine si possono avere disturbi anche di tipo gastrointestinale, come disturbi alla digestione, costipazione, anoressia, tutti dovuti alla carenza di energia ricavata dal metabolismo dei carboidrati.

mortalità dei pazienti critici in stato di shock ed è stato peraltro ipotizzato che tale correlazione possa essere tempo-dipendente. Tale ipotesi è stata formulata in quanto si è verificato che una rapida normalizzazione (nel giro di 24 ore) dell'iperlattacidemia riduce la mortalità, mentre la sua persistenza si associa ad una mortalità superiore al 75% dei casi [6]. Inoltre nei pazienti colpiti da shock circolatorio, si è notata una stretta correlazione fra l'eccessiva l'iperlattacidemia e la mortalità: infatti la probabilità di decesso si attestava al 60% quando il lattato ematico eccedeva i 2 mmol/l e addirittura all'80% quanto superava i 4 mmol/l [5].

2.3 – Enzimi per la rilevazione [9]

La maggioranza dei metodi analitici convenzionali per la determinazione dell'acido lattico sfrutta tecniche spettrofotometriche o cromatografiche (cfr Cap. 3), pertanto richiede il pretrattamento del campione e non distingue gli isomeri D e L (vedi sopra). Tali metodologie risultano però spesso poco funzionali e per questo motivo si sta concentrando l'attenzione su metodi di analisi enzimatica, che sfruttano per l'appunto degli enzimi che catalizzano una reazione di ossidoriduzione, dalla quale si possono effettuare misure elettrochimiche.

Gli enzimi utilizzati per la detection dell'acido lattico sono la lattato deidrogenasi (LDH) e la lattato ossidasi (LOD o LOx). Il primo ossida l'acido lattico in acido piruvico e riduce l' NAD^+ in NADH, con successiva produzione di due elettroni (vedi figura 2.6)

✓ Lactate dehydrogenase

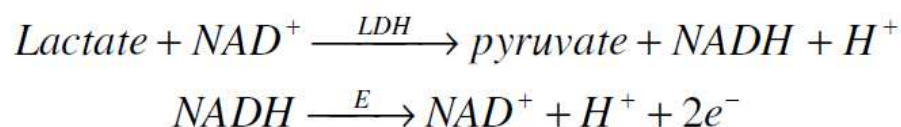


Figura 2.6 : reazione catalizzata dall'enzima LDH

Come si nota in figura, l'enzima LDH viene utilizzato come una sorta di mediatore nella produzione di acido piruvico e nella riduzione dell' NAD^+ ; tale processo comprende quindi numerosi fattori all'interno della reazione, e inoltre il potenziale richiesto per portarla a termine è molto alto. Proprio per questo e per la migliore reperibilità commerciale, è spesso preferito l'enzima lattato ossidasi; questo nella reazione di

ossidazione con l'acido lattico, ossida quest'ultimo in acido piruvico e riduce se stesso dalla forma ossidata alla forma ridotta. L'aggiunta di ossigeno come mediatore fa sì che abbia inizio una nuova reazione che ossida l' LOD e produce perossido di idrogeno, il quale attraverso un'ultima riduzione produce ossigeno libero e due elettroni (vedi figura 2.7) [9].

✓ Lactate oxidase

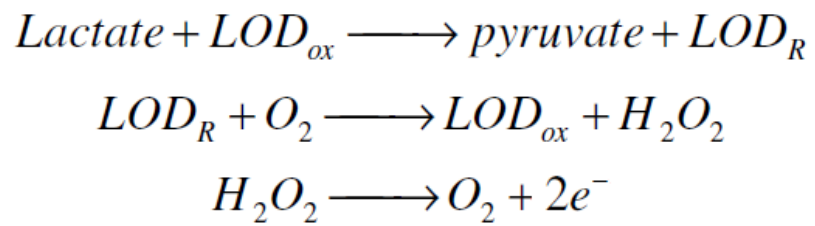


Figura 2.7 : reazione catalizzata dall'enzima LOD

Bibliografia:

1. Adriana Mignani, Sviluppo di Biosensori: Modifiche di Superfici Elettrodiche e Sistemi di Immobilizzazione Enzimatica, Università degli Studi di Bologna Alma Mater Studiorum, A.A. 2007-2008
2. Walter Vastarella, Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors, Università degli Studi di Bari, XIV Ciclo, A.A. 1998-2001
3. S. Pagani, M. Duranti, Enzimologia: dai fondamenti alle applicazioni, Ed. Piccin, 1998
4. A. C. Guyton, J. E. Hall, Fisiologia Medica, Ed. Masson, 2006, undicesima edizione
5. Paul L. Marino, The ICU book, Terapia Intensiva: Principi fondamentali, Ed. Masson, 2007
6. B. Andreoni, O. Chiara, D. Coen, S. Vesconi, Diagnosi e Trattamento delle emergenze medico-chirurgiche, Ed. Masson, 2010
7. M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso, Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase – based biosensore, Biosensors and Bioelectronics, 25, 2038 – 2044, 2010
8. S. Adamanti, Dati di laboratorio (valori normali), Casa editrice scientifica internazionale, 1992
9. B. Ballarin, I. Carpani, L. Guadagnini; A. Mignani, E. Scavetta, D. Tonelli, Sviluppo di un biosensore amperometrico per la determinazione dell'acido lattico, Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica, Università di Bologna, 2008

3.1 – Biosensori, un'introduzione

Un biosensore è un dispositivo completo e integrato capace di fornire informazioni analitiche specifiche usando un elemento di riconoscimento biologico (recettore biochimico) in diretto contatto con un trasduttore. È un dispositivo, che traduce un evento chimico in un segnale rilevabile [IUPAC, 1999].

Il sistema di ricognizione biologica, solitamente costituito da una proteina recettore, un enzima o un anticorpo, può essere basato sia sulla trasformazione catalitica di una sostanza, sia sulla rilevazione di enzimi inibitori o mediatori; esso ha la funzione di trasformare l'informazione dal dominio biochimico a quello fisico o chimico del segnale d'uscita ricavato dal biosensore [1].

Un aspetto di notevole importanza nella progettazione di un biosensore è l'instabilità del recettore biologico, il quale è soggetto a denaturazione. Riuscire ad aumentare la stabilità delle biomolecole è uno degli ambiti di ricerca maggiore nello sviluppo dei biosensori. Una soluzione a tal problema si è rivelata essere la procedura di immobilizzazione delle biomolecole sui siti attivi dei dispositivi. Attualmente la letteratura descrive una vasta gamma di tecniche di immobilizzazione, alcune delle quali saranno poi oggetto di attenzione all'interno della tesi.

3.1.1 – Performance di un biosensore[2]

Dal punto di vista delle performance, esistono alcuni parametri sia statici che dinamici che permettono di caratterizzare la bontà o meno di un dispositivo:

- Sensibilità: cambiamento del segnale misurato per unità di concentrazione dell'analita, ovvero la pendenza della curva di taratura;
- Limite di rilevazione: minimo valore di concentrazione che può essere rilevato dal sensore in condizioni definite. Non si può determinare se l'analita possa essere quantificato o meno al limite di rilevazione;
- Range dinamico: intervallo di concentrazione fra il limite di rilevazione e il limite superiore di concentrazione rilevabile;

- Selettività: espressione di quanto un sensore risponda specificamente per l'analita o il gruppo di analiti in questione. Per vari tipi di biosensori, esistono diverse espressioni quantitative di selettività;
- Linearità: deviazione relativa da una retta ideale della curva di taratura sperimentalmente determinata. Generalmente i valori di linearità sono specificati per un certo range di concentrazione;
- Risoluzione: minima differenza di concentrazione percepibile quando la composizione varia continuamente. Questo valore è importante soprattutto per i rivelatori in flussi continui;
- Tempo di risposta: tempo di variazione dell'uscita da una concentrazione nulla ad una non nulla. Viene solitamente inteso come tempo di salita fino ad un determinato rapporto del valore finale;
- Stabilità: capacità del sensore di mantenere le sue prestazioni per un certo periodo di tempo. Come misura della stabilità vengono usati valori di deriva come la variazione del segnale per concentrazione nulla;
- Ciclo di vita: tempo durante il quale il sensore funziona. Si possono distinguere tra massimo tempo di conservazione e massimo tempo di operatività, infatti quest'ultimo può essere specificato per un tempo continuo o per cicli di on-off.

3.1.2 – Classificazione di biosensori

I biosensori possono essere classificati sulla base dei principi di trasduzione del segnale, dalla quale risultano i seguenti gruppi di biosensori [2]:

- Biosensori ottici dipendenti da assorbanza, riflettanza, luminescenza, fluorescenza, indice di rifrazione, effetto optotermico e diffusione della luce;
- Biosensori elettrochimici tra cui dispositivi amperometrici, potenziometrici, conduttimetrici e transistor a effetto di campo (FETs);
- Biosensori elettrici, come quelli di conducibilità elettrolitica, con ossidi metallici e semiconduttori organici;
- Biosensori di massa, ovvero i dispositivi piezoelettrici e quelli basati sulle onde acustiche di superficie;
- Biosensori magnetici (principalmente per ossigeno) basati su gas con proprietà paramagnetiche;

- Biosensori termometrici basati sulla misurazione degli effetti di calore prodotto da una reazione chimica specifica;
- Altri biosensori basati prevalentemente su emissione o assorbimento di radiazioni.

Tra tutti questi tipi di biosensori, quelli elettrochimici sono i più adatti ad essere miniaturizzati, grazie alla minima distanza fra trasduttore ed elemento biologico, in più possono operare anche in mezzi torbidi (come soluzioni biologiche) a differenza di quelli ottici; hanno tempi di risposta estremamente ridotti (a differenza dei biosensori ottici bioluminescenti) in quanto generano immediatamente i segnali elettrici; solitamente presentano un limite di rilevazione inferiore e costi generalmente più bassi di tutti gli altri tipi di biosensori.

Per questi motivi i biosensori elettrochimici sono i più utilizzati nei test di monitoraggio di bioprocessi industriali (amminoacidi, lieviti, acido lattico, etanolo, ecc.), ambientali (pesticidi, fertilizzanti, sostanze estrogeniche, CO, CO₂, ecc.), nella diagnostica clinica (glucosio, acido lattico, alcool, DNA, ormoni, ecc.) e in campo forense (cocaina, antrace, agenti nervini, ecc.) [3].

Le caratteristiche, e dunque i campi di impiego, dei biosensori elettrochimici dipendono fortemente dalla tipologia di trasduzione che ne sta alla base:

- I biosensori amperometrici sono basati sulla misurazione della corrente risultante dall'ossidazione o dalla riduzione di specie elettroattive, mantenendo un potenziale costante all'elettrodo di lavoro (o array di elettrodi) rispetto a un elettrodo di riferimento, che può anche agire come elettrodo ausiliario se le correnti sono basse (tra 1 nA e 1 μ A). La corrente risultante è direttamente correlata alla concentrazione della sostanza elettroattiva nel bulk o alla sua reazione nello strato biocatalitico.
- I biosensori potenziometrici dipendono dalla determinazione della differenza di potenziale tra un elettrodo indicatore e uno di riferimento (o due elettrodi di riferimento separati da una membrana selettiva) senza significativi flussi di corrente.
- Molte reazioni enzimatiche e molti recettori biologici possono anche essere monitorati con dispositivi conduttimetrici e impedimetrici. Poiché la sensibilità della misura viene ostacolata dalla conduttanza della soluzione del campione, di

solito si esegue una misura differenziale tra un sensore con enzima e uno identico senza enzima.

- Infine un'importante variazione dei sistemi usati per determinare le concentrazioni di ioni sono i transistor a effetto di campo sensibili agli ioni (ISFET). Tali dispositivi sono composti da una membrana ione-selettiva applicata direttamente sul gate del FET. Quando gli ISFET vengono uniti a strati biocatalitici vengono solitamente chiamati FET ad enzima (ENFET) o FET immunologici (IMFET) [1].

3.2 – Generazioni di biosensori

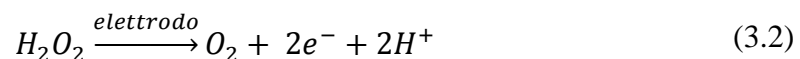
Parallelamente alla classificazione dei biosensori amperometrici basata sulla tipologia di trasduzione, è diffusa una loro classificazione in generazioni basata sul meccanismo di trasporto elettronico che si verifica fra sito attivo e soluzione bulk.

3.2.1 – Biosensori di prima generazione

Nei dispositivi di prima generazione l'enzima viene fisicamente intrappolato vicino alla superficie dell'elettrodo. Tali dispositivi fanno affidamento sull'ossigeno molecolare ed il loro scopo è quello di rilevare il perossido di idrogeno (H_2O_2) prodotto nel processo di ossidazione, catalizzato da un enzima ossidasi:



Durante il ciclo di catalisi l'enzima viene prima ridotto e poi rigenerato tramite ossidazione, con l'ossigeno molecolare in soluzione. La modalità operativa di questi dispositivi si basa sull'ossidazione elettrochimica del perossido di idrogeno che rigenera l'ossigeno e completa il ciclo di lavoro dell'elettrodo [4]:



Le misurazioni amperometriche della formazione di perossido di idrogeno hanno il vantaggio di essere molto semplici, e questo favorisce molto la costruzione di dispositivi miniaturizzati.

La misura del perossido richiede l'applicazione di un potenziale al quale le specie costituenti sono elettroattive. Tuttavia i contributi anodici delle diverse specie ossidabili presenti nei fluidi biologici, possono compromettere la selettività e quindi l'accuratezza generale della misura. Una strategia vantaggiosa per ridurre le interferenze è usare una membrana selettiva che permetta l'accesso alla superficie elettrodica solo alla specie

elettroattiva di interesse. Per discriminare i composti interferenti sono stati utilizzati diversi polimeri, multistrati o strati misti, con proprietà di trasporto basate su grandezza, carica o polarità.

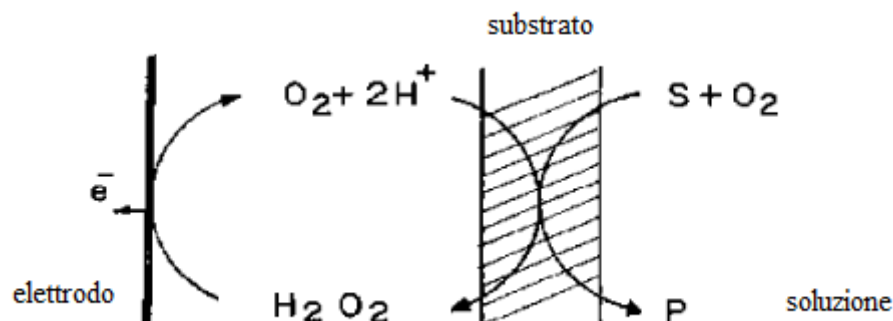


Fig 3.1: rappresentazione del trasferimento elettronico in un biosensore amperometrico di prima generazione. Si nota come l'ossigeno venga utilizzato come mediatore redox per il trasporto elettronico attraverso il perossido di idrogeno [6].

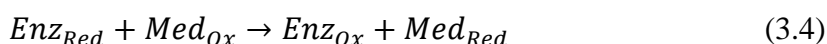
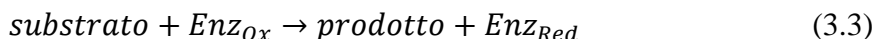
– Dipendenza dall'ossigeno [5]

Dal momento che i dispositivi basati sulle ossidazioni fanno affidamento sull'uso di ossigeno come accettore elettronico, sono soggetti ad errori derivati dalla limitazione stechiometrica dell'ossigeno.

Tale limitazione (conosciuta come deficit di ossigeno) è dovuta al fatto che in molti casi le normali concentrazioni di ossigeno sono molto inferiori (fino a un ordine di grandezza) a quelle dell'elemento da rilevare (ad esempio glucosio o lattato). Per ovviare a questo problema, si stanno studiando tuttora diverse strade tra le quali si citano l'uso di film che limitino il trasporto di massa al fine di controllare sia il flusso di ossigeno che quello dell'elemento da rilevare [11, 12] e lo sviluppo di un elettrodo bidimensionale che permetta all'ossigeno di diffondere in due direzioni, e all'elemento da rilevare soltanto lungo una di queste [12].

3.2.2 – Biosensori di seconda generazione

Rispetto ai biosensori di prima generazione, questi sono caratterizzati dalla presenza in soluzione assieme al substrato enzimatico di sostanze attive redox (cfr Cap. 1, 6) sintetiche che fungono da accettori di elettroni al posto dell'ossigeno. Tali sostanze, chiamate mediatori redox, sono incorporate nella struttura del sensore e sono in grado di trasportare gli elettroni dal centro attivo dell'enzima fino alla superficie dell'elettrodo.



I mediatori sono mobili nello spazio fra elettrodo e substrato e reagiscono con le molecole di enzima durante la rigenerazione alla loro forma originaria [2]: facendo ciò “traghettano” l'elettrone coinvolto nel processo redox dal centro enzimatico fino all'elettrodo o viceversa.[4] Questo ciclo di mediazione (vedi figura 3.2) produce una corrente direttamente dipendente dalla concentrazione di elemento da rilevare [5].

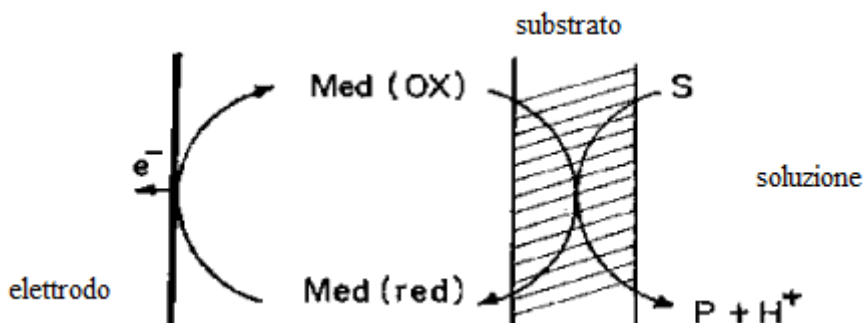


Fig 3.2: rappresentazione del trasferimento elettronico in un biosensore amperometrico di seconda generazione. In tal caso si nota come a differenza del biosensore di prima generazione, al posto dell'ossigeno viene utilizzato un mediatore redox che si riduce al substrato e si ossida perdendo un elettrone all'elettrodo [6].

La dinamica del processo di trasferimento elettronico che avviene in una molecola enzimatica viene descritta da diverse teorie. La più accreditata ipotizza che all'interno dell'enzima ci possano essere due siti di contatto, uno che riduce e uno che ossida, connessi da un cammino conduttivo. Questo permetterebbe di spiegare come gli enzimi,

pur prendendo parte alle reazioni di ossidoriduzione, non abbiano un aumento o una diminuzione di carica elettrica [2].

Il trasporto elettronico mediato consente di ottenere importanti vantaggi ai fini della misura amperometrica, come ad esempio la maggiore indipendenza dalla pressione parziale di ossigeno e l'abbassamento dei potenziali di lavoro, così da non provocare reazioni interferenti di altre specie elettroattive presenti in soluzione.

Le caratteristiche che deve possedere un mediatore redox per funzionare efficacemente possono essere riassunte in [5]:

- reagire rapidamente con l'enzima ridotto così da diminuire la competizione con l'ossigeno;
- avere buone proprietà elettrochimiche come ad esempio un basso potenziale redox;
- avere bassa solubilità in ambiente acquoso. Le problematiche legate ad una eventuale solubilità del mediatore, sono da riferirsi alla tendenza di questo ad essere gradualmente lavato via dalla sua matrice durante l'uso del dispositivo, con evidente perdita di accuratezza nella misura;
- deve essere non tossico e chimicamente stabile tanto nella forma ridotta quanto nella forma ossidata.

Tra i vari mediatori redox utilizzati si possono citare: ferrocene e suoi derivati, esacianoferrato, sali organici conduttivi (come il tetratiafulvalene-tetracianochinodimetano TTF-TCNQ), pentotiazina, composti di fenoxiazina e composti di chinone [4].

3.2.3 – Biosensori di terza generazione

I biosensori di terza generazione sono caratterizzati dall'immobilizzazione di tutti i componenti elettroattivi di interesse direttamente sulla superficie dell'elettrodo, siano essi l'enzima con il mediatore opportuno o solamente la molecola enzimatica recettiva.

Nel primo caso si è passati dall'uso di un mediatore diffuso in cosubstrato (ossigeno o mediatore sintetico) ad un sistema in cui enzima e mediatore, essendo coimmobilizzati

sulla superficie elettrodica, rendono il componente di bioriconoscimento parte integrante dell'elettrodo trasduttore [6].

Generalmente, per trattenere i mediatori redox sulla superficie dell'elettrodo, sono utilizzati gli stessi metodi di immobilizzazione usati per le biomolecole (ad esempio adsorbimento, legame covalente, intrappolamento in matrici gel, incapsulamento, reticolazione...) così da assicurare un adeguato cammino conduttivo agli elettroni [7].

Nel secondo si parte dall'obiettivo di far interagire direttamente il materiale e l'enzima redox, così da evitare di introdurre dei mediatori in soluzione.

I primi lavori in questo campo utilizzavano elettrodi al mercurio, sui quali l'adsorbimento degli enzimi era estremamente forte, ma portava alla denaturazione delle molecole. Al fine di rendere il metallo dell'elettrodo compatibile con gli enzimi redox e i recettori biologici, si dovette concentrare l'attenzione sullo studio della modifica delle superfici elettrodiche.

Si è dimostrato che piccole proteine, come il citocromo C, possono trasportare gli elettroni direttamente a elettrodi in carbonio vitreo. Tuttavia per molti enzimi redox, come la glucosio ossidasi (GOx), questo è molto difficile da realizzare in quanto essi hanno spessi gusci proteici isolanti e i loro centri catalitici sono localizzati in profondità e protetti dall'ambiente esterno. Pertanto in questi casi devono essere immobilizzati su una superficie elettrodica modificata per essere compatibile, in modo da rendere possibile il trasporto di elettroni dal centro catalitico all'elettrodo, senza denaturazione [4].

Grazie alla loro peculiare costruzione i biosensori di terza generazione sono adatti per misurazioni immediate e ripetute del campione di elemento biologico, senza la necessità di aggiungere mediatori in soluzione [6].

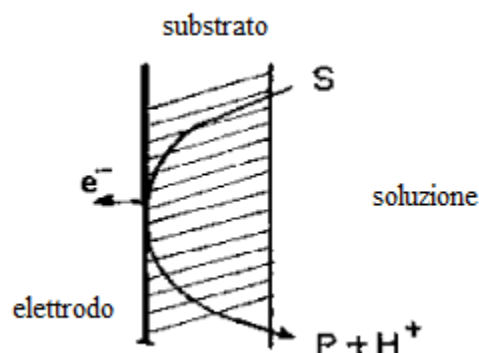


Fig 3.3: rappresentazione del trasferimento elettronico in un biosensore di terza generazione. A differenza delle precedenti generazioni, il trasporto non avviene tra substrato e elettrodo per mezzo di mediatori naturali o sintetici, ma la reazione avviene direttamente sull'elettrodo con trasferimento elettronico immediato [6].

3.3 – *Immobilizzazione enzimatica*

Si è precedentemente fatto accenno alla procedura di immobilizzazione come soluzione alla denaturazione delle biomolecole enzimatiche poste come recettore biologico. Per immobilizzazione si intende il legame fisico o chimico dell'enzima su un supporto costituito da matrici organiche o inorganiche, che limita artificialmente la sua mobilità nel mezzo di utilizzo.

Tale procedura permette appunto di migliorare la stabilità dell'enzima, ma anche di riutilizzare e sfruttare al meglio tutta l'attività enzimatica residua, di ridurre il potenziale applicato all'elettrodo, di evitare la contaminazione dei prodotti e in taluni casi migliorare le capacità catalitiche dell'enzima.

Dal punto di vista delle tecniche di immobilizzazione, queste possono essere essenzialmente divise in due categorie: immobilizzazioni fisiche e immobilizzazioni chimiche.

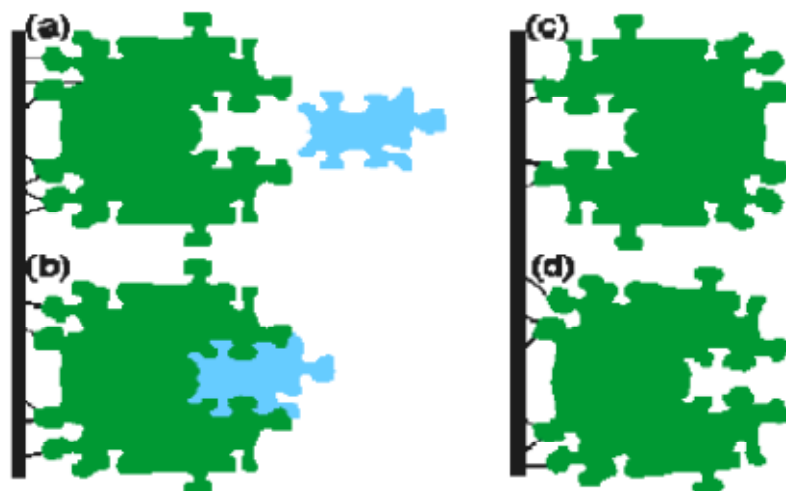


Fig 3.4: vincoli sulla conformazione: in a) l'enzima immobilizzato ha intatto il sito attivo ed è pronto ad accettare la molecola di substrato, come avviene in b); in c) invece l'enzima è legato in modo non produttivo, in quanto non c'è accesso al sito attivo; in d) c'è distorsione del sito attivo dell'enzima che induce anche in questo caso inattività [3].

3.3.1 – Metodi di immobilizzazione fisica

L'immobilizzazione fisica consiste essenzialmente nel trattenere l'enzima sul supporto; tale metodologia generale è spesso più semplice da eseguire e preserva meglio le caratteristiche dell'enzima, anche se questo risulta più esposto agli agenti denaturanti (pH, temperatura etc..). Tra le immobilizzazioni fisiche si ricordano: adsorbimento, intrappolamento (semplice e in matrici gel) e incapsulamento [3].

Adsorbimento

È il metodo di immobilizzazione meno complesso, si basa su interazioni reversibili tra enzima e supporto relativamente deboli (come le forze di Van der Waals). In tale tipologia è sfruttata la chimica esistente tra enzima e supporto, così non sono necessarie né attivazione né modifica chimica, con il vantaggio che si arreca un danno minimo all'enzima stesso. Tuttavia per il mantenimento dell'attività catalitica ottimale è necessario uno stretto controllo delle condizioni di adsorbimento, per far sì che le interazioni deboli coinvolte in questo tipo di immobilizzazione siano esaltate.

La resa dell'adsorbimento ad un supporto solido è strettamente legata alla concentrazione di enzima esposto per unità di superficie del supporto stesso durante il processo di immobilizzazione.

I vantaggi dell'adsorbimento quindi sono la facilità di realizzazione della procedura, l'economicità, la minimizzazione dei danni arrecati all'enzima e l'assenza in generale di reagenti.

Gli svantaggi sono legati essenzialmente alla labilità del sistema immobilizzato per via dei legami deboli coinvolti. Tale problema può portare infatti alla dispersione del supporto con probabile desorbimento e contaminazione della soluzione. Fattori fisici come portata e abrasione dovuta all'agitazione delle particelle possono influenzare il desorbimento del biocatalizzatore dal supporto, pertanto questo metodo non viene mai utilizzato da solo in condizioni di analisi in flusso continuo [4].

Intrappolamento in matrici gel

I metodi di intrappolamento si basano sul confinamento delle molecole enzimatiche nel reticolo di una matrice gel a seguito di polimerizzazione o in una membrana semipermeabile con pori di dimensione sufficientemente piccola da impedire il rilascio dell'enzima ma abbastanza grande da permettere la diffusione dei substrati e dei prodotti.

Generalmente è un metodo utilizzabile con tutti i tipi di enzimi, semplice, economico e relativamente stabile e inoltre previene l'interazione fra il biocatalizzatore immobilizzato e composti biologici dannosi.

Gli svantaggi principali legati a questo tipo di immobilizzazione sono le perdite di attività enzimatica dovute a radiazioni ultraviolette applicate all'elettrodo per completare la polimerizzazione della matrice gel. Tali problemi possono influenzare la risposta del biosensore e diminuire la stabilità dell'elettrodo.

Incapsulamento

È una tecnica di immobilizzazione annoverabile tra i metodi di intrappolamento. Le molecole enzimatiche vengono immobilizzate in microcapsule composte da polimeri organici che formano una specie di membrana semipermeabile a substrato e prodotti. Tuttavia la diffusione attraverso questa membrana organica può rappresentare un problema estremamente importante, in quanto se i prodotti della reazione si accumulano rapidamente, possono provocare la rottura della membrana stessa. Un altro svantaggio legato a questo metodo, è la possibilità di proliferazione di microorganismi sulla

superficie della membrana, che comporta inibizione dello strato enzimatico e quindi il malfunzionamento del biosensore [4, 8, 9, 10].

3.3.2 – Metodi di immobilizzazione chimica

Con l'immobilizzazione chimica gli enzimi hanno spesso una maggiore stabilità temporale e nei confronti degli agenti denaturanti (pH, forza ionica, temperatura etc..).

Generalmente la reazione di immobilizzazione consta di due fasi: l'attivazione del supporto mediante molecole polifunzionali, successivamente la reazione di tali molecole con i gruppi funzionali dell'enzima. Tra le immobilizzazioni chimiche si ricordano: immobilizzazione mediante legame covalente e l'immobilizzazione mediante cross-linking [3].

Immobilizzazione mediante legame covalente

La formazione di legami covalenti tra enzima e matrice supporto è la tecnica di immobilizzazione più usata e studiata. Consiste nel mantenimento dell'enzima sulla superficie del supporto tramite legami covalenti fra i gruppi funzionali dell'enzima e quelli della superficie del supporto. Il sito attivo dell'enzima non deve ovviamente partecipare al legame covalente, pena la possibile inattività del sito stesso (vedi figura 3.4 - b), per cui durante il trattamento di legame devono essere aggiunti alla soluzione enzimatica alcuni inibitori dell'enzima stesso.

La selezione dei metodi per legare covalentemente l'enzima deve in ogni caso considerare che non siano implicati residui di amminoacidi che possano essere coinvolti nella catalisi (ovvero residui al sito attivo), questo comporta perciò uno studio sui gruppi funzionali dell'enzima per il legame e il loro ruolo nella catalisi. In altri termini si deve porre attenzione che i gruppi funzionali che sono utili nella catalisi non vengano occupati con l'immobilizzazione (figura 3.4 - c). È poi importante anche ottimizzare la reazione di accoppiamento tra i gruppi funzionali dell'enzima e i gruppi del supporto funzionalizzato. Infatti per ottenere un legame covalente enzima-supporto occorre funzionalizzare quest'ultimo, ovvero introdurre su supporti solidi dei gruppi reattivi che possano dare origine al legame covalente.

Il legame covalente rende il sistema di immobilizzazione estremamente stabile, anche in presenza di substrati e condizioni di alta forza ionica. Tuttavia spesso questo metodo richiede condizioni di reazione molto controllate, e la formazione del legame covalente

enzima-supporto può implicare distorsioni alla molecola enzimatica con conseguente perdita di attività catalitica (vedi figura 3.4 - d) [3, 4, 8, 9, 10].

Immobilizzazione mediante cross-linking

Questa procedura prevede la creazione di legami covalenti tra gli enzimi in modo da creare degli aggregati tridimensionali dell'enzima che siano insolubili in acqua. Tali legami possono essere creati direttamente tra gli enzimi, in questo caso si parla di cross-linking, o possono essere creati mediante delle proteine intermediarie (reagenti bi- o multi- funzionali) dette crosslinker, in tal caso si parla co-cross-linking. Nel caso del co-cross-linking i legami covalenti avvengono grazie a reagenti bi- o multi-funzionali come glutaraldeide o DTSP.

I vantaggi del cross-linking sono la semplicità della procedura e il forte legame covalente tra le biomolecole, ma presenta anche degli svantaggi legati al fatto che questi aggregati sono gelatinosi e questa loro conformazione limita parzialmente l'accesso del substrato [3, 4, 9, 10].

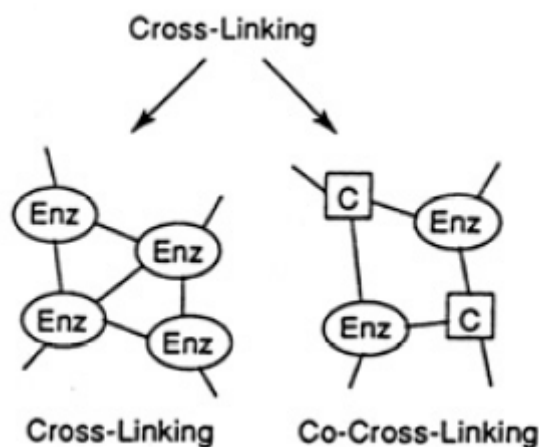


Figura 3.5: Esempio della differenza tra cross-linking e co-cross-linking: si noti come nel cross-linking (a sinistra) gli enzimi siano collegati direttamente l'un l'altro, mentre nel co-cross-linking (a destra) la rete di interconnessione fra gli enzimi necessita di una proteina di supporto [9].

Bibliografia

1. D. Thevenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, Electrochemical biosensor: recommended definition and classification, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 71, No. 12, pp. 2333-2348, 1999.
2. Peter Gründler, *Chemical Sensors An Introduction for Scientists and Engineers*, Ed. Springer, 2007
3. Adriana Mignani, *Sviluppo di Biosensori: Modifiche di Superfici Elettrodiche e Sistemi di Immobilizzazione Enzimatica*, Università degli Studi di Bologna Alma Mater Studiorum, A.A. 2007-2008
4. Walter Vastarella, *Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors*, Università degli Studi di Bari, XIV Ciclo, A.A. 1998-2001
5. J. Wang, *Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges*, *Electroanalysis*, 13, No. 12, 2001
6. B. Malhotra, A. Chaubey, *Biosensors for clinical diagnostics industry*, *Sensors and Actuators*, B 91, pp. 117–127, 2003
7. J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi, *Biosensors for life quality: Design, development and applications*, *Sensors and Actuators*, B 102, pp.179–194, 2004
8. T. Marchis, *Preparazione, caratterizzazione e possibili applicazioni della perossidasi da soia immobilizzata su granuli di vetro attivato*, Università degli Studi di Torino, A.A. 2006/2007
9. S. Pagani, M. Duranti, *Enzimologia: dai fondamenti alle applicazioni*, Ed Piccin, 1998
10. J. M. Guisan, *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. Humana Press, 2006, seconda edizione
11. G. Reach, G. S. Wilson, *Analytical Chemistry*, 64, 381A, 1992
12. a) D. Gough, J. Lucisano, P. Tse, *Analytical Chemistry*, 57, 2351, 1985
b) J. Armour, J. Lucisano, D. Gough, *Diabetes*, 39, 1519, 1990

CAPITOLO QUATTRO – VOLTAMMETRIE

Premessa

Attraverso i metodi di indagine elettrochimica detti voltammetrie è possibile ottenere informazioni sugli analiti di interesse variando un potenziale e misurando la corrente risultante nella cella elettrochimica. In base al diverso tipo di variazione del potenziale, si definiscono diverse voltammetrie: polarografia, voltammetria a scansione lineare, voltammetria ciclica, voltammetria a scansione con gradini, voltammetria differenziale ad impulsi etc.

In questo capitolo verranno affrontate le tecniche della cronoamperometria e della ciclovoltammetria, in quanto, come si dimostrerà nel Cap. 6 di questa tesi, queste sono le tecniche più comunemente utilizzate per la caratterizzazione di un elettrodo funzionalizzato con lattato ossidasi immobilizzata

4.1 – Cronoamperometria

Si consideri la generica reazione di riduzione e si prenda come ipotesi che inizialmente sia presente in soluzione solo la specie O:



Tra i possibili metodi analitici per analizzare un sistema elettrochimico, la cronoamperometria è probabilmente, dal punto di vista concettuale e di applicazione, il più semplice. Consiste infatti nella registrazione della corrente nel tempo a seguito dell'applicazione all'elettrodo di lavoro di un potenziale opportuno con forma d'onda E(t) a gradino, in una soluzione non agitata.

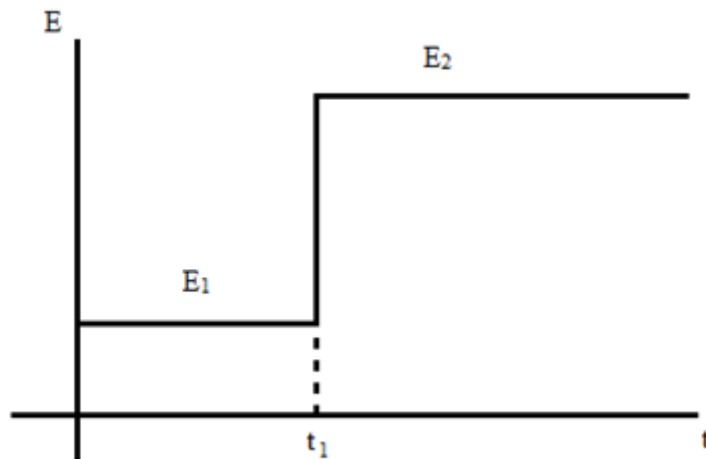


Fig 4.1: Andamento del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro durante una cronoamperometria

Il potenziale E_1 viene scelto in modo tale che nessuna reazione possa avvenire all'elettrodo, mentre E_2 è il potenziale alla quale avviene la reazione riportata nell'equazione (1).

Prima di applicare il potenziale ($t < t_1$) non c'è alcun passaggio di corrente né gradiente di concentrazione.

Dopo la variazione del potenziale ($t > t_1$):

- O si consuma e si genera R;
- I gradienti di concentrazione variano nel tempo;
- Nella cella passa corrente e diminuisce man mano che O viene consumato in prossimità dell'elettrodo.

Il flusso di O all'elettrodo e quindi la densità di corrente è proporzionale al gradiente di concentrazione alla superficie dell'elettrodo: ci si trova in condizioni di controllo da trasporto di massa.

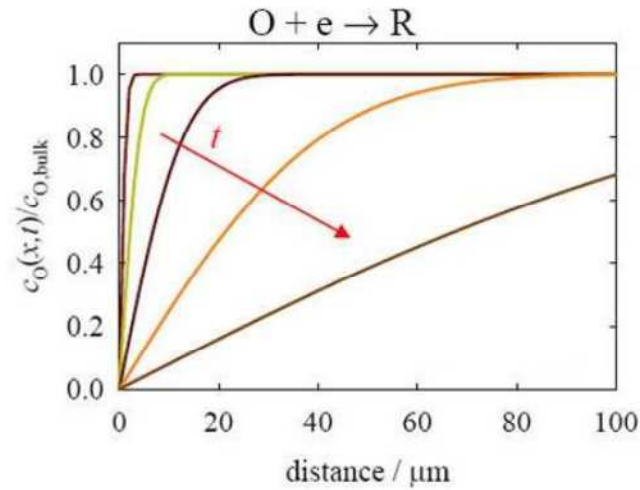


Fig 4.2: Profili di concentrazione ottenuti in condizione di diffusione limite a diversi istanti di tempo. Da notare l'andamento in diminuzione della concentrazione con l'andare del tempo (da curva rossa a curva marrone) [1]

Dall'integrazione della seconda legge di Fick

$$D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (4.2)$$

E con l'introduzione di opportune condizioni al contorno:

$$t \leq 0; c(x, t) = c_{bulk}$$

$$t > 0; c(0, t) = 0$$

Si ottiene l'andamento della corrente nel tempo:

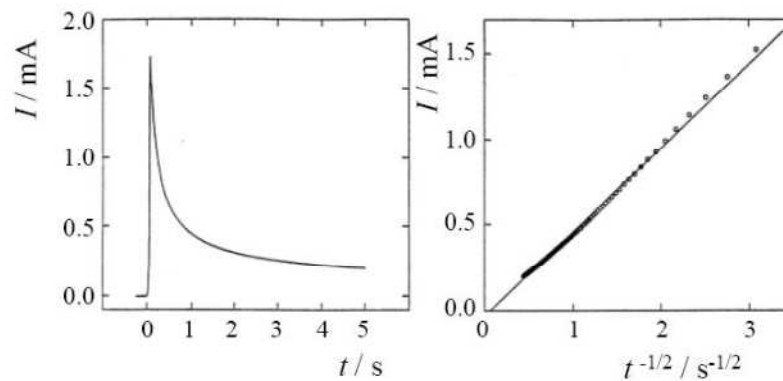


Fig 4.3: esempio di risposta cronoamperometrica ottenuta ad un elettrodo di platino in tampone fosfato a pH 6 in presenza di ferrocene 8,25 mM. Scalino di potenziale: 0,0 V – 0,4 V [1]

Andamento che viene espresso dall'equazione di Cottrel:

$$I = \frac{AnFD^{1/2}c_{bulk}}{\sqrt{\pi \cdot t}}$$

ove n rappresenta il numero di moli di elettroni coinvolte nel processo redox, F è la costante di Faraday, D è il coefficiente di diffusione della specie in esame e c_{bulk} è la concentrazione di analita in soluzione [1].

4.2 – Voltammetria ciclica (o Ciclovoltammetria)

4.2.1 – Premessa

La ciclovoltammetria (Cyclic Voltammetry, CVM) è la tipologia più usata per acquisire informazioni qualitative e quantitative sulle reazioni elettrochimiche. La forza della CVM sta' nella capacità di offrire rapidamente considerevoli informazioni sulla dinamica di processi di ossidoriduzione, sulla cinetica delle reazioni di trasferimento elettronico e su processi di adsorbimento alla superficie. In particolare offre una rapida locazione dei potenziali redox delle specie elettroattive e una conveniente valutazione degli effetti dei mediatori sul processo redox [2].

La CVM consiste nella scansione lineare del potenziale di un elettrodo di lavoro stazionario (in una soluzione non agitata) usando un potenziale con forma d'onda triangolare (figura 4.3). La velocità con cui varia il potenziale viene definita scan rate [$V s^{-1}$].

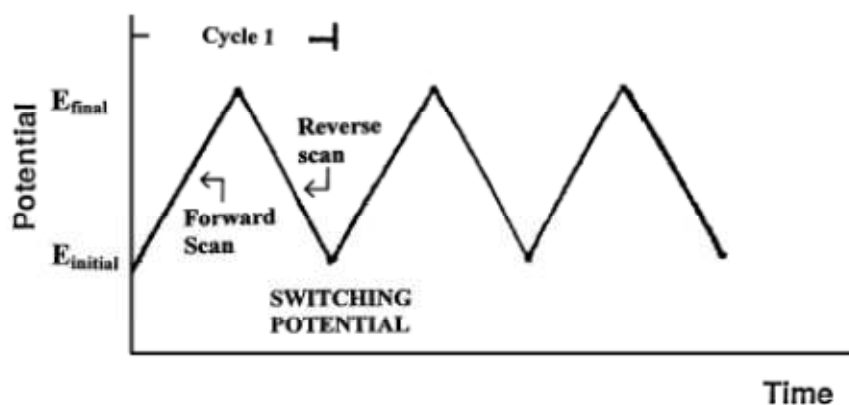


Fig 4.3: Forma d'onda d'ingresso per un esperimento di voltammetria ciclica [2]

In base alle informazioni che si vogliono ottenere, si possono eseguire uno o più cicli. Durante la scansione del potenziale, il potenziostato [vedi nota A] misura la corrente risultante dal potenziale applicato. Il grafico risultante $I - V$ è detto ciclovoltammogramma.

Finché il potenziale applicato aumenta e si avvicina al potenziale di riduzione elettrochimico, si genera in risposta una corrente catodica che aumenta fino a raggiungere un valore massimo quando il potenziale applicato è uguale al potenziale di riduzione. Fino a quando il potenziale applicato, superato il potenziale di riduzione, raggiunge E_{final} (vedi figura 4.4), la corrente catodica in risposta decresce generando così un picco nel voltammogramma.

Quando il potenziale viene invertito per completare la scansione (e tornare a E_{initial}), la specie generata durante la scansione catodica viene ri-ossidata all'elettrodo, dando origine ad una curva $I - V$ analoga alla precedente ma rivolta verso il basso con conseguente picco di corrente anodica.

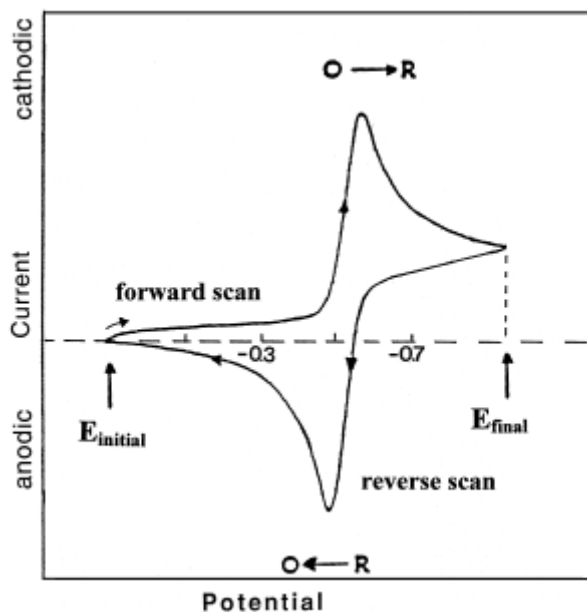


Fig 4.4: Voltammogramma ciclico classico. Si noti come vengono evidenziati i passaggi di stato ai potenziali di riduzione (O – R) e ossidazione (R – O) grazie ai picchi di corrente, e come i potenziali di scansione iniziale e finale determinino “solamente” il verso del voltammogramma.

I picchi caratteristici nel ciclo voltammogramma sono causati dalla formazione dello strato diffusivo vicino alla superficie elettrodica. Si può meglio capire ciò esaminando i profili concentrazione – distanza durante la scansione mostrati in figura 4.5 [2, 3, 4].

Si nota come le correnti risultanti riflettano il cambiamento continuo del gradiente di concentrazione con il tempo. Quindi, l’aumento fino al picco di corrente corrisponde al raggiungimento del controllo diffusivo, mentre il calo di corrente mostra un andamento dipendente da $t^{-1/2}$ e indipendente dal potenziale applicato.

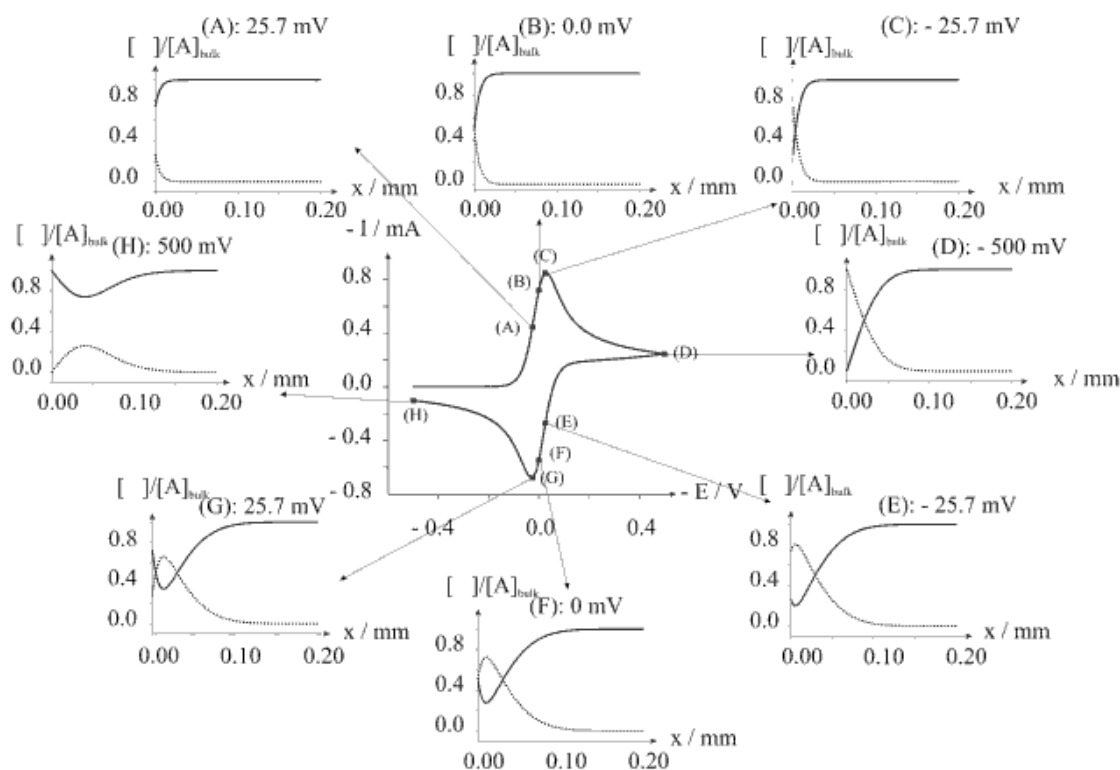


Fig 4.5: Voltammogramma per una riduzione reversibile della specie A in B. Da notare come con l'andamento del potenziale le concentrazioni siano dapprima separate (A), successivamente si eguagliano (B, C) e al potenziale finale del primo tratto della scansione (D) siano opposte (sulla superficie elettrodica). Tale andamento si nota anche per la scansione inversa da (E) ad (H). Parametri: $E^0 = 0 \text{ V}$, $[A]_0 = 1 \text{ mM}$, $D_A = D_B = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [5]

4.2.2 – Interpretazione dei dati

Come è stato precedentemente detto, il voltammogramma fornisce molte informazioni, quattro delle quali sono direttamente osservabili, ovvero i due picchi di corrente e i due picchi di potenziale. In base al variare di queste informazioni si può stabilire la reversibilità del sistema in cui si sta svolgendo la reazione di ossidoriduzione.

– Sistemi Reversibili

Un sistema si dice reversibile se le reazioni elettrochimiche che avvengono in esso sono reversibili, ovvero la loro cinetica è veloce, i fenomeni di trasporto di massa sono estremamente lenti e sono governate dalla diffusione (cfr Cap. 1). In tal caso si verificano le seguenti condizioni [2]:

- La posizione dei picchi sull'asse del potenziale non dipende dalla velocità di scansione (fig. 4.6) e la loro distanza in tensione dipende solo dagli elettroni coinvolti nella reazione redox all'elettrodo:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (4.3)$$

ove n è il numero di elettroni coinvolti;

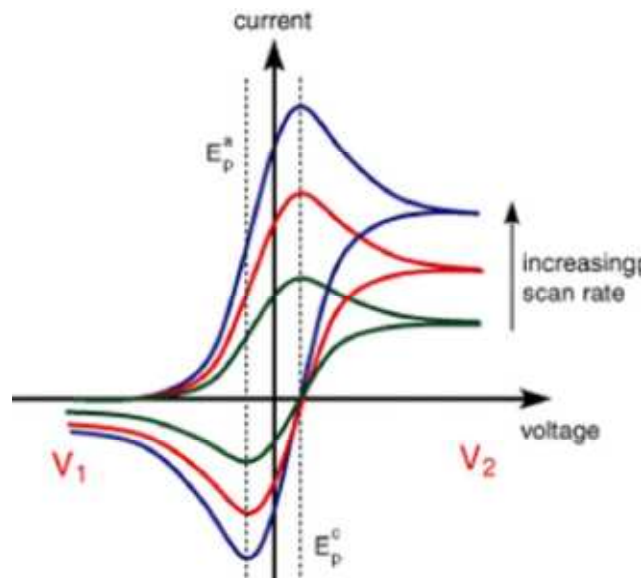


Fig 4.6: Rappresentazione grafica dell'indipendenza dei potenziali di riduzione e ossidazione dalla velocità di scansione

- Il potenziale formale della coppia redox (cfr Cap. 1 Potenziale Standard) si può ricavare dalla media matematica dei potenziali di riduzione e ossidazione:

$$E^o = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (4.4)$$

- Il rapporto tra le correnti di picco è unitario:

$$\frac{i_{p,c}}{i_{p,a}} = 1$$

- L'intensità delle correnti di picco è direttamente proporzionale alla concentrazione e aumenta con la radice quadrata della velocità di scansione, secondo l'equazione di Randles – Sevcik :

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (4.5)$$

con n numero di elettroni coinvolti nella reazione all'elettrodo, A area dell'elettrodo [cm^2], D coefficiente di diffusione [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$], v velocità di scansione [V s^{-1}].

Per processi reversibili con trasferimento di più elettroni (multi electron-transfer processes), il voltammogramma presenta più picchi ben distinti, relativi alle varie reazioni di trasferimento elettronico, il che comporta una conoscenza del numero di reazioni che avvengono (fig 4.7).

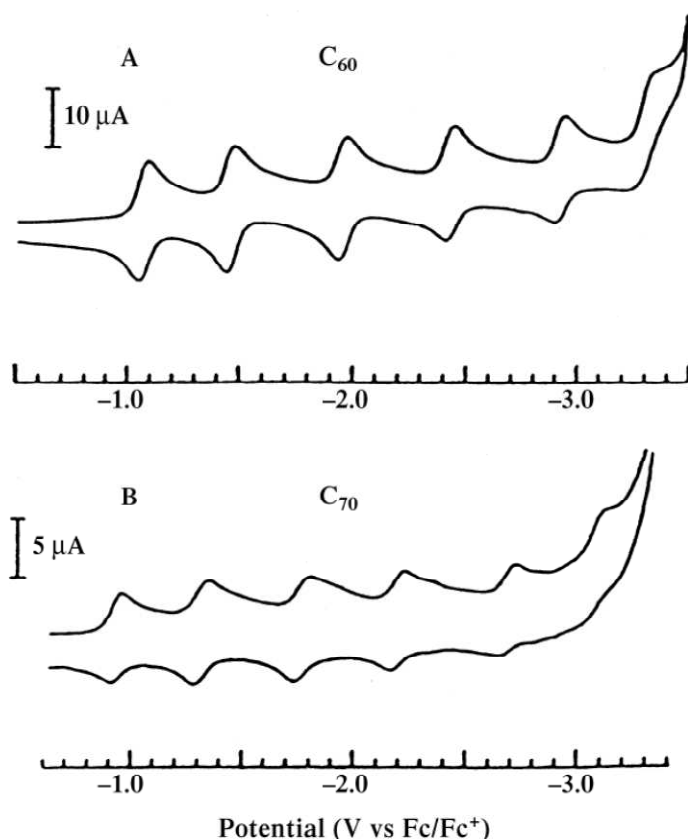


Fig 4.7: Voltammogrammi di esperienze svolte su C_{60} e C_{70} in una soluzione di acetonitrile – toluene [2]

– Sistemi irreversibili e quasi-reversibili

Per processi irreversibili (nei quali c'è uno scambio elettronico molto lento, cfr Cap. 1) i picchi sono più piccoli e ampiamente separati. I sistemi totalmente irreversibili sono caratterizzati da uno spostamento del potenziale di picco E_p dipendente dalla velocità di scansione, inoltre E_p avviene a potenziali maggiori del potenziale formale della coppia E^0 . Questo spostamento dei picchi può essere compensato da un'opportuna variazione della velocità di scansione.

Le intensità dei picchi di corrente dipendono ancora dalla radice quadrata della velocità di scansione ma secondo una costante di proporzionalità diversa, tale che l'intensità della corrente di picco di un processo irreversibile è circa l'80% della corrente di picco per un processo reversibile mentre il rapporto fra le correnti di picco anodica e catodica risulta essere non più unitario.

Per sistemi quasi-reversibili la corrente risulta controllata sia dal trasferimento di carica che dal trasporto di massa. I voltammogrammi di sistemi quasi-reversibili sono più rilassati e mostrano una separazione fra i potenziali di picco maggiore rispetto ai sistemi reversibili [2].

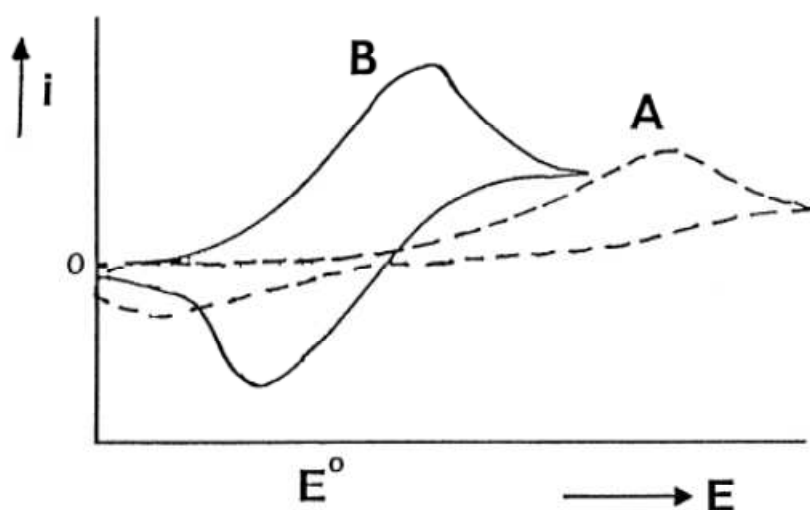


Fig 4.8: Voltammogrammi ciclici di processi redox irreversibile (curva A) e quasi reversibile (curva B) [2].

4.2.3 – Ciclovoltammetria su microelettrodi

I macroelettrodi hanno però una limitazione: poiché l'area attiva della superficie elettrodica di un macroelettrodo è molto più grande della larghezza dello strato diffusivo, il contributo del trasporto dai margini della zona attiva non è molto significativo, il che per altro implica densità di corrente all'interfaccia non molto elevate. Se invece si prende in considerazione un elettrodo la cui area attiva sia uguale o più piccola dello strato diffusivo, il trasporto diffusivo ai margini di questa sarà ben più significativo rendendo così la diffusione molto più efficiente. È questo il caso dei microelettrodi. Tali elettrodi hanno dimensioni dell'ordine dei micrometri e grazie a queste dimensioni così ridotte lo strato diffusivo che si forma agli elettrodi non è radiale ma ha una forma piegata o sferica. La bontà del comportamento di questi elettrodi è stata indagata comparando l'area di un

dato macroelettrodo con una collezione di microelettrodi che avesse la stessa area complessiva del macroelettrodo, frammentata in molte piccole isole. Nel complesso è stato verificato che con i microelettrodi si possono avere densità di corrente all'interfaccia più alte rispetto ai macroelettrodi e il tempo di risposta rispetto alle variazioni di potenziale o di concentrazione è molto più breve .

Tutte queste qualità positive li rendono sensori ideali, il problema è che mostrano alte densità di corrente ma comunque basse correnti totali. Servono degli speciali amplificatori di corrente per misurare valori compresi fra i femtoampere e i nanoampere. Un modo per ovviare a questo problema è lavorare con array di microelettrodi, in cui sono raggruppate molte singole aree elettrodiche per formare una corrente elettrolitica totale soddisfacente.

In questi array la spaziatura fra i microelettrodi è un parametro importante in quanto influenza la forma degli strati diffusivi e la loro reciproca interazione. Infatti se la spaziatura fra i microelettrodi è troppo piccola, le zone di diffusione adiacenti possono sovrapporsi e interagire tra di loro, il che comporta una tendenza alla diffusione planare. Quindi la separazione centro a centro degli elettrodi deve essere sufficiente per evitare queste sovrapposizioni, ma non eccessiva per non sprecare spazio inutilmente. La massima densità di corrente viene raggiunta quando ogni elettrodo si comporta come un singolo microelettrodo; in tal caso la diffusione radiale domina il trasporto di massa del reagente, portando coefficienti di trasporto di massa più elevati rispetto alla diffusione planare [3].

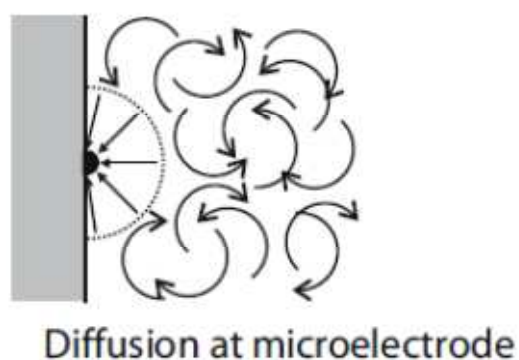


Fig 4.9: Regione diffusiva semisferica ad un microelettrodo [3]

– *Diffusione su array di microelettrodi [6]*

Si consideri di operare una ciclovoltammetria, su un array regolare di microelettrodi, di una coppia redox che scambia solo un elettrone, quindi $A \rightarrow B + e^-$. Ovviamente in condizioni stazionarie in soluzione è presente solo la specie A. Aumentando il potenziale, si dà avvio al processo di ossidazione di A in B e attorno ad ogni microdisco si forma uno strato diffusivo. Si è notato [6] come l'ampiezza e la forma del voltammogramma, relativo all'esperimento in corso, sia strettamente collegata al rapporto fra la superficie del microelettrodo e la grandezza dello strato diffusivo formatosi, e al rapporto fra la grandezza dello strato diffusivo e la lunghezza dello strato isolante che separa due microelettrodi adiacenti. Sulla base di questi due fattori è quindi possibile distinguere quattro categorie del profilo diffusivo su un array di microelettrodi e di conseguenza assegnare la risposta voltammetrica ad una categoria o ad una combinazione di categorie. (vedi fig 4.10)

Nella prima categoria (fig 4.10 - a) la larghezza dello strato diffusivo è inferiore o al più uguale alla larghezza dei microelettrodi, di conseguenza si avrà diffusione planare e il voltammogramma risultante avrà la stessa forma di un voltammogramma ottenuto da una ciclovoltammetria su macroelettrodi. L'unica differenza che si nota sui due voltammogrammi è che il voltammogramma ottenuto da microelettrodi risulta scalato in corrente e potenziale rispetto a quello ottenuto su macroelettrodi.

La seconda categoria considera il caso in cui lo strato diffusivo sia più largo della superficie elettrodica, ma comunque sia inferiore alla metà della distanza centro a centro di due elettrodi adiacenti. In tali condizioni non c'è sovrapposizione fra gli strati diffusivi. Questo profilo diffusivo è il più comune negli array di microelettrodi ed è anche quello che genera il più alto rapporto fra corrente faradica e corrente non faradica; per questo motivo gli array di microelettrodi sono disegnati e fabbricati per ottenere tale profilo. Il voltammogramma relativo a tale categoria è la risposta voltammetrica di un singolo microelettrodo moltiplicata per il numero di elettrodi presente nell'array. Si evince poi che i voltammogrammi ottenuti con tale profilo diffusivo sono indipendenti dalla velocità di scansione.

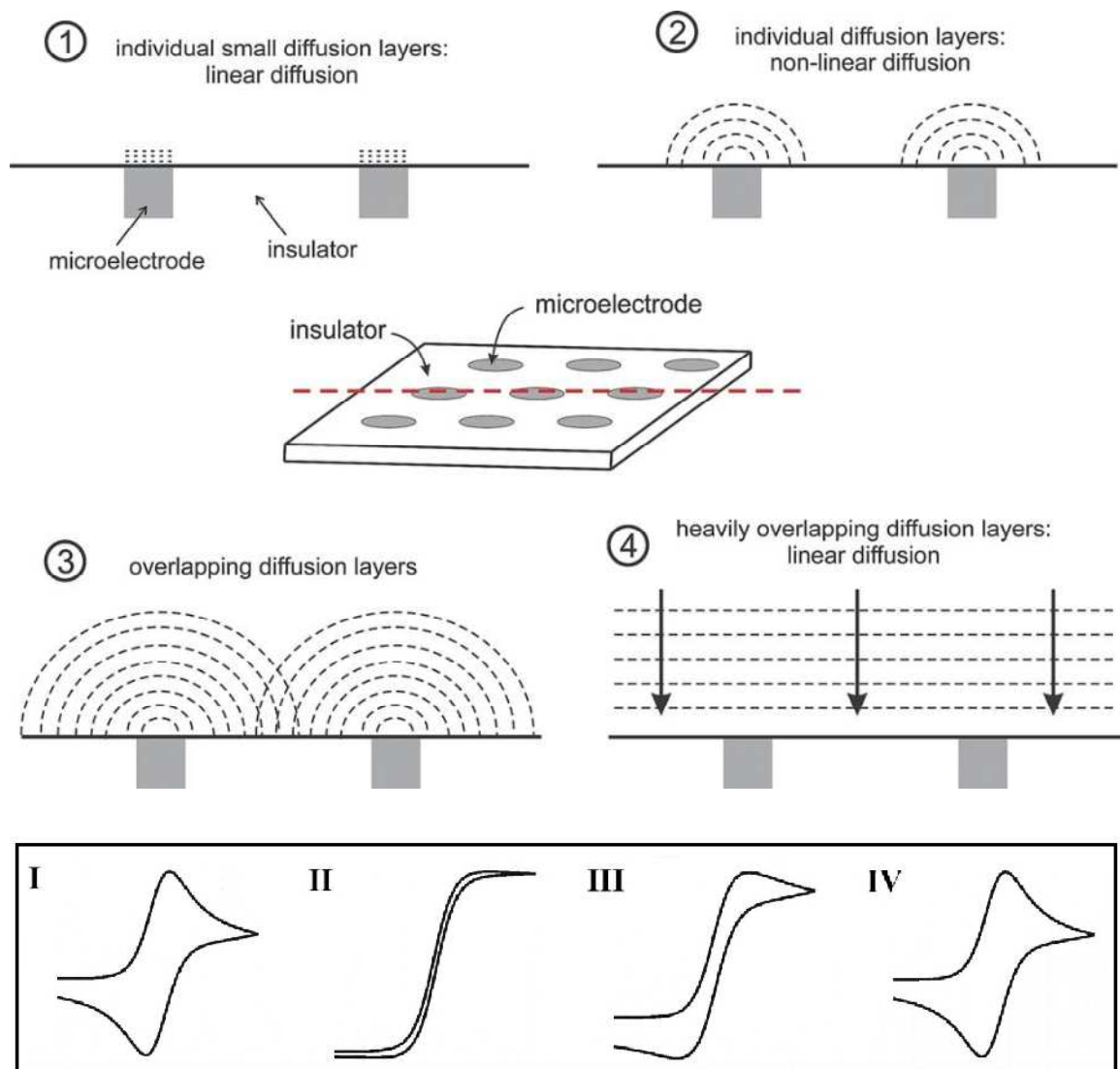


Fig 4.10 : Diagramma schematico delle quattro categorie di profili diffusivi con relativa risposta voltammometrica [6, 9]

Nella terza categoria, a differenza della seconda, lo strato diffusivo va oltre la metà della distanza centro a centro, provocando così la sovrapposizione fra gli strati diffusivi degli elettrodi adiacenti. Tale condizione viene imputata essere la fonte della dipendenza dalla velocità di scansione dei voltammogrammi ottenuti con tale profilo diffusivo e dei picchi di corrente poco pronunciati. Infatti, essendoci sovrapposizione fra gli strati diffusivi adiacenti, l'interferenza che questi creano tra di loro comporta una diminuzione della corrente attraverso l'elettrodo.

Nella quarta ed ultima categoria, lo strato diffusivo di ogni microelettrodo si sovrappone abbondantemente con gli strati dei microelettrodi adiacenti, provocando così una sorta di diffusione planare su larga scala, con gli stessi effetti visti nella prima categoria.

– *Simulazione su array di microelettrodi*

Per confermare le considerazioni teoriche fatte in merito alla CVM su microelettrodi, sono state sviluppate diverse tecniche di simulazione degli eventi elettrochimici all'interfaccia microelettrodo/elettrolita. tuttavia tali simulazioni presentano notevoli difficoltà legate alla capacità di simulare il comportamento dell'intero array di microelettrodi. Infatti, nonostante siano stati definiti i vari profili diffusivi che possono presentarsi agli elettrodi, e quindi siano noti i comportamenti che questi hanno e problemi che possono dare, tutto ciò è stato fatto senza simulare la diffusione su tutta la superficie dell'array (che tipicamente consta di 50 o più microdischi). Per ovviare a tale problema molti team di ricercatori hanno studiato e proposto dei metodi di simulazione che consentono di frazionare il problema in parti più piccole e trattabili.

– *Metodo di simulazione proposto da Girault e collaboratori [6, 10]*

In tale metodo Girault e collaboratori considerano di simulare su un array con microdischi con disposizione regolare e di suddividere tale array in tante celle quadrate, come in fig 4.11, basi di altrettanti cubi. Quindi, per simulare sull'intero array, basta effettuare una simulazione su una singola cella ed estendere poi il risultato all'intero array.

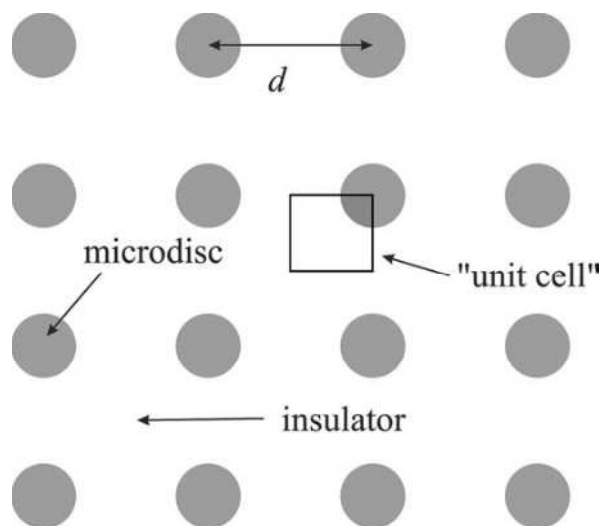


Fig 4.11: Approccio di Girault e collaboratori, per la simulazione di un array regolare di microdischi con struttura cubica [6, 10]

Tuttavia con tale metodo si necessita di tempi lunghi prima di raggiungere una soluzione sufficientemente accurata, in particolare se si tratta di un array con microdischi molto piccoli ($r < 1 \mu\text{m}$) e molto distanziati ($d > 100 \mu\text{m}$).

– Metodo di simulazione con dominio diffusivo[6]

Tale metodo è stato proposto da Amatore e collaboratori [7], e successivamente ripreso e studiato da Davies e Compton [6], e da Guo e Lindner [8] in diversi articoli. Il primo approccio tentato con tale metodo prevedeva, anche in questo caso, una suddivisione di un array regolare di microdischi in celle cubiche. Tuttavia, a differenza del metodo proposto da Girault, il microelettrodo è considerato al centro della cella quadrata unitaria a base del cubo (fig 4.12 – b). Di conseguenza i lati risultano essere equidistanti dai centri dei microdischi, e grazie a tale conformazione il flusso netto di reagente (o di prodotto) che li attraversa è nullo. Ciò comporta che la risposta voltammometrica dell'intero array corrisponde semplicemente alla risposta di una singola cella moltiplicata per il numero totale di celle presenti sull'array.

Tuttavia si nota come tale metodo sia molto simile al metodo proposto da Girault, e quindi può presentare i medesimi problemi. Proprio per questo motivo Amatore ha introdotto il “dominio diffusivo”. Ogni cella quadrata viene approssimata con un disco circolare avente il microelettrodo al centro e la stessa area del quadrato di partenza (fig 4.12 – c). Il cilindro costruito su tale disco circolare è definito dominio diffusivo. (fig 4.12 – d)

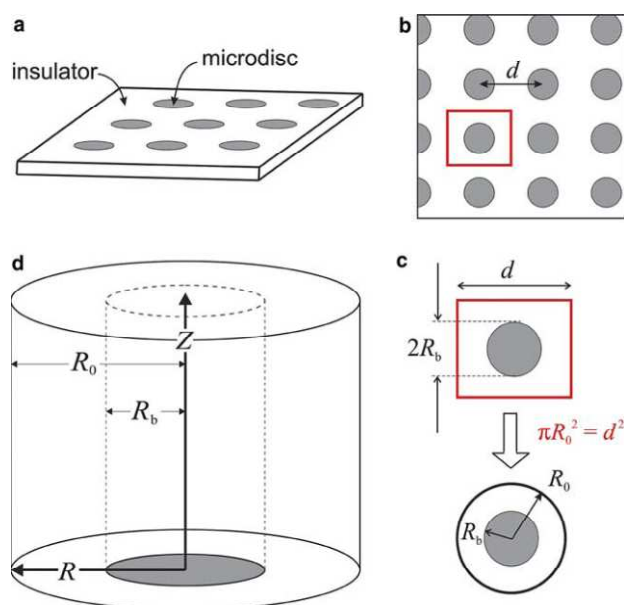


Fig 4.12: Approccio del dominio diffusivo per un array regolare di elettrodi a microdischi con struttura cubica[6]

Come nel caso della cella cubica, il flusso netto che attraversa la superficie laterale del dominio diffusivo è nullo. Inoltre, grazie alla simmetria cilindrica, è sufficiente considerare solo il rettangolo evidenziato in figura 4.13 – a e poi integrarlo su tutta la circonferenza.

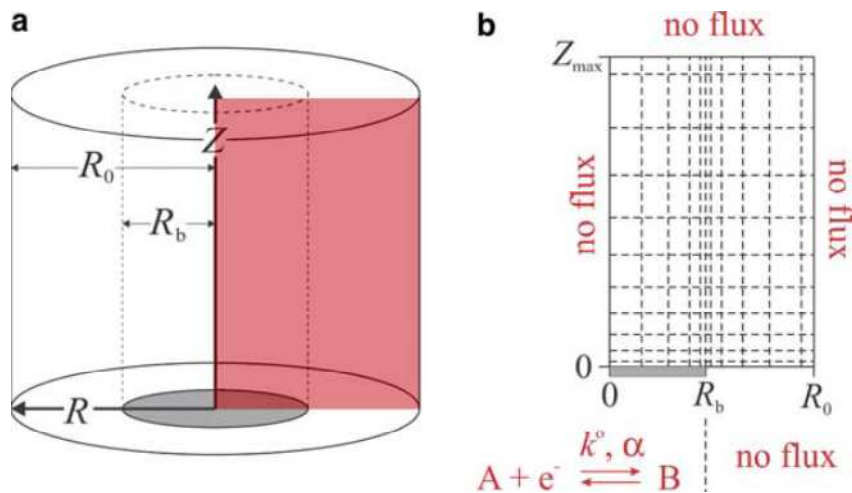


Fig 4.13: Rappresentazione della semplificazione portata dall'approccio del dominio diffusivo [6]

Come si può però notare in figura 4.14, l'approssimazione della base circolare partendo da una base cubica genera delle zone di sovrapposizione tra i domini diffusivi di microdischi adiacenti. Perciò è stata introdotta una suddivisione iniziale dell'array con esagoni al posto dei quadrati, in modo tale che le zone di sovrapposizione si riducessero [6, 8, 9].

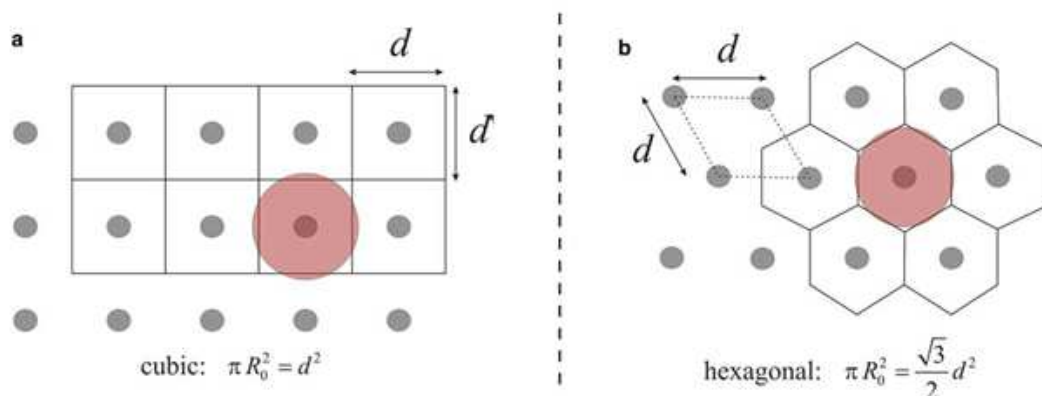


Fig 4.14: Microelettrodi con struttura di base quadrata ed esagonale con corrispettivi domini diffusivi [6]

– Simulazione su array casuali [6]

Per completezza si ritiene doveroso inserire anche gli studi effettuati circa la possibilità di dover simulare su un array in cui gli elettrodi sono disposti casualmente. In tal caso si ricorre alla tassellatura di Voronoi¹⁰ come si nota in figura 4.15 – b. Ora ogni microdisco ha una propria cella con area A_n , ove n rappresenta il numero assegnato ad ogni microdisco ($n = 1, 2, 3, \dots, N - 1, N$) e l'area totale dell'array (A_{elec}) corrisponde alla somma di tutte le aree delle celle:

$$A_{elec} = \sum_{n=1}^N A_n \quad (4.6)$$

Il voltammogramma dell'intero array risulterà essere la somma dei voltammogrammi delle N celle unitarie, ognuna delle quali è approssimabile con un dominio diffusivo avente area di base uguale alla singola A_n (fig 4.15 – c).

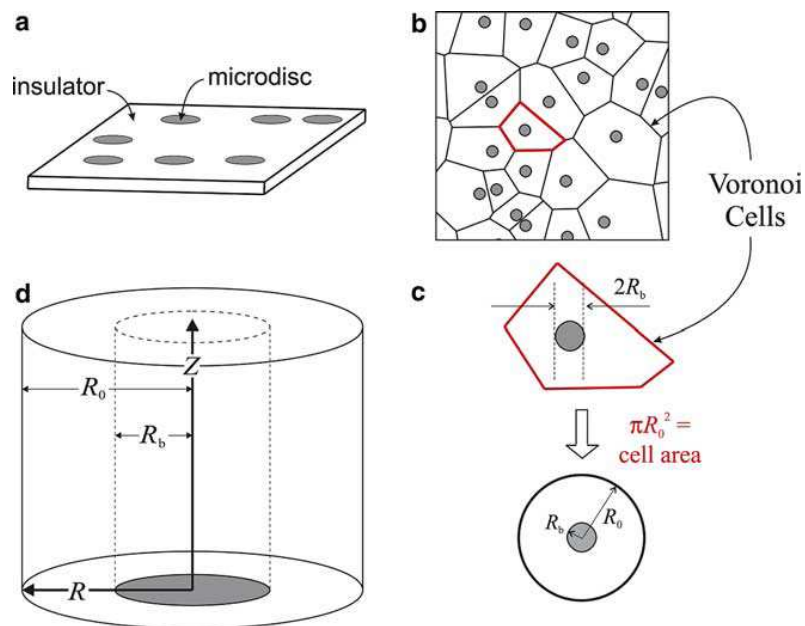


Fig 4.15: Approccio del dominio diffusivo per un array con disposizione di elettrodi casuale [6]

¹⁰ Tassellatura di Voronoi: Particolare tipo di decomposizione di uno spazio metrico determinata dalle distanze rispetto ad un determinato insieme discreto di elementi dello spazio (ad esempio, un insieme finito di punti).

Nel caso più semplice e comune, quello del piano, dato un insieme finito di punti S , il diagramma di Voronoi per S è la partizione del piano che associa una regione $V(p)$ ad ogni punto $p \in S$ in modo tale che tutti i punti di $V(p)$ siano più vicini a p che ad ogni altro punto in S .

Tale metodo di simulazione è riassunto in figura 4.16.

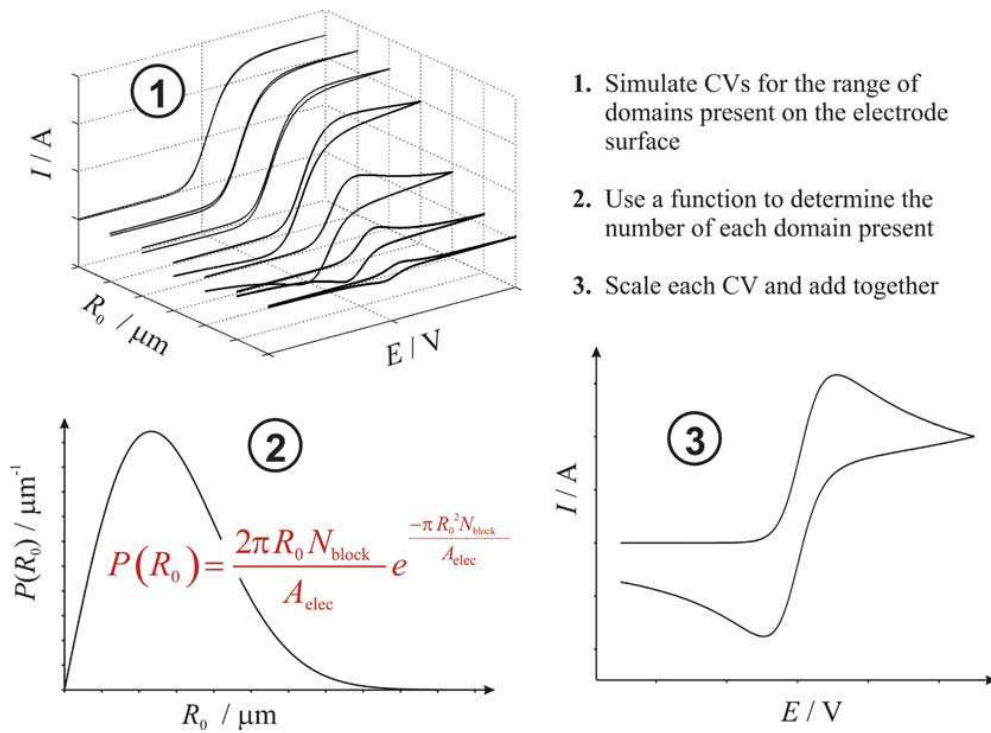


Fig 4.16: illustrazione dei passaggi eseguiti nella simulazione per una distribuzione casuale di elettrodi. Per prima cosa si simula la risposta CVM per un certo numero di domini, dopo di che si pesa ogni voltammogramma secondo la probabilità che si trovi un dominio con raggio R_0 definito (fig 4.14). Infine si sommano i voltammogrammi pesati per ottenere un voltammogramma unico per l'intero array [6].

Bibliografia:

1. A. Mignani, Sviluppo di Biosensori: Modifiche di Superfici Elettrodiche e Sistemi di Immobilizzazione Enzimatica, Università degli Studi di Bologna Alma Mater Studiorum, A.A. 2007-2008
2. J. Wang, Analytical Electrochemistry, Ed. Wiley, 2000, second edition
3. Peter Gründler, Chemical Sensors An Introduction for Scientists and Engineers, Ed. Springer, 2007
4. P. Protti, AMEL Electrochemistry Introduzione alle modern tecniche di Analisi Voltammometriche e Polarografiche, quarta edizione, 2001
5. R. G. Compton, C. E. Banks, Understanding Voltammetry, 2007
6. T. J. Davies, R. G. Compton, The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes: Theory, Journal of Electroanalytical Chemistry, 585, 63 – 82, 2005
7. C. Amatore, J. M. Savèant, D. Tessier, Charge transfer at partially blocked surfaces A model for the case of microscopic active and inactive sites, Journal of Electroanalytical Chemistry, 147, 39 – 51, 1983
8. J. Guo, E. Lindner, Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisc Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment, Analytical Chemistry, 81, 130 – 138, 2009
9. H. J. Lee, C. Beriet, R. Ferrigno, H. H. Girault, Cyclic voltammetry at a regular microdisc electrode array, Journal of Electroanalytical Chemistry, 502, 138 – 145, 2001
10. C. Beriet, R. Ferrigno, H. H. Girault, Simulation of the chronoamperometric of a regular array of microdisc electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry, 486, 56 – 64, 2000

5.1 – Premessa: concetti base e ipotesi

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) è basata sul concetto di funzione di trasferimento (Transfer Function, TF). Si applica un segnale di input al sistema, che viene così perturbato rispetto alla sua condizione di equilibrio e produce un segnale di output che viene registrato. Dal punto di vista puramente teorico il segnale di input può essere di qualunque natura (a crescita lineare, a gradini, sinusoidale...), tuttavia nella pratica gli unici segnali che vengono realmente utilizzati sono i segnali sinusoidali e questo non costituisce una perdita di generalità in quanto, come noto, tutti i segnali periodici possono essere rappresentati mediante la serie di Fourier e divenendo quindi sommatorie di segnali sinusoidali. Posto quanto appena affermato, d'ora in avanti il segnale di input verrà considerato ondulatorio sinusoidale. Se il sistema è lineare, anche il segnale di output risulta essere sinusoidale e caratterizzato dalla medesima frequenza del segnale di input, ma con differente ampiezza e angolo di fase. Il rapporto fra la risposta del sistema perturbato e il segnale perturbante determina la funzione di trasferimento complessa per quella determinata frequenza.

Generalmente come segnale di input si considera una corrente e come segnale di uscita si registra una tensione, di conseguenza la funzione di trasferimento coinciderà con l'impedenza complessa Z :

$$Z(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)}$$

Per sistemi elettrochimici l'analisi consiste nella misurazione della funzione di trasferimento per un segnale di piccola intensità così da poter considerare solo la porzione lineare del responso. Tuttavia anche con questo accorgimento, quando si verifica un processo elettrochimico possono avvenire processi di trasporto di massa e trasferimenti di energia che possono cambiare la struttura e le proprietà dell'oggetto studiato. In tali casi il sistema non risulta più lineare, non in condizioni stazionarie e caratterizzato da un effetto di memoria, tutte implicazioni che vanificano il responso della misurazione. È opportuno quindi, al fine di evitare questo tipo di complicazioni, introdurre delle ipotesi di lavoro sia riguardanti l'analisi del sistema che di natura elettrochimica, che dovranno essere verificate prima e dopo l'esperimento [1, 2].

– *Ipotesi di lavoro concernenti l'analisi del sistema [1]:*

- Linearità: come precedentemente affermato, tale condizione è raggiungibile solo nel caso in cui il segnale di input sia piccolo in ampiezza, permettendo così al sistema di rimanere inalterato;
- Stato stazionario: le misure devono essere indipendenti dal momento in cui vengono eseguite, ovvero il sistema deve essere tempo-invariante;
- Finitezza: le parti reali e immaginarie dell'impedenza devono assumere, nell'intervallo di frequenze considerato, valori finiti;
- Il sistema deve essere SISO, ovvero ad un solo ingresso deve corrispondere una singola uscita: tale requisito può essere raggiunto solo se tutti i vari parametri coinvolti (pH, temperatura, concentrazione...) sono mantenuti costanti;
- Non si devono verificare effetti di memoria: il sistema non deve “ricordare” la storia dell'esperimento e quindi il risultato deve essere indipendente dalla sequenza di misurazioni effettuate;
- Osservabilità: i fenomeni che si vogliono osservare, devono essere visibili nell'intervallo di frequenze determinato per l'analisi.

– *Ipotesi di lavoro di natura elettrochimica [1]:*

- Additività (o disaccoppiamento) della corrente faradica e di quella di caricamento dei doppi strati;
- Elettroneutralità della soluzione elettrolitica;
- Mancanza di fenomeni convettivi e di migrazione: si assume che non ci siano ulteriori cambiamenti nelle concentrazioni locali se non quelli dovuti a fenomeni diffusivi e di trasferimento di carica;
- Assenza di flussi di massa o di carica in direzione laterale rispetto all'elettrodo.

Un esperimento condotto in tali ipotesi gode peraltro di un'ulteriore proprietà: la causalità. Qualunque cambiamento avvenga nel sistema studiato, è provocato solo dal segnale perturbante. Grazie alla proprietà appena descritta si può giungere alla completa descrizione dell'oggetto considerato partendo anche solo da una delle due parti (reale o immaginaria) nota, questo è possibile grazie alla relazione di Kramers – Kronig che mette in relazione, attraverso la trasformata di Hilbert, parte reale e parte immaginaria di una funzione complessa causale.

5.2 – *Modelli interpretativi dei dati EIS*

Il grande vantaggio dell'analisi EIS è la possibilità di poter separare le varie cinetiche dei processi che avvengono nel sistema osservato; d'altro canto è importante notare che le informazioni date dalle misure EIS devono essere interpretate, e questo è solitamente l'aspetto più complesso e problematico dell'analisi. Infatti un dato di impedenza in sé non dice nulla sulla realtà fisica dei processi elettrochimici che avvengono nel sistema in esame, è solo attraverso la costruzione di un modello equivalente che si possono estrapolare le proprietà chimico-fisiche dell'oggetto in esame. Tale modello non è altro che il tentativo di rappresentare razionalmente tutti i processi osservabili nel sistema.

I dati ottenuti da un'analisi EIS sono manipolabili secondo due approcci, uno totalmente sperimentale e uno teorico. Nel primo approccio il modello è derivato direttamente dai dati e la fase di identificazione riguarda sia la struttura del modello, sia la quantificazione dei parametri. Il secondo approccio si fonda sulla presunta conoscenza dei potenziali processi osservabili, che comporta di conseguenza la costruzione a priori della struttura del modello, del quale poi si dovranno solo identificare i parametri attraverso i dati ottenuti. Inoltre l'approccio teorico segue due strade procedurali: quella classica (metodo della soluzione pienamente elettrochimica e matematica) e quella strutturale (costruzione di un modello matematico composto di elementi con soluzione grafica del comportamento dell'impedenza).

Il modello classico ricava un'espressione teorica per l'impedenza dell'oggetto indagato, sulla base di alcune considerazioni sui processi che si verificano a livello dell'interfaccia. Si parte da un insieme iniziale di equazioni integrali e differenziali, che descrivono la distribuzione spaziale delle variabili di stato: potenziale $E(N,t)$ e concentrazione delle specie $C_i(N,t)$ al punto N e istante t . La loro soluzione necessita poi di un'ulteriore semplificazione matematica, che è ottenuta applicando le ipotesi elettrochimiche iniziali. Sebbene la soluzione finale dell'equazione dell'impedenza possa seguire diversi approcci, diversi per le ipotesi che definiscono il modello, molti di questi obbediscono alla stessa sequenza di procedure [1]:

- Una scelta delle condizioni iniziali e al contorno;
- Linearizzazione: la procedura viene eseguita applicando una piccola perturbazione intorno al punto di lavoro. La risposta corrispondente si ottiene mediante lo sviluppo in serie di Taylor. L'efficacia della procedura è determinata

dall'ampiezza del segnale perturbante. Si dovrebbe assicurare la minimizzazione di tutti i termini in confronto al primo, che è lineare;

- Conversione del sistema dal dominio del tempo al dominio delle frequenze tramite la trasformata di Laplace;
- La soluzione matematica o numerica del nuovo insieme di equazioni. L'espressione finale dovrebbe dare la dipendenza dalla frequenza delle parti reale e immaginaria dell'impedenza.

Il modello strutturale si basa sulla costruzione di un modello per l'impedenza, direttamente nel dominio delle frequenze, coincidente con una serie di elementi connessi fra loro secondo diverse leggi. Ognuno degli elementi descrive un singolo processo fisico, in modo tale che il modello totale descriva il comportamento complessivo del sistema. Nella fattispecie il modello coincide con un circuito elettrico, detto anche circuito equivalente, in cui i singoli elementi coincidono con i tipici componenti elettrici (resistente, conduttanze, capacità...). Un importante vantaggio del modello strutturale è il ridotto numero di parametri, che li rende del tutto identificabili, efficienti e facili per la manipolazione.

Il modello strutturale può essere inoltre raffinato con l'introduzione di una serie di elementi elettrochimici che rappresentano determinate funzioni matematiche (Elemento di Warburg, CPE...) [1, 2].

5.3 – Elementi in circuiti equivalenti

Una volta nota la funzione di trasferimento del sistema, questa può essere modellizzata con i classici elementi circuitali conosciuti (resistenze, capacità, induttanze). Tuttavia si rende necessaria l'introduzione di alcuni elementi che riescano a descrivere in maniera più specifica i processi elettrochimici (elemento di Warburg e elemento a fase costante).

– Resistenza

L'impedenza di un resistore ideale viene definita come $Z_R(\omega) = R$, dunque come noto ha parte reale pari al suo valore nominale di resistenza e parte immaginaria nulla. (vedi fig. 5.1)

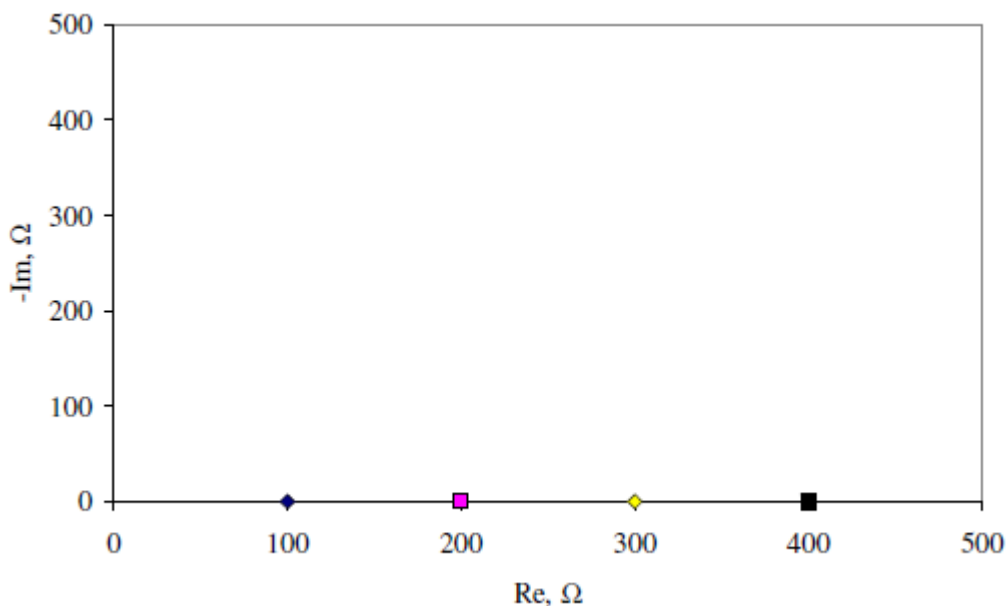


Fig 5.1: simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da una sola resistenza ($R = 100, 200, 300, 400 \Omega$) [2]

All'interno del sistema interfaccia elettrodo/soluzione si possono riconoscere e definire due componenti resistive: la resistenza ohmica della soluzione elettrolitica (R_S) e la resistenza R_{et} legata al processo faradico di trasferimento elettronico. Fra le due R_S rappresenta le proprietà elettriche del bulk ed è un elemento imprescindibile in quanto forzatamente la corrente totale che arriva all'elettrodo deve passare per la soluzione elettrolitica. Quindi questo parametro non è in alcun modo affetto dalle trasformazioni chimiche che avvengono sulla superficie elettrodica.

L'altra componente, R_{et} , dipende invece dalle caratteristiche dielettriche e isolanti all'interfaccia elettrodo/elettrolita. Tale resistenza descrive il ritardo nella cinetica del trasferimento elettronico sulla superficie introdotto da strati isolanti dovuti a eventuali modifiche effettuate sulla superficie elettrodica. Se ci si pone nell'ipotesi che lo strato di modifica superficiale dell'elettrodo sia omogeneo e occupi tutta la superficie elettrodica, tale resistenza consta di due componenti serie $R_{et} = R_{Au} + R_{mod}$ ove R_{Au} è la componente costante di trasferimento elettronico legata all'elettrodo non modificato (la specifica rispetto all'elettrodo d'oro è stata fatta in quanto elettrodo di interesse per lo studio del biosensore) mentre R_{mod} è la componente variabile legata alle modifiche della superficie elettrodica. È doveroso inserire tale ipotesi in quanto nel caso in cui la modifica non occupi la totalità della superficie, ci sarebbero delle aree in diretto contatto con la soluzione elettrolitica e tale relazione quindi non sarebbe più valida [3].

– Condensatore

L'impedenza di un condensatore è data da: $Z_C(\omega) = (j\omega C)^{-1} = -j(\omega C)^{-1}$ pertanto si vede come in tal caso la parte reale sia nulla e la parte immaginaria sia negativa per valori positivi di C, ne consegue che Z_C avrà una fase di -90° e un modulo che varia come $(\omega C)^{-1}$. (fig 5.2)

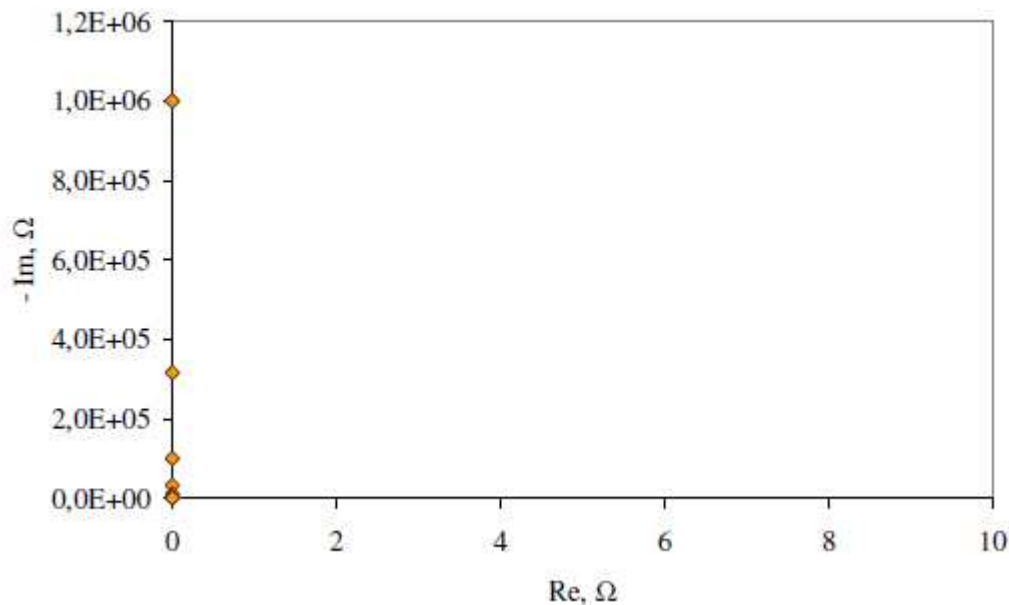


Fig 5.2: simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un solo condensatore nell'intervallo di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz ($C = 1$ mF) [2]

All'interno del sistema si può identificare sostanzialmente un contributo capacitivo fondamentale, legato al doppio strato elettronico C_{dl} (vedi capitolo 1). La capacità di doppio strato dipende dalla permittività dielettrica introdotta dalle molecole del doppio strato carico ϵ_{dl} , quindi la mancanza di molecole polari comporta una diminuzione di C_{dl} . Nel circuito elettronico equivalente anche C_{dl} può essere rappresentata come serie di una componente costante C_{Au} legata all'elettrodo non modificato (dipendente solo dal potenziale applicato e dal materiale dell'elettrodo, ad esempio per l'elettrodo d'oro policristallino si ha $C_{Au} \approx 40 - 60 \mu Fcm^{-2}$) e una variabile dipendente dalle modifiche sulla superficie elettrodica (C_{mod}) che tende a far diminuire la capacità di doppio strato [3].

– *Elemento di Warburg*

Questo elemento è stato sviluppato per descrivere fenomeni diffusivi che possono avvenire quando all'elettrodo si sviluppa una reazione di ossidoriduzione. La sua impedenza è funzione della frequenza del potenziale di ingresso: ad alte frequenze il campo elettrico varia molto più velocemente di quanto le particelle cariche (ioni e/o molecole polari) possano rispondere. L'influenza della diffusione in tal caso risulta fortemente limitata; al contrario se la frequenza diminuisce le particelle cariche riescono ad orientarsi nel verso del campo elettrico e ciò facilita la diffusione.

L'impedenza di Warburg per uno strato diffusivo infinito è definita come:

$$Z_w(j\omega) = \sigma(\omega)^{-1/2}(1-j) \quad (5.1)$$

Da tale formulazione si nota che parte reale e parte immaginaria sono uguali e quindi lo scostamento di fase che caratterizza questo elemento è costante a -45°

$$Z_w(j\omega) = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} - j\frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} = \text{Re} + j\text{Im} \rightarrow \text{Re} = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}; \text{Im} = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \quad (5.2)$$

Ove σ è il coefficiente di Warburg così definito:

$$\sigma = \frac{RT}{n^2FA\sqrt{2}} \left(\frac{1}{C_O^*\sqrt{D_O}} + \frac{1}{C_R^*\sqrt{D_R}} \right) \quad (5.3)$$

in cui D_O e D_R sono rispettivamente i coefficienti di diffusione della specie ossidante e riducente, C_O^* e C_R^* la concentrazione di bulk della specie ossidante e riducente, n è il numero di elettroni scambiati nella reazione e A è l'area dell'elettrodo di lavoro.

Come detto però, la formula precedente dell'impedenza di Warburg risulta valida solo per strati di diffusione infiniti, nel caso in cui lo strato considerato sia limitato l'impedenza a basse frequenze si discosta molto da tale andamento. In tal caso Z_W viene descritto meglio nella forma più generale

$$Z_o = \sigma \omega^{-1/2} (1 - j) \tanh \left[\left(\frac{\delta^2 j \omega}{D} \right)^{1/2} \right] \quad (5.4)$$

con δ spessore dello strato diffusivo e D valore medio del coefficiente di diffusione per le specie diffondenti. Si noti che alle alte frequenze ($\omega \rightarrow \infty$) e per uno spessore infinito ($\delta \rightarrow \infty$), si ha che

$$\tanh \left[\left(\frac{\delta^2 j \omega}{D} \right)^{1/2} \right] \rightarrow 1 \quad (5.5)$$

e l'espressione (4) si semplifica in (1) [2].

In una forma più semplice da affrontare analiticamente, si può scrivere:

$$Z_{BW} (i\omega) = (i\omega)^{-1/2} \text{th}(i\omega R_0^2 / \sigma)^{1/2} \quad (5.6)$$

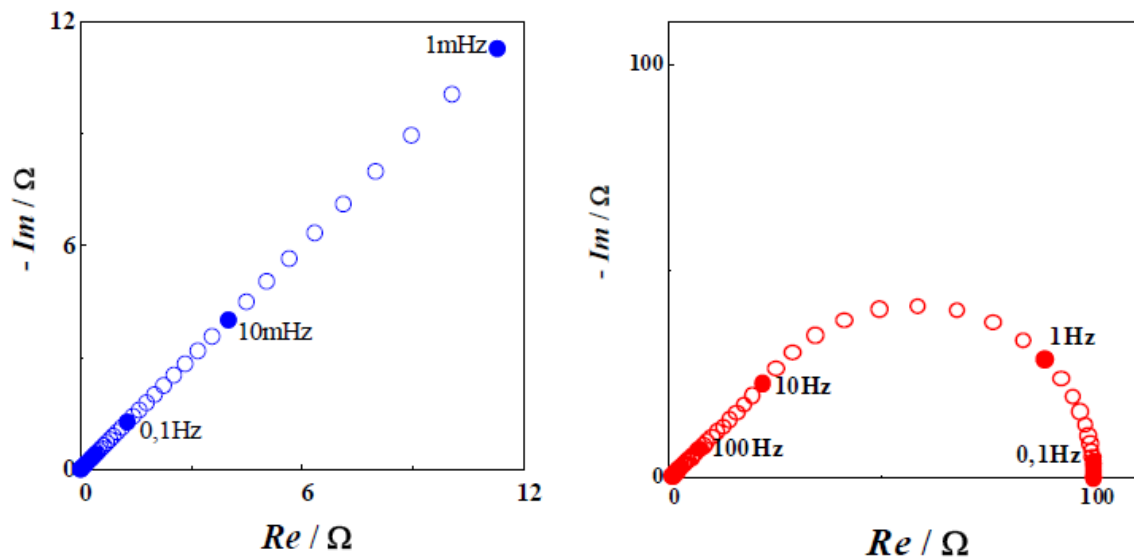


Fig 5.3: simulazione del diagramma di Nyquist nel range di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz per l'impedenza dell'elemento di Warburg ideale (grafico blu, $\sigma = 400 \Omega / s^{1/2}$) e per l'elemento di Warbur limitato (grafico rosso, $\sigma = 0.01 \Omega / s^{1/2}$, $R_0 = 100 \Omega$) [1]

– *Elemento a fase costante*

L'elemento a fase costante (Constant Phase Element, CPE) rappresenta una relazione empirica introdotta per descrivere la dipendenza dalla frequenza dell'impedenza di un elemento causata dalla rugosità o disomogeneità delle proprietà superficiali. L'impedenza di un generico CPE è:

$$Z_{CPE}(j\omega) = \frac{1}{A(j\omega)^n} \quad (5.7)$$

dove A è un fattore di proporzionalità ed n è il parametro che controlla il CPE (n può assumere solo valori tra 0 e 1).

Il CPE viene utilizzato per simulare strati di separazione di carica, quindi in pratica rappresenta un modello di condensatore non ideale. Il CPE ha lo stesso comportamento di una capacità se $n = 1$.

Anche per questo elemento, come per l'elemento di Warburg, esiste una variabile per strati omogenei e limitati con un comportamento da CPE. L'impedenza di questo elemento (Bounded Constant Phase Element, BCP) è descritta da:

$$Z_{BCP}(j\omega) = A^{-1}(j\omega)^{-n} \tanh[R_0 A(j\omega)^n] \quad (5.8)$$

Dalla quale si nota come alle alte frequenze, il comportamento del BCP tende a quello del CPE [2].

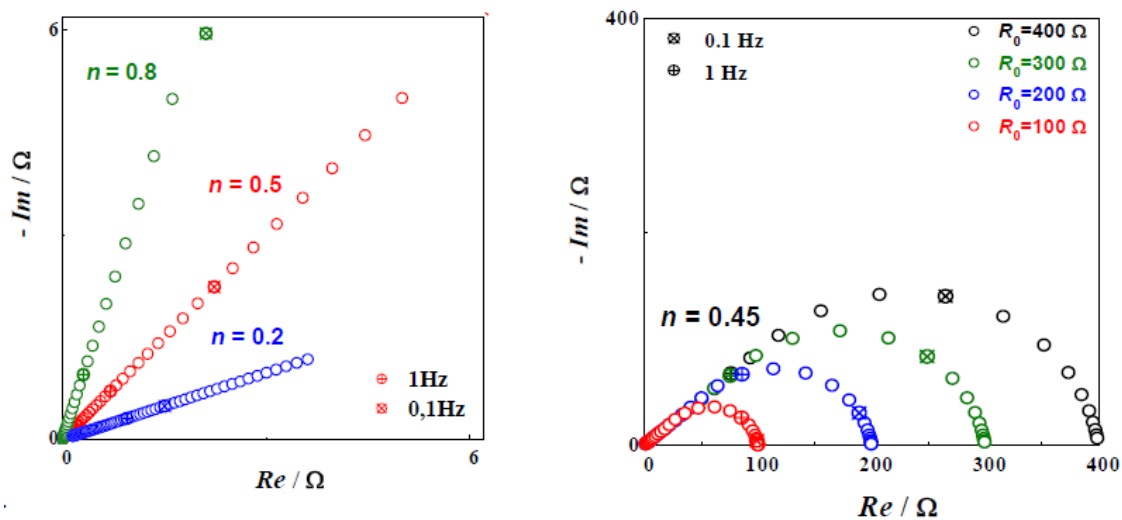


Fig 5.4: diagramma di Nyquist nel range di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz per l'impedenza dell'elemento a fase costante ideale a differenti valori di n (grafico di sinistra, $A = 100$) e limitato, per differenti valori di R_0 e con n fissato (grafico di destra $A = 0,01$) [1]

5.4 – Modelli elettrochimici notevoli

Combinando gli elementi appena descritti si possono ottenere dei circuiti equivalenti i cui diagrammi di Nyquist ricalcano l'andamento dei dati sperimentali EIS, rendendo più semplice la comprensione quindi di tali dati tramite curve note.

– Elettrodo a polarizzazione ideale

È il caso più semplice di modellizzazione di un sistema interfaccia elettrodo/elettrolita, in cui si assume che sulla superficie elettrodica vi sia totale assenza di processi di sorta. In tali ipotesi l'interfaccia viene modellizzata come la serie fra componente resistiva della soluzione elettrolitica R_S e la componente capacitiva di doppio strato C_{dl} [1, 2].



Fig 5.5: Modello circuitale dell'elettrodo polarizzabile

L'impedenza complessiva quindi risulta essere:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{1}{j\omega C_{dl}} \quad (5.9)$$

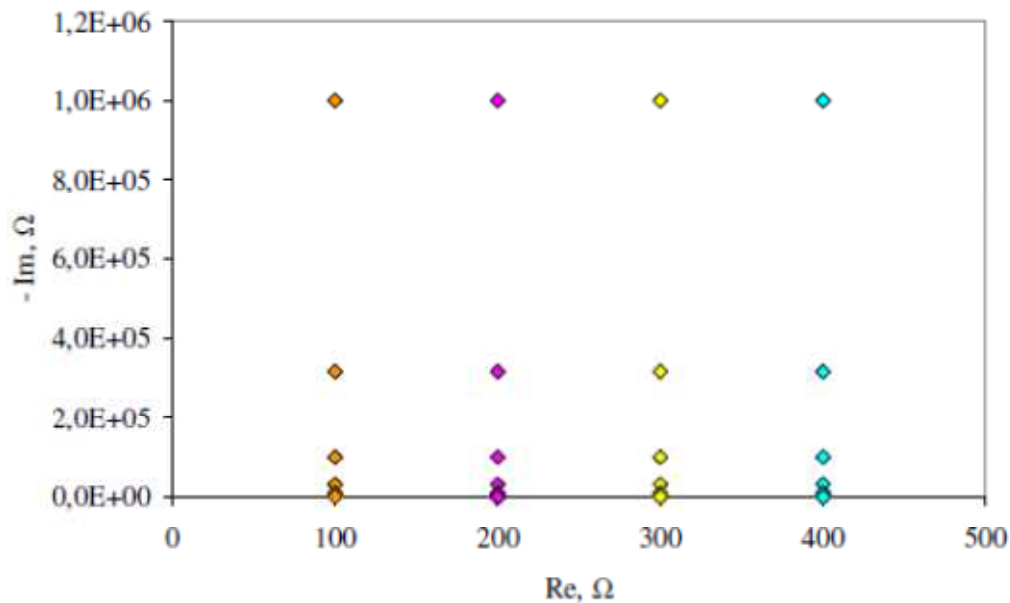


Fig 5.6: Simulazione del diagramma di Nyquist per il circuito in figura 5.5, nell'intervallo di frequenze 10^{-3} – 10^3 Hz a differenti valori di R_s ($C = 1$ mF) [2]

– Elettrodo polarizzabile

In tal caso si assume che all'elettrodo avvenga un processo di trasferimento di carica, ne consegue quindi che si dovrà aggiungere al modello precedente una componente di impedenza faradica e la si dovrà porre in parallelo con la capacità di diffusione, in quanto la corrente entrante nel elettrodo è somma delle componenti di diffusione e di trasferimento di carica. La componente aggiuntiva è R_{et} , la resistenza di trasferimento elettronico, per cui l'impedenza totale sarà [1, 2]:

$$Z(j\omega) = R_S + \frac{R_{et} \frac{1}{j\omega C_{dl}}}{R_{et} + \frac{1}{j\omega C_{dl}}} \quad (5.10)$$

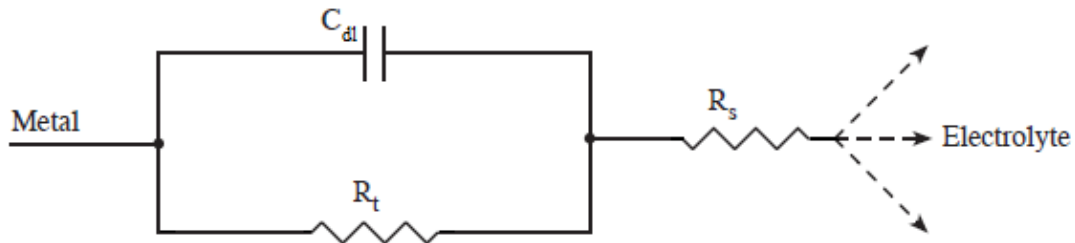


Fig 5.7: Modello circuitale per un elettrodo polarizzabile

Il suo diagramma di Nyquist, in figura 5.8, corrisponde ad un semicerchio di raggio $R_{ct}/2$ e intercetta l'asse delle ascisse in due punti, uno coincidente con R_S (per $\omega \rightarrow \infty$) e uno coincidente con $R_S + R_{ct}$ (per $\omega \rightarrow 0$). La componente immaginaria presenta un massimo di valore $R_{ct}/2$ in ω_o , definita come [3]:

$$\omega_o = \frac{1}{R_{et} C_{dl}} = \frac{1}{\tau}$$

ove τ è la cosiddetta costante di tempo del sistema.

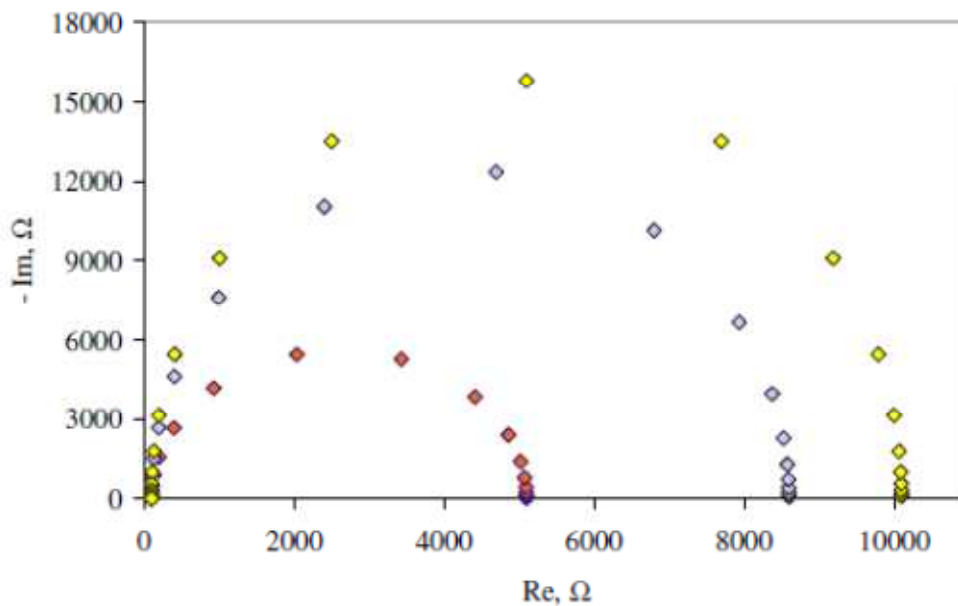


Fig 5.8: Simulazione del diagramma di Nyquist per il circuito di figura 5.7, nell'intervallo di frequenze 10^{-3} - 10^3 Hz a differenti valori di R_{ct} ($R_S = 30 \Omega$, $C = 1 \text{ mF}$)[2]

– Cella di Randles

La cella di Randles è un circuito che descrive il comportamento di un elettrodo polarizzabile sulla cui superficie avvenga una reazione elettrochimica che alle basse frequenze risulti limitata dalla diffusione. Dal punto di vista prettamente circuitale questo si traduce nell'aggiunta al modello precedente (cfr fig 5.7) dell'impedenza dell'elemento di Warburg Z_W in serie con la resistenza di trasferimento elettronico R_{et} . L'impedenza finale che si ottiene è pari a:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{\frac{1}{j\omega C_{dl}} \left(R_{et} + \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}} \right)}{\frac{1}{j\omega C_{dl}} + R_{et} + \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}}} \quad (5.11)$$

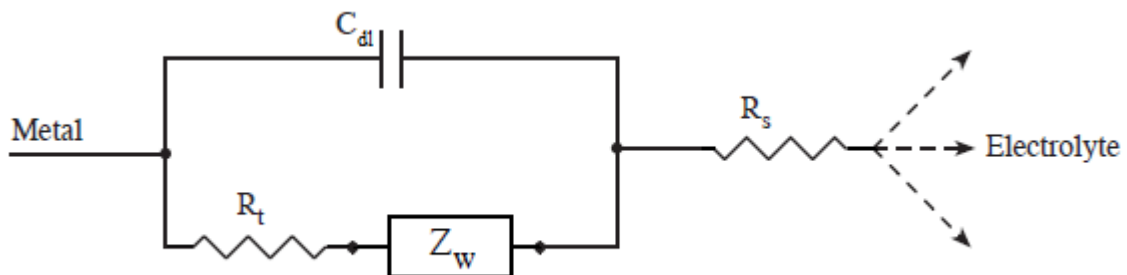


Fig 5.9: Modello circuitale dell'interfaccia metallo – elettrolita [4]

Il suo comportamento nell'arco complesso, come si nota in figura 5.10 e 5.11, è scomponibile in un arco di circonferenza alle alte frequenze e una retta alle basse frequenze: da tale comportamento si nota come Z_W divenga meno significativa all'aumentare della frequenza, e l'impedenza totale venga dominata dal parallelo fra C_{dl} e R_{et} , ad indicare come i processi di trasferimento di carica prevalgano sui fenomeni diffusivi.

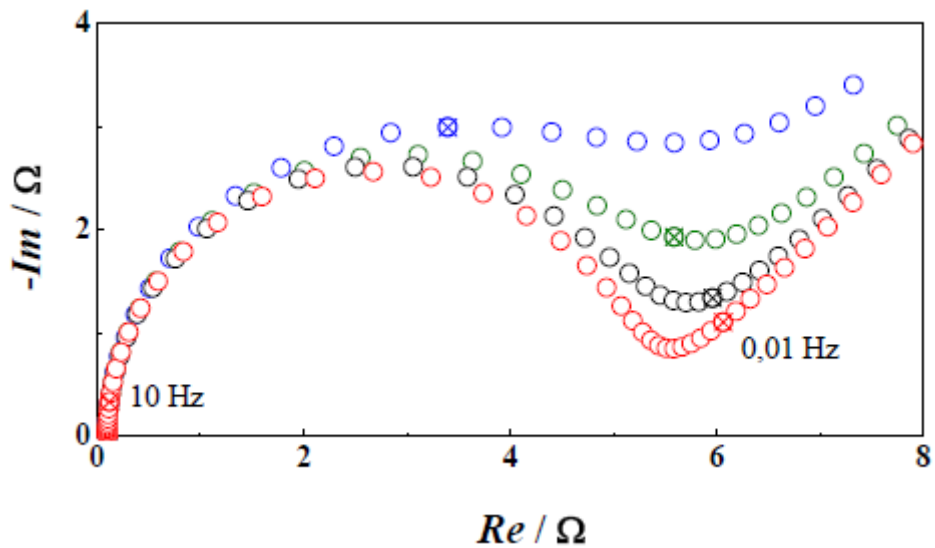


Fig 5.10: Simulazione del diagramma di Nyquist per il circuito in figura 5.9 nell'intervallo di frequenze 10^{-3} – 10^3 Hz a diversi valori di C_{dl} : 300 μ F (in rosso), 1 mF (in nero), 3 mF (in verde), 10 mF (in blu) con valori fissi degli altri componenti ($R_s = 100 \Omega$, $R_{ct} = 5000 \Omega$, $\sigma = 100$)[1]

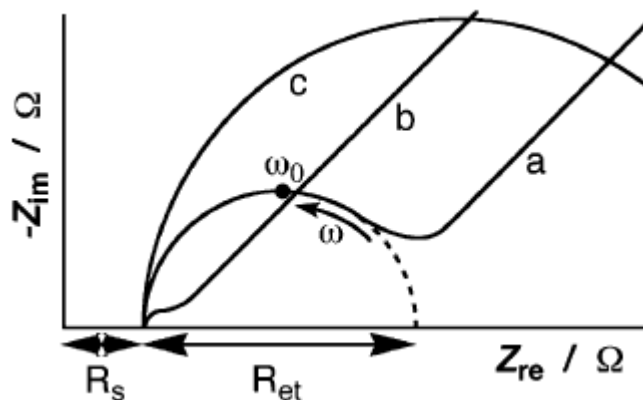


Fig 5.11: Spettro schematico di impedenza faradica rappresentato nel diagramma di Nyquist per: a) un elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da C_{dl} (basse frequenze) e da R_{et} (alte frequenze). b) elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da C_{dl} . c) elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da R_{et} . [3]

– *Modello frattale per l'interfaccia elettrodo-elettrolita con superficie ruvida*

Un'ulteriore sofisticazione del modello dell'elettrodo prevede di considerare la rugosità della superficie elettrodica. Per far ciò si è verificato che una rete frattale può essere un ottimo modello della superficie rugosa di un elettrodo [5]. La sezione trasversale del modello dell'interfaccia è mostrato in fig. 5.12, nella quale l'elettrodo è mostrato in bianco e l'elettrolita in nero.

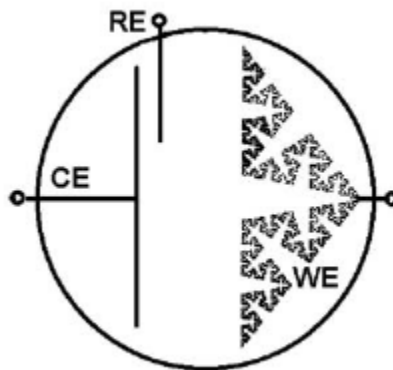


Fig 5.12: cella elettrolitica in cui la geometria dell'elettrodo di lavoro (WE) è modellizzata come una rete frattale. RE sta per reference electrode e CE per counter electrode.



Fig 5.13 : modello Cantoriano¹¹ di una superficie ruvida tra un elettrolita (in nero) e un elettrodo (in bianco) [5].

¹¹ Insieme di Cantor: è un sottoinsieme dell'intervallo $[0, 1]$ dei numeri reali. È definito in modo ricorsivo, partendo dall'intervallo $[0, 1]$ e rimuovendo ad ogni passo un segmento aperto centrale da ogni intervallo. L'insieme di Cantor consiste di tutti i punti dell'intervallo di partenza $[0, 1]$ che non vengono mai rimossi da questo procedimento ricorsivo: in altre parole, l'insieme che rimane dopo aver iterato questo procedimento infinite volte.

Ogni incavo ha una struttura auto-similare che si suddivide in due ramificazioni e le ramificazioni sono uguali all'intero incavo ingrandito di un fattore a , $a > 2$.

Visto dalla parte dell'elettrolita, l'interfaccia ha dimensione frattale:

$$\bar{d} = \frac{\ln 2}{\ln a} < 1$$

Il modello può essere generalizzato a N scanalature, ognuna delle quali si suddivide in N rami ad ogni livello. Il fattore di scala a soddisfa sempre le condizioni:

$$a > N, \quad \frac{\ln 2}{\ln a} < 1$$

La lunghezza del bordo ha dimensione frattale $1 + \bar{d}$.

Il circuito per l'interfaccia di fig 5.13 è mostrato in fig 5.14. La resistenza R aumenta con il rapporto a ad ogni livello di ramificazione, a causa della riduzione della sezione trasversale. La capacità C , uguale ad ogni livello, rappresenta la capacità dell'interfaccia di due facce laterali di un ramo. La capacità C nell'avvallamento tra due rami diventa sempre meno importante a livelli elevati di ramificazione e si può dimostrare che diventa un parametro irrilevante, ovvero non influenza l'impedenza dell'interfaccia alle basse frequenze.

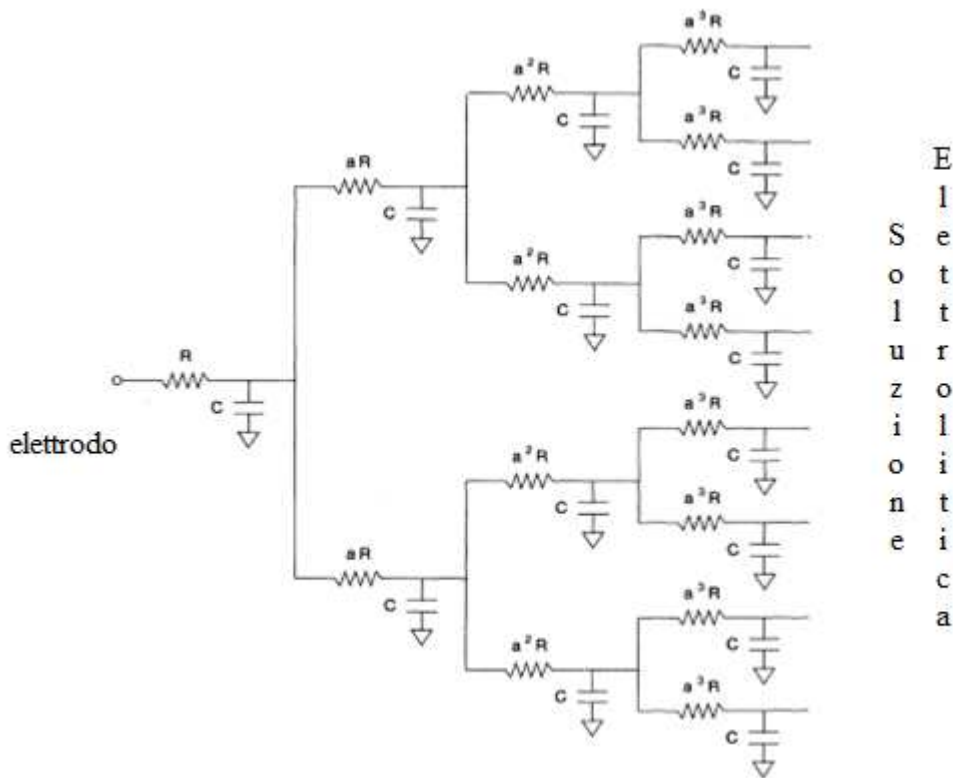


Fig 5.14: circuito equivalente per una scanalatura del modello per l'interfaccia ruvida in fig 5.13 [5].

Quando un segnale viene iniettato all'interfaccia, questo passa da un materiale a un altro seguendo una rete RC. Più bassa è la frequenza, più il segnale viaggia attraverso la parte resistiva della rete, prima di essere deviato attraverso la capacità dell'interfaccia. Poiché la parte resistiva della rete rappresenta le irregolarità della superficie, si è constatato che la rugosità influisce più su segnali a basse frequenze che su segnali ad alte frequenze, che comporta un'impedenza maggiore alle basse frequenze.

Si verifica che, dopo alcuni passaggi matematici, la formula che si ricava per l'impedenza è del tipo

$$Z(\omega) = kR(j\omega)^{-n}$$

ove k è un fattore di scala e $n = 1 - \frac{\ln 2}{\ln a} = 1 - \bar{d}$. Si noti come questa notazione sia estremamente simile alla notazione usata per il CPE. Agli effetti quindi si può affermare che l'esponente della frequenza del CPE è direttamente connesso alla geometria dell'interfaccia ruvida. Una superficie liscia può essere simulata avente pochi incavi (piccolo N) e ogni ramo avente un rapporto di grande riduzione della superficie (a grande), di conseguenza \bar{d} è piccola e n tende all'unità [5].

Bibliografia

1. D. Vladikova, The Technique of the Differential Impedance Analysis Part I: Basics of the Impedance Spectroscopy, Proceedings of the International Workshop “Advanced Techniques for Energy Sources Investigation and Testing”, 2004
2. M. Minella, Caratterizzazione elettrochimica dell’interfaccia semiconduttore – elettrolita in elettrodi a film sottile di TiO₂ nanocristallino, Università degli Studi di Torino, A.A. 2005-2006
3. E. Katz, I. Willner, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis*, 15, N. 11, 2003
4. D. A. Borkholder, Cell Based Biosensors using Microelectrodes, Stanford University, 1998
5. S. H. Liu, Fractal Model, for the ac Response of a Rough Interface, *Physical Review Letters*, volume 55, n. 5, 1985

Premessa

In questo capitolo verranno presentate delle considerazioni effettuate analizzando gli studi fatti da molteplici team di ricerca riguardo lo sviluppo di 29 dispositivi per la rilevazione del lattato. Sono stati comparati i seguenti dati:

1. Detection limit;
2. Sensibilità;
3. Potenziale all'elettrodo;
4. Stabilità;
5. Dipendenza dal flow rate dei dispositivi per l'analisi in flusso.

Si è deciso di comparare questi parametri in quanto si ritiene siano i più significativi per descrivere e caratterizzare un biosensore.

Al termine della trattazione sui parametri, sarà inserita una tabella riassuntiva di tutti i dispositivi studiati, con le relative conclusioni.

6.1 – Detection limit

Il limite di rilevazione è un parametro molto importante riguardante l'accuratezza del dispositivo che si considera. In [1] immobilizzando il LOD in membrane di collagene e membrane di poliammide, si è misurato un detection limit di 30 pM per il primo caso e 60 pM per il secondo. Questo è il detection limit più basso ottenuto fra i dispositivi studiati, anche se c'è da tener presente che tale risultato è stato raggiunto utilizzando il metodo di rilevazione a bioluminescenza.

Per un biosensore a rilevazione amperometrica, il detection limit più basso è stato quantificato in 0.299 nM ed è stato trovato in [2]. Questo dispositivo prevede l'immobilizzazione su oro del LOD, su un monostrato auto-assemblato (Self Assembled Monolayer, SAM) con TGA¹² (come in figura 6.1).

¹² TGA, Acido Tioglicolico: è un acido carbossilico (ovvero con gruppo funzionale -COOH), la cui struttura presenta anche un gruppo -SH. Viene utilizzato per fare composti stabili di stagno spesso usati in alcuni prodotti di polivinilcloride.

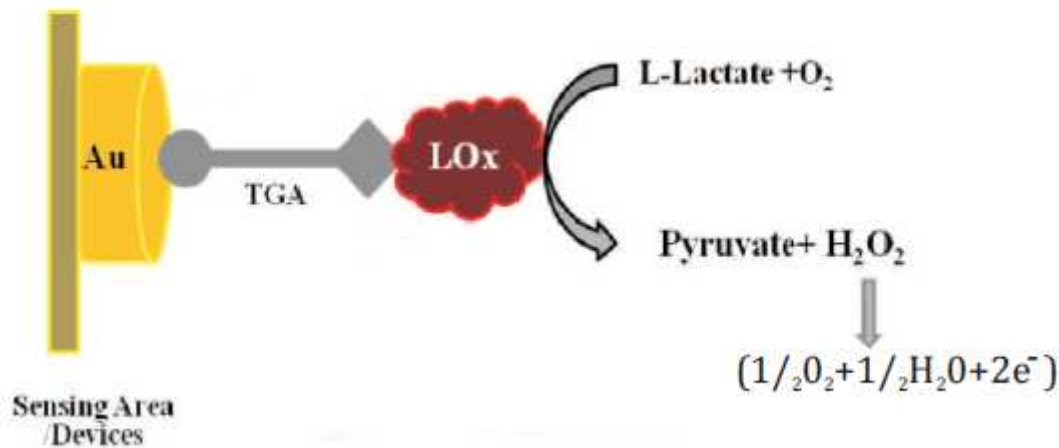


Fig 6.1: Schema esemplificativo del metodo di immobilizzazione dell'enzima LOx sul biosensore per il lattato sviluppato in [1].

Altri risultati degni di nota sono stati ottenuti da [3] e [4] che hanno rilevato un detection limit rispettivamente di 200 nM e 100 nM. In [3] si è seguita una procedura di immobilizzazione su platino dell'enzima LOx tramite co-cross-linking con glutaraldeide (cfr Cap. 3) e successivamente lo si è rivestito con una membrana di politirammina. Al contrario in [4] si è utilizzato LDH come enzima e questo è stato immobilizzato su oro con nano-particelle d'oro (Gold NanoParticles, GNP¹³) e rivestendo il complesso con una membrana di MPTS¹⁴.

Come si è notato in questi due casi l'enzima è stato ricoperto con una membrana protettiva, il che permette a livello teorico di avere un miglior detection limit in quanto il sito attivo è protetto da possibili interferenti che possono falsare la misura (cfr Cap. 3). Tale considerazione, peraltro, avvalorata la bontà del metodo di immobilizzazione proposto in [2], nel quale non si è previsto l'uso di membrane protettive.

¹³ Nano-particelle d'oro (GNP): nonostante sia stato verificato che l'oro non è un buon catalizzatore in forma di bulk, si è visto che le GNP hanno una notevole attività catalitica. Proprio grazie a questa proprietà, la loro deposizione sui trasduttori sta diventando un approccio molto promettente per lo sviluppo dei dispositivi di rilevamento.

¹⁴ MPTS: (3-mercaptopropil)trimetossilano. È un polimero con struttura tridimensionale estremamente ricco di gruppi tiolo (-SH) che hanno una grande affinità con l'oro per l'assorbimento chimico.

6.2 – Sensibilità

La sensibilità (cfr Cap. 3) non è altro che la pendenza della parte lineare della curva [corrente] – [moli di acido lattico]. Di conseguenza maggiore è la pendenza della curva, più sono precisi i dati ottenibili sulla concentrazione di acido lattico in soluzione. In alcuni studi tale parametro viene fornito come funzione dell'area attiva dell'elettrodo, in quanto è stato dimostrato in [5] che un aumento della radice quadrata dell'area attiva dell'elettrodo comporta un aumento della sensibilità. Generalmente però tale valore viene fornito “a parità di area”, ovvero indipendente dall'area attiva dell'elettrodo. In [6] viene affermato che la costante di Michaelis – Menten (cfr Cap. 2), che descrive l'attività enzimatica e l'affinità dell'enzima con il substrato, è una caratteristica della sensibilità e tale affermazione sembra trovar conferma nei dati raccolti da [7], [8], [9], [10].

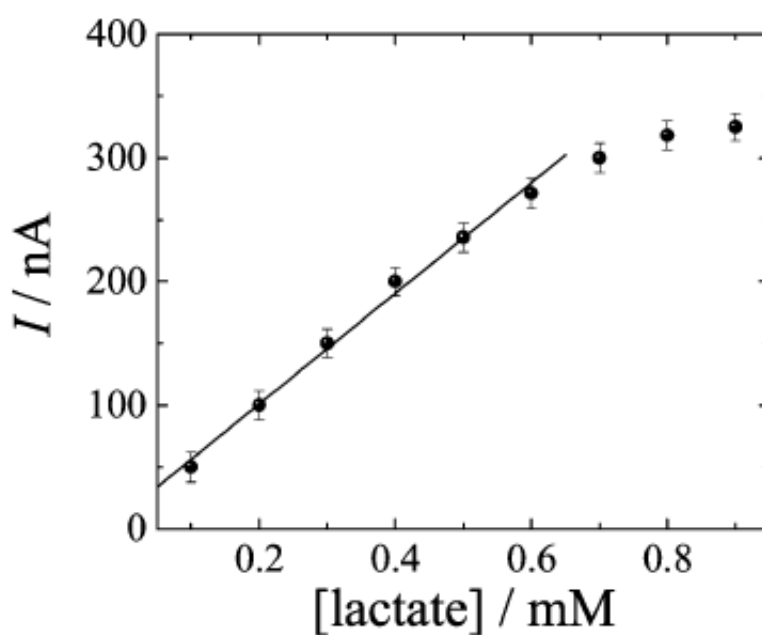


Fig 6.2: Interpolazione dei dati che mostra il range di linearità, e la relativa pendenza, della risposta amperometrica del biosensore [7]

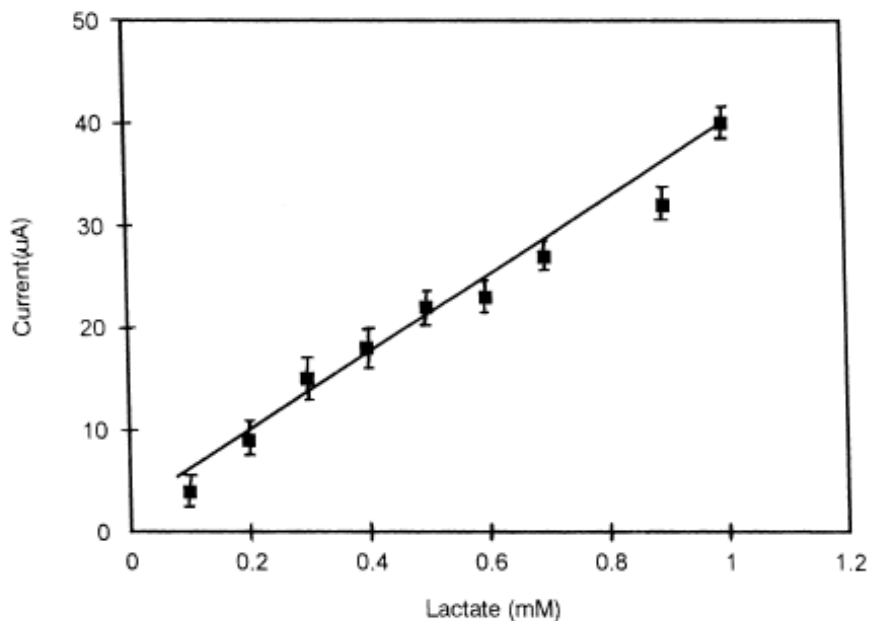


Fig 6.3: Interpolazione dei dati che mostra il range di linearità, e la relativa pendenza, della risposta amperometrica del biosensore [10]

6.3 – Potenziale applicato all'elettrodo

Un parametro determinante per valutare la potenza erogata al dispositivo e la potenza consumata dal dispositivo stesso è il potenziale che viene applicato all'elettrodo di lavoro. Questo parametro è anche importante per determinare le reazioni di ossido riduzione che avvengono all'elettrodo, siano queste dell'enzima con il substrato o tra gli interferenti.

Dai dati ricavati dai dispositivi si nota che l'andamento del potenziale applicato ad un elettrodo funzionalizzato con LOD varia dai -50 mV ai 700 mV. Ci si aspetterebbe, secondo quanto affermato anche da [11], che il potenziale applicato ad un elettrodo funzionalizzato con LDH fosse ben più alto di questi valori. In realtà secondo i dati studiati, il potenziale applicato a elettrodi con LDH varia dai 200 mV ai 700 mV. Le ragioni della relativa somiglianza fra i dati sono probabilmente da ricercarsi nel tipo di immobilizzazione e funzionalizzazione utilizzate (come affermato nel cap 3). Di particolare importanza però sono i risultati ottenuti in [4] e [7]: il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro di questi dispositivi risulta essere il più basso tra i dispositivi studiati (-5 mV) e ciò che rende questo dato ancor più rilevante è che l'elettrodo è stato funzionalizzato con LDH. Il motivo di questo grande abbassamento del potenziale

elettrodico è dovuto alla tecnologia utilizzata per funzionalizzare l'elettrodo, ovvero l'utilizzo delle nano particelle d'oro (GNPs). Le GNP sono state auto assemblate all'elettrodo con una matrice sol gel (fig 6.5).

La distribuzione di nano particelle e enzima nella rete di silicati, facilita l'accesso del substrato e questo si riscontra in una velocizzazione della risposta amperometrica.

Secondo un'analisi effettuata immobilizzando l'enzima con una matrice sol gel MPTS con e senza le GNP, si è notato tramite ciclovoltammetria che la matrice MPTS mostra una cinetica di trasferimento elettronico molto lenta e una distanza dei picchi sull'asse dei potenziali di circa 200mV. Da questo si ricava chiaramente che la rete di silicati sull'elettrodo impedisce il processo di trasferimento elettronico. Al contrario, con l'utilizzo delle GNP, l'elettrodo ha mostrato risposta redox reversibile. Le GNP concentrano le caratteristiche elettrochimiche della matrice MPTS in favore del trasferimento elettronico. I valori calcolati di R_{et} (resistenza di trasferimento di carica) con misure di impedenza confermano la facilitazione del trasferimento elettronico operata dalle GNP [7].

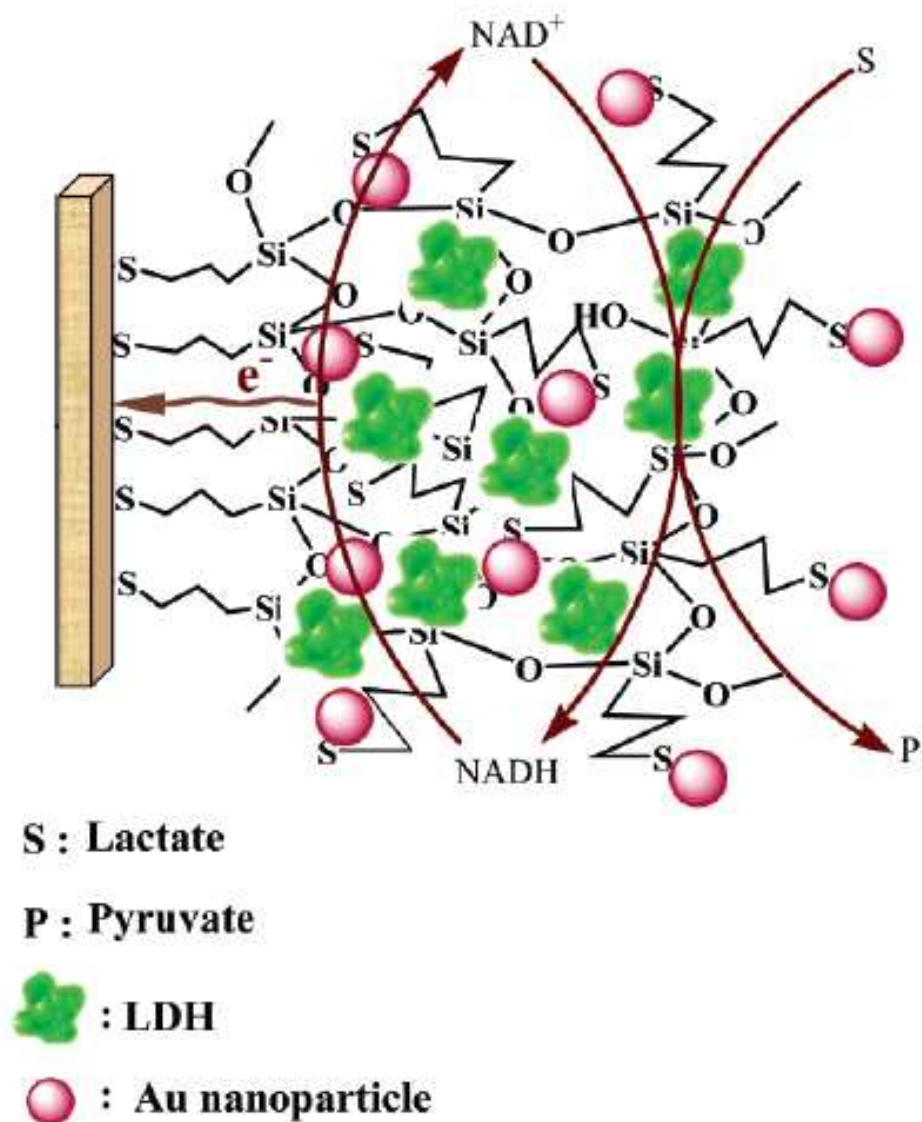


Fig 6.4: Rappresentazione schematica della rilevazione biocatalitica del lattato usando GNP e LDH immobilizzati in una matrice di silicati. Si presti attenzione alla reazione di ossidoriduzione che avviene, si nota che il biosensore studiato è di terza generazione (cfr Cap. 3) ovvero fa avvenire la reazione direttamente all'elettrodo con tutti i componenti reattivi immobilizzati sull'elettrodo [7].

6.4 – Stabilità

Nel capitolo 3 si è fatto riferimento alle tecniche di immobilizzazione come strumento per aumentare la stabilità degli enzimi sugli elettrodi. Verrà ora fatta una breve presentazione dei metodi di immobilizzazione utilizzati in alcuni lavori di particolare interesse:

- Dispositivo con LOD e LDH co-immobilizzati su film di polinilina conduttiva [10];
- Dispositivo di rilevazione amperometrica di lattato basato su enzima immobilizzato covalentemente su un doppio strato elettrosintetizzato [3];
- Dispositivo per l'analisi simultanea di lattato e glucosio basato su film sottili elettropolimerizzati [12];
- Dispositivo per l'analisi in tempo reale di L-lattato e glucosio con sensore multi-enzimatico microfabbricato [13];
- Studio sull'immobilizzazione del lattato ossidasi per aumentare la stabilità [14].

seguiranno poi alcune considerazioni sulla stabilità dell'enzima ottenuta.

Dispositivo con LOD e LDH co-immobilizzati su film di polinilina conduttiva [10]

In questo dispositivo sono stati immobilizzati con adsorbimento fisico (cfr Cap. 3) gli enzimi LOD e LDH separatamente e congiuntamente su dei film conduttivi di polianilina disposti su elettrodi di Indium – tin – oxide (ITO) deposto su vetro. Si è misurata l'attività degli elettrodi con entrambi gli enzimi immobilizzati, dopo una conservazione a 4 – 10°C, e si è osservato che l'attività enzimatica rimane superiore o uguale al 50% per due settimane, per poi calare fino al 43% nei successivi 20 giorni. È stata osservata una stabilità di circa 3 settimane per questi elettrodi, a differenza degli elettrodi con un singolo enzima (LOD o LDH) immobilizzato, che sono rimasti stabili per circa due settimane.

Dispositivo di rilevazione amperometrica di lattato basato su enzima immobilizzato covalentemente su un doppio strato elettrosintetizzato [3]

Questo dispositivo è caratterizzato dalla deposizione di un doppio strato di polipirrolo e politiramina, tramite polimerizzazione elettrochimica su un elettrodo di platino, che funge da membrana selettiva anti-interferente. Successivamente, dopo l'attivazione per mezzo di glutaraldeide, è stato immobilizzato l'enzima LOD tramite legame covalente.

La stabilità è stata determinata misurando ogni giorno la risposta del sensore, conservandolo a 4°C in PBS quando non veniva utilizzato. Si è notato che la risposta è rimasta costante per più di 3 settimane.

Dispositivo per l'analisi simultanea di lattato e glucosio basato su film sottili elettropolimerizzati [12]

In questo biosensore ogni disco elettrodico (di platino), è stato modificato con un doppio strato composto da uno strato di polipirrolo ossidato deposto per elettrosintesi, con la funzione di membrana anti-interferente, coperto da un gel ottenuto tramite co-cross-linking di glutaraldeide e LOD con albumina di siero bovino (Bovine Serum Albumin, BSA). La stabilità è stata stimata monitorando la risposta in un flusso continuo di soluzione con 5mM di lattato (sistema a 28°C). È stato notato che dopo due giorni di utilizzo continuo, la risposta è calata del 14% circa. Il tempo di vita del sensore è stato stimato in circa 4 mesi, in cui la cella elettrochimica veniva smontata ogni giorno e l'elettrodo veniva conservato a 4°C. È stato fatto anche uno studio sulla sensibilità del sensore a lungo termine e si è visto come le risposte siano rimaste praticamente invariate per circa 50 giorni, mentre al termine dello studio (durato circa 4 mesi) la sensibilità residua era attorno al 60% (fig 6.5).

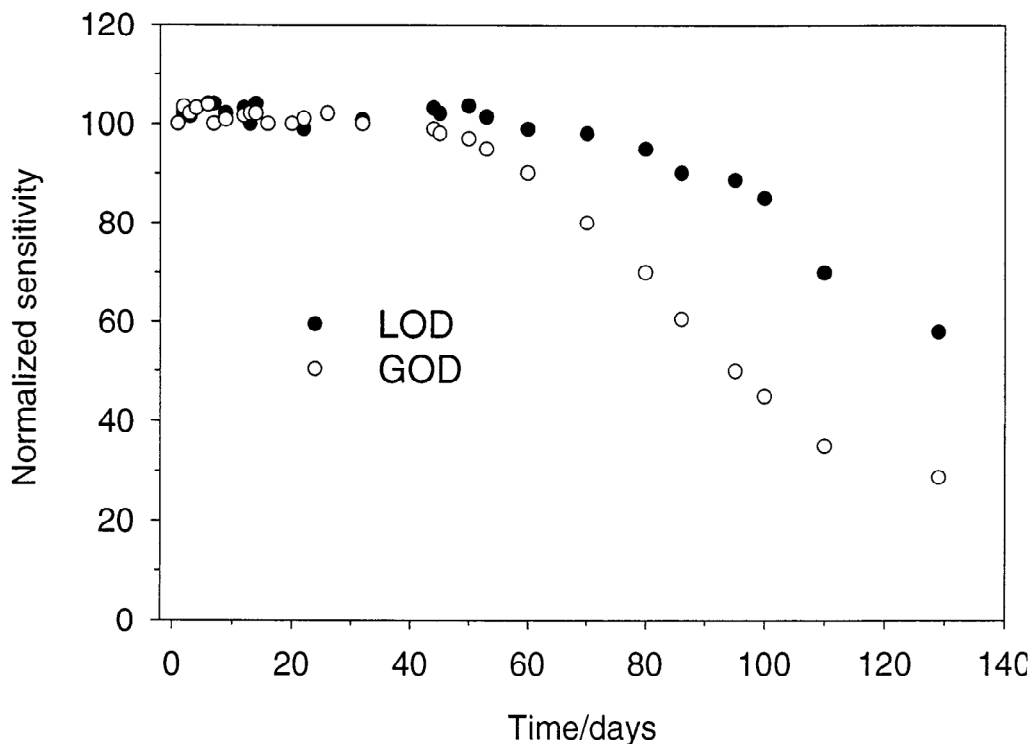


Fig 6.5: Dati di risposta della sensibilità in funzione del tempo; si nota come con l'andare dei giorni la sensibilità diminuisce, da cui si evince un calo della stabilità [12]

Dispositivo per l'analisi in tempo reale di L-lattato e glucosio con sensore multi-enzimatico microfabbricato [13]

Il tal caso è stato prodotto un sensore a contenimento su wafer di silicio, con gli incavi collegati al canale di flusso. L'enzima LOD è stato immobilizzato tramite intrappolamento in una matrice gel di PVA-SbQ¹⁵. Dapprima si è aggiunto agli incavi una membrana a diffusione limitata ottenuta da una soluzione diluita e inerte di PVA-SbQ non contenente enzimi. Successivamente gli incavi sono stati riempiti con la matrice di PVA-SbQ e enzima.

La stabilità del sensore è stata investigata ottenendo valori di sensibilità su un periodo di 4 mesi. Durante i primi 2 mesi la sensibilità è stata determinata una volta alla settimana, poi è stata effettuata una misura finale al termine dei 4 mesi (fig 6.6).

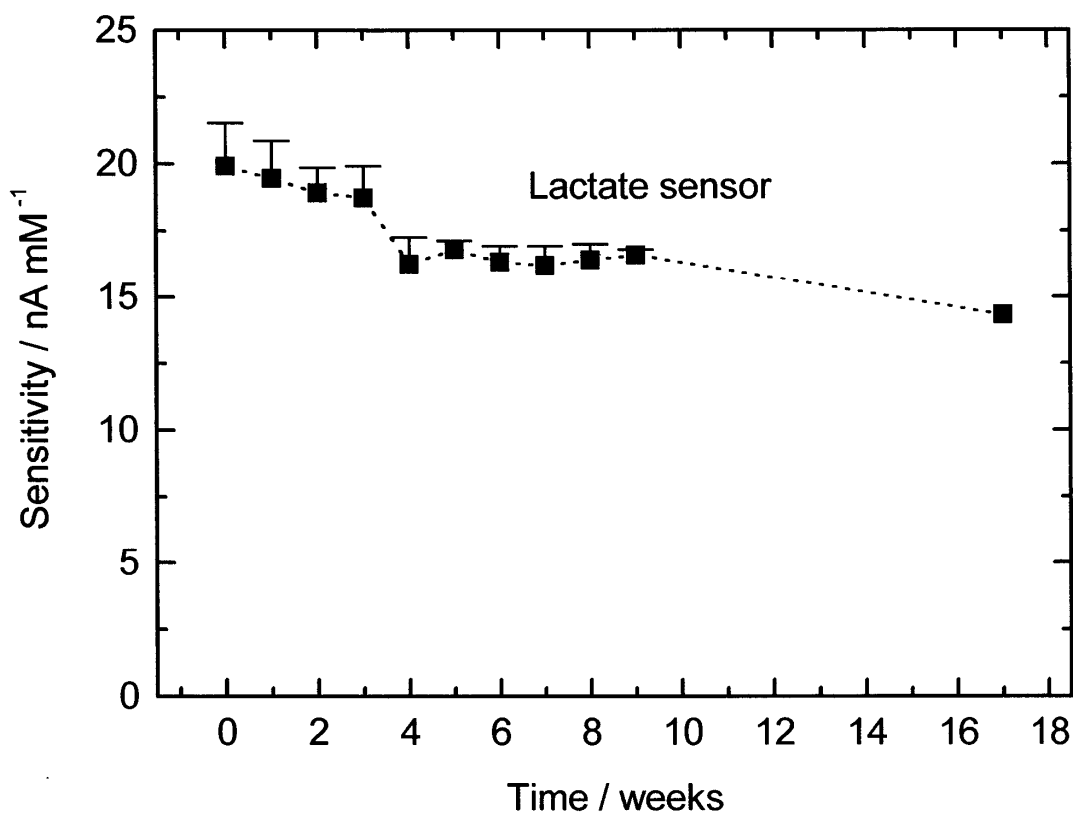


Fig 6.6: Stabilità di conservazione del sistema analizzato su un periodo di quattro mesi. Il sensore è stato conservato a 6° C in una soluzione tampone. Durante le misurazioni il flow rate era di 3 µl/min (paragrafo 6.5). Le barrette indicano i dati ottenuti nelle prime ore dall'attivazione del sensore [13].

¹⁵ PVA – SbQ: Polivinilalcol stirilpiridinio. È un polimero estremamente fotosensibile.

Studio sull'immobilizzazione del lattato ossidasi per aumentare la stabilità [14]

In questo lavoro sono state studiate tre varietà di immobilizzazione, per valutare e aumentare la stabilità del LOD. Le tecniche utilizzate sono: legame covalente con due tipi di membrana, cross linking in gel di BSA e incapsulamento in quattro differenti matrici sol gel. Per i processi di immobilizzazione nel dettaglio e la fabbricazione delle matrici sol gel, si rimanda a [14].

Con il gel di BSA l'enzima LOD è rimasto attivo per 21 giorni (attività enzimatica diminuita fino al 23% del valore iniziale), anche se non ha mostrato degradazione fisica se conservato in soluzione tampone 0.1 M per 6 settimane.

Le membrane utilizzate erano di immobilon e immunodina e l'enzima è rimasto attivo con entrambe per soli 13 giorni.

Per differenziare le matrici sol gel utilizzate, queste verranno chiamate sol – gel 1, 2, 3, 4. In tutte le matrici sol – gel l'enzima è rimasto attivo per 55 giorni, ma ha presentato diversi valori iniziali e andamenti nel tempo dell'attività enzimatica. Nel sol – gel 1 l'attività enzimatica di partenza era molto alta, ma ha subito un calo fino al 90% intorno al quarantesimo giorno, per poi però risalire fino al valore iniziale.

Nel sol – gel 2 , invece, il valore di partenza dell'attività enzimatica era medio – alto; un aumento del 200 % è stato notato intorno al trentesimo giorno circa, seguito da un ritorno stabile al valore iniziale.

Il sol – gel 3 presentava un'attività di partenza estremamente elevata, che però ha avuto un calo generale intorno al 50 % a fine test.

Infine il sol –gel 4, ha presentato un valore iniziale molto simile al sol – gel 1, ma ha presentato un incremento quasi costante fino a raggiungere circa un valore di attività enzimatica doppio rispetto a quello di partenza.

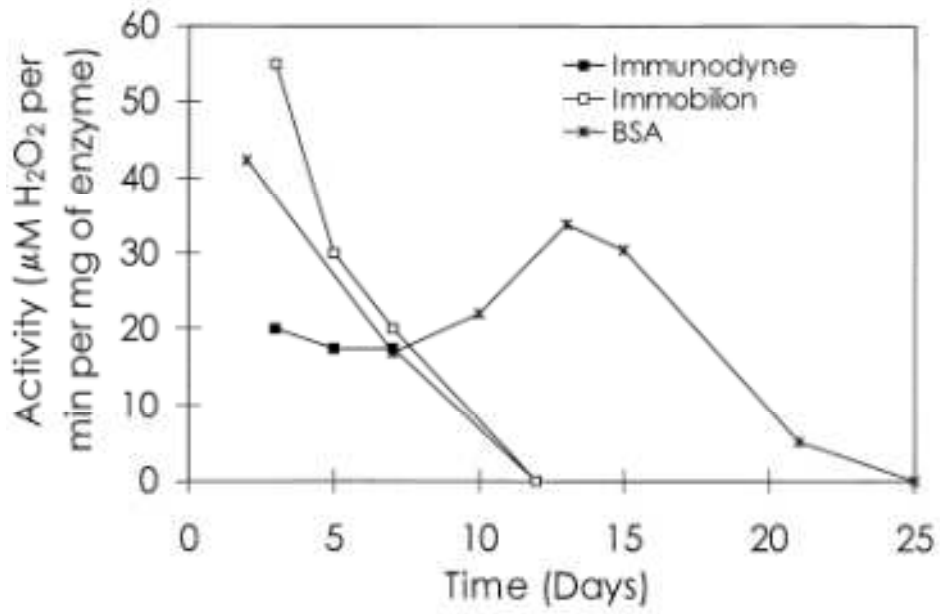


Fig 6.7: comparazione dell'attività e della stabilità del LOD immobilizzato in un gel di BSA, e in membrane di immobilon e immunodina [14]

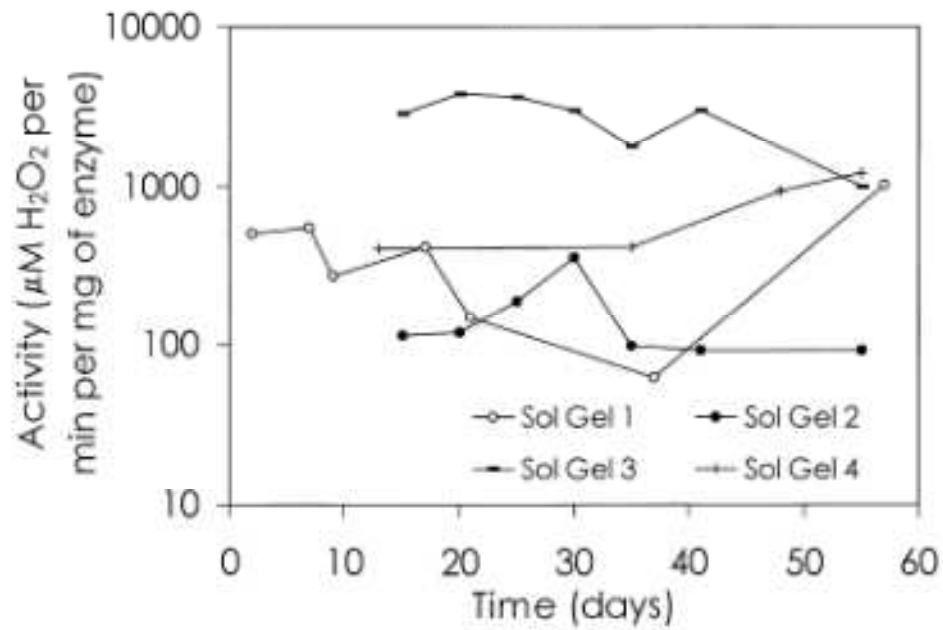


Fig 6.8: Comparazione dell'attività e della stabilità del LOD immobilizzato in quattro matrici sol gel diverse [14]

Considerazioni finali sulla stabilità

Dai pochi esempi portati si è comunque potuto notare come le tecniche di intrappolamento e incapsulamento portino una migliore stabilità a lungo termine dell'enzima, dovuta essenzialmente alla poca interazione dell'enzima con possibili agenti dannosi (cfr Cap. 3). Dei buoni risultati sono stati comunque ottenuti anche tramite cross linking e adsorbimento, mentre è rilevante una disparità di risultati ottenuti con il legame covalente. Basti notare come Palmisano De Benedetto [3] riscontrino una risposta pressoché invariata per più di tre settimane, mentre il legame covalente operato da Lillis Grogan [14] porti ad un annullamento dell'attività dell'enzima nel giro di due settimane. Questo è a riprova del fatto che in generale il metodo di immobilizzazione influenza la stabilità dell'enzima, in funzione però del materiale di supporto che viene utilizzato.

6.5 – Dispositivi FIA, dipendenza dal flow rate

Per analizzare analiti in campioni reali, si seguono generalmente due vie: inserimento diretto del biosensore nel campione, o un approccio indiretto nel quale il biosensore è integrato con un apparato ad iniezione di flusso (FIA). Quest'ultimo possiede però alcuni vantaggi, in particolare quando è equipaggiato con un campionatore a micro dialisi [33] per analisi ex vivo. Infatti, a parte la capacità di eliminare dall'analisi le particelle macroscopiche e quelle ad alto peso molecolare, tale equipaggiamento permette di modificare la quantità del campione e il fattore di diluizione del campione, ovvero permette di determinare il rapporto tra soluzione e campione in soluzione, variando la velocità del flusso (flow rate) iniettato. Questo permette di aumentare notevolmente il range di linearità, com'è stato studiato in [33] e com'è possibile verificare in figura 6.9. Come si può vedere l'uso del dispositivo aumenta notevolmente il range lineare della risposta amperometrica fino a circa 10 mM che è un valore più che accettabile per la maggior parte delle applicazioni.

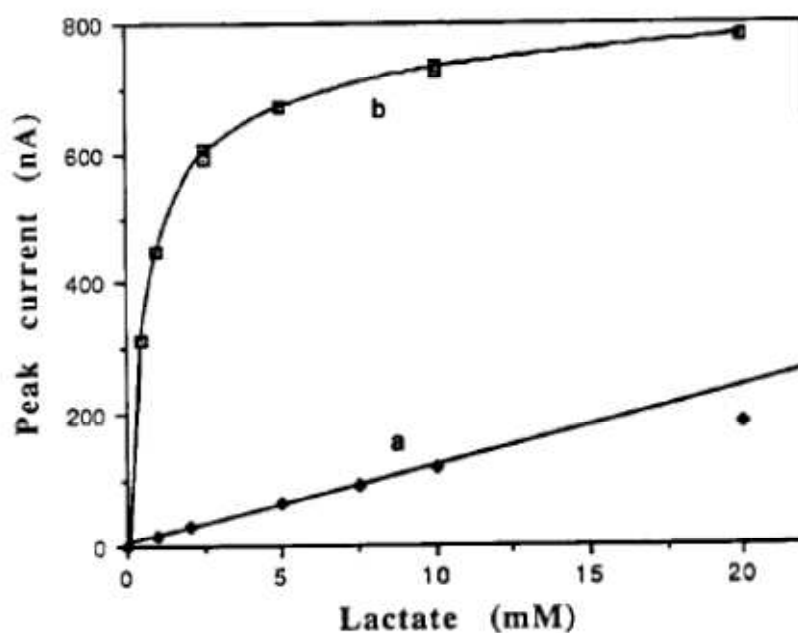


Fig 6.9: Curve di calibrazione del lattato ottenute con (curva a) e senza (curva b) il dispositivo a microdialisi. Flow rate: 0.1 ml/min, volume iniettato 110 μ l [33].

Risulta quindi evidente come il flow rate possa influenzare la risposta amperometrica del biosensore, di conseguenza, per calarsi in condizioni operative adeguate, è necessario ottimizzare il flow rate. Generalmente aumentando il flow rate, la risposta amperometrica diminuisce, ma diminuire troppo il flow rate ha pesanti ripercussioni sul tempo di risposta del sensore [12].

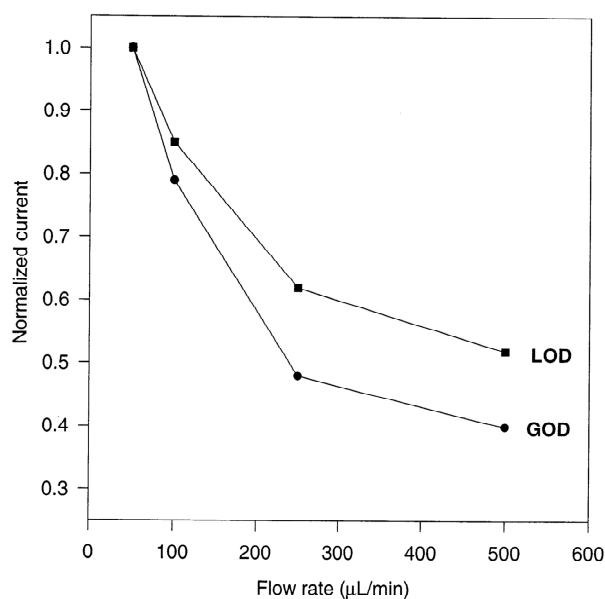


Fig 6.10: Dipendenza dei picchi di corrente normalizzata dal flow rate per un biosensore duale con GOD e LOD. Volume iniettato 110 μ l, concentrazione di glucosio e lattato 1mM [12]

Come la risposta, anche la recovery¹⁶ cala con l'aumentare del flow rate e questo influenza negativamente la sensibilità del biosensore. Tuttavia in taluni casi si abbassa volontariamente la recovery in modo tale da ottenere un maggiore range di linearità della risposta [13].

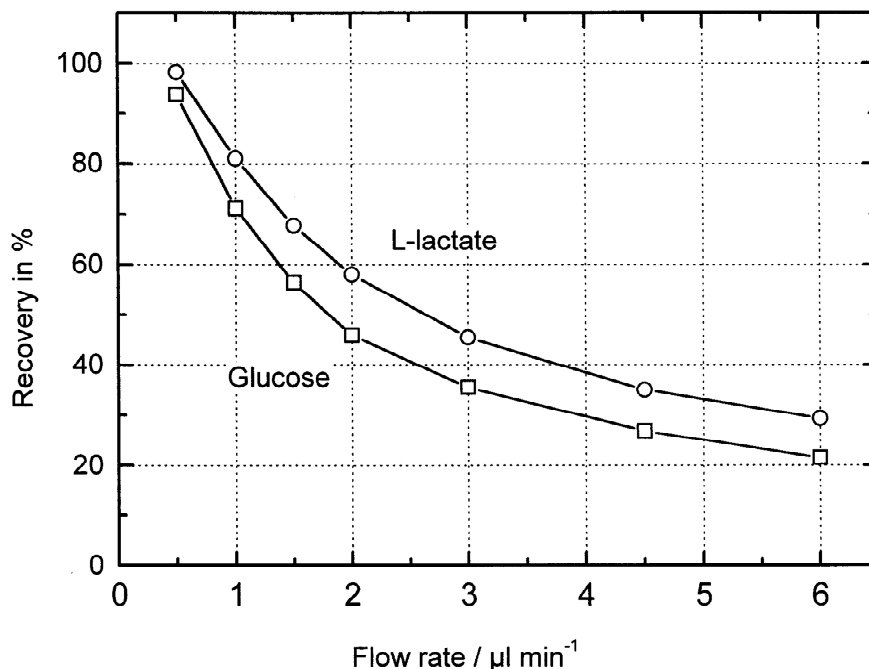


Fig 6.11: Effetto del flow rate sulla recovery della sonda di micro dialisi. Le analisi sono state fatte con una soluzione contenente 1.5 mM di lattato [13]

È interessante notare come ci siano variazioni dipendenti dal flow rate nella risposta del sensore anche con altri metodi di rilevazione come ad esempio l'elettroluminescenza [1], come viene mostrato in figura 6.12.

¹⁶ Recovery: si definisce recovery relativa il rapporto c/c_0 , fra la concentrazione c di soluzione dializzata dal dispositivo di micro-dialisi e la concentrazione c_0 di una particolare specie (come ad esempio L-lattato) nella soluzione del campione. La recovery relativa è generalmente espressa in percentuale. I valori di recovery vengono determinati come funzione del flow rate in questo modo: dapprima si inietta il flusso con la soluzione sul sensore senza il dispositivo di micro-dialisi e si misurano le correnti di risposta, dopo di che si equipaggia il sistema con il dispositivo di micro-dialisi e si rimisurano le correnti di risposta. I valori di recovery si ottengono facendo il rapporto di queste correnti.

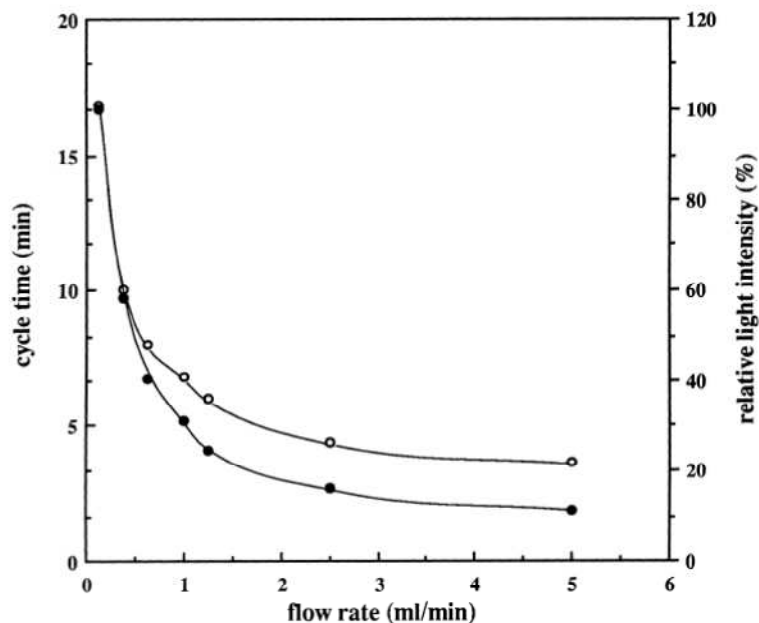


Fig 6.12: Effetto del flow rate sulla risposta del sensore per glucosio. Per l'analisi è stata iniettata una soluzione contenente 6 nM di glucosio [1].

6.6 – Descrizione di un dispositivo con caratteristiche peculiari

Si è presentata ora lo studio effettuato da [8] su un dispositivo con metodo di rilevazione amperometrica del lattato. Tale dispositivo è stato costruito immobilizzando lattato ossidasi (LOD) e un mediatore redox in un elettrodo di pasta di carbonio. Le condizioni per la risposta ottima del sensore sono state determinate variando la composizione della pasta di carbonio.

I reagenti usati per l'analisi sono stati: l'enzima lattato ossidasi (ottenuto da specie di *Pediococcus* (cfr Cap. 2)), i mediatori redox ferrocene (FcH) e idrossimetilferrocene (FcCH₂OH), i mediatori polimerici per l'immobilizzazione glutaraldeide e albumina di siero bovino (BSA). Le soluzioni analitiche sono state preparate con tamponi fosfato 0.1 M, pH 8.9.

L'elettrodo modificato di pasta di carbonio è stato ottenuto dissolvendo il LOD in una soluzione di BSA con acqua distillata, cui successivamente è stata aggiunta la glutaraldeide per l'intrappolamento dell'enzima e infine, dopo aver mescolato e aggiunto la polvere di carbonio, la soluzione è stata fatta seccare. Infine la polvere enzimatica

secca è stata mescolata con olio di paraffina contenente ferrocene o idrossimetilferrocene (HMFC) dissolti, ottenendo la pasta carboniosa enzimatica.

L'elettrodo di lavoro è un tubo isolante riempito con l'impasto carbonioso modificato. Il contatto elettrico fra l'impasto e gli strumenti di misura è assicurato da un pistone di metallo. Per le misurazioni è stato fornito un potenziale di 700 mV tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento in platino, a temperatura ambiente.

Risultati

È stata esaminata la risposta amperometrica del sensore, in termini di range di linearità, in tre casi:

1. Al variare del quantitativo di LOD immobilizzato, mantenendo costante la percentuale di FcH (0.1%);
2. Al variare della percentuale del FcH, mantenendo costante la LOD;
3. Comparando i dati ottenuti immobilizzando FcH e HMFC.

Dalla prima analisi si è notato che se l'attività enzimatica è inferiore a 12U per mg di impasto, la risposta elettrodica è limitata dal quantitativo di enzima troppo basso, mentre per concentrazioni maggiori la sensibilità e il range di linearità ne diventano indipendenti (fig 6.13).

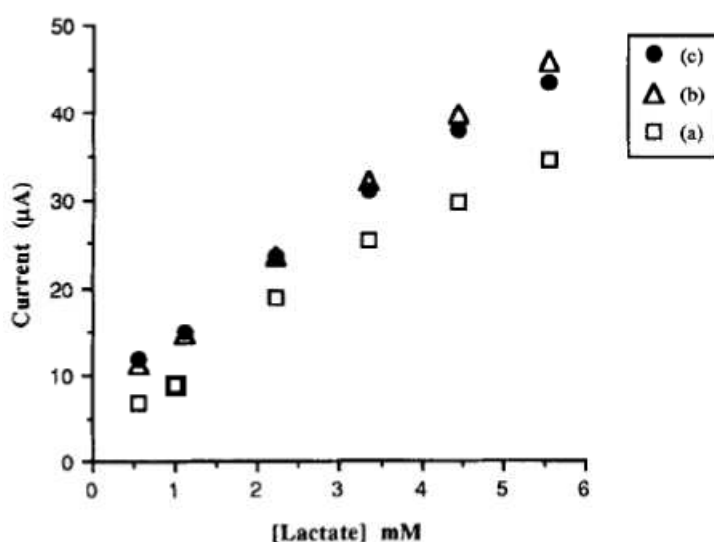


Fig. 6.13: Risposta amperometrica relativa alla concentrazione di lattato, al variare del LOD immobilizzato. Elettrodo modificato con 0.1% di FcH e 7.8 (a), 12 (b), 14 (c) U di LOD per mg di impasto.

Nella seconda analisi si è fatta variare la percentuale di FcH, mantenendo il LOD a 7.8 U/mg, al fine di notare eventuali miglioramenti nella risposta con un quantitativo di LOD immobilizzato inferiore a quello ottimale. Si è notato che con l'aumentare del FcH, aumenta anche il range lineare. Basti notare infatti che con FcH 0.1%, la risposta è lineare fino a 3.6 mM di lattato, mentre per FcH 0.3% la risposta rimane lineare fino a 4.7 mM. Tuttavia il miglioramento del range lineare va a discapito del limite di rilevabilità, come si nota in figura fig 6.14.

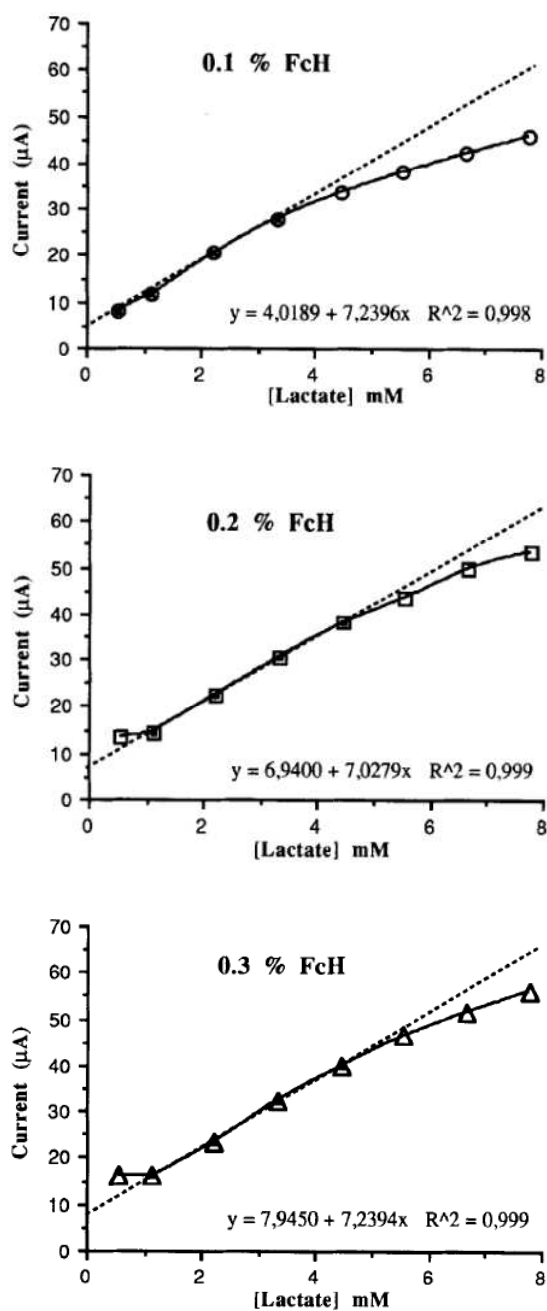


Fig. 6.14 : Variazioni della risposta amperometrica al variare della percentuale di FcH, con 7.8 U/mg di LOD immobilizzato.

Infine nell'ultima analisi sono stati messi a confronto un elettrodo modificato con FcH e uno modificato con HMFC (ritenuto essere un buon mediatore tra LOD e substrato in soluzione, grazie alla sua solubilità sia in soluzioni acquose che in liquidi più densi). Si è notato che a parità di quantità di enzima immobilizzato e percentuale di mediatore, l'elettrodo con HMFC risponde in maniera migliore rispetto a quello con FcH, sotto ogni aspetto (fig 6.15).

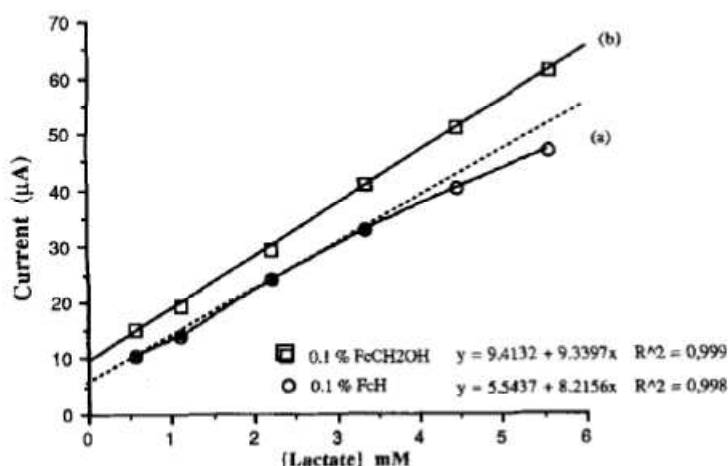


Fig. 6.15: Risposta amperometrica per un elettrodo con 0.1% di FcH (a) e un elettrodo con 0.1% di HMFC (b), entrambi con 12 U/mg LOD immobilizzato.

Infatti le costanti di Michaelis – Menten trovate per i due elettrodi modificati sono state:

- 22.6 mM per l'elettrodo con FcH 0.1%
- 95.8 mM per l'elettrodo con HMFC 0.1%

Questi valori riflettono i range di linearità, piuttosto estesi, ottenuti:

- Fino a circa 3.5 mM per l'elettrodo con FcH 0.1%
- Fino a circa 5.5 mM per l'elettrodo con HMFC 0.1%

e si è anche potuto notare un miglioramento della sensibilità:

- 8.19 µA/mM per l'elettrodo con FcH 0.1%
- 9.31 µA/mM per l'elettrodo con HMFC 0.1% (vedi fig 6.15)

Data la bontà dei dati ottenuti utilizzando elettrodi con HMFC, è stata valutata anche la stabilità dell'elettrodo, misurando empiricamente (tramite via grafica) la sensibilità in diversi momenti. È stato notato che per circa 2 mesi la sensibilità è rimasta pressoché costante, per poi calare in maniera molto limitata sulla distanza dei 5 mesi.

Bibliografia

1. C. A. Marquette, L.J. Blum, Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples, *Analytica Chimica Acta*, 381, 1 – 10, 1999
2. M. M. Rahman, Fabrication of L-lactate biosensor based on redox species mediated lactate oxidase using micro-device, *International Journal of Biological & Medical Research* 1(3), 09-14, 2010
3. F. Palmisano, G. E. De Benedetto, C. G. Zambonin, Lactate Amperometric Biosensor Based on an Electrosynthesized Bilayer Film with Covalently Immobilized Enzyme, *Analyst* Vol. 122, 365–369, 1997
4. B. K. Jena, C. R. Rai, Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Gold Nanoparticles, *Electroanalysis* 19, No. 7-8, 816 – 822, 2007
5. Steinkuhl, R., Dumschat, C., Sundermeier, C., Hinkers, H., Renneberg, R., Cammann, K., Knoll, *Micromachined Glucose Sensor*, *Biosensors and Bioelectronics* 11, 187–190, 1996
6. D. Baronas, F. Ivanauskas, R. Baronas, Mechanisms controlling the sensitivity of amperometric biosensors in flow injection analysis systems, *Journal of Mathematical Chemistry*, 49, 1521-1534, 2011
7. B. K. Jena, C. R. Rai, Electrochemical Biosensor Based on Integrated Assembly of Dehydrogenase Enzymes and Gold Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 78, 6332-6339, 2006
8. M. Buojtita, M. Chapleau, N. El Murr, Enzymatic Electrode for the Determination of L-Lactate, *Electroanalysis* 8, No. 5, 1996
9. M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso, Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 25, 2038 – 2044, 2010
10. A. Chaubey, K.K. Pande, V.S. Singh, B.D. Malhotra, Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films, *Analytica Chimica Acta* 407, 97–103, 2000
11. B. Ballarin, I. Carpani, L. Guadagnini, A. Mignani, E. Scavetta, D. Tonelli, Sviluppo di un biosensore amperometrico per la determinazione dell'acido lattico, Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica, Università di Bologna, 2008

12. F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P.G. Zambonin, Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films, *Biosensors & Bioelectronics* 15, 531–539, 2000
13. J. Perdomo, H. Hinkers, C. Sundermeier, W. Seifert, O. Martinez Morell, M. Knoll, Miniaturized real-time monitoring system for L-lactate and glucose using microfabricated multi-enzyme sensors, *Biosensors & Bioelectronics* 15, 515–522, 2000
14. B. Lillis, C. Grogan, H. Berney, W.A. Lane, Investigation into immobilisation of lactate oxidase to improve stability, *Sensors and Actuators B* 68, 109 – 114, 2000
15. Parra, E. Casero, L. Vazquez, F. Pariente, E. Lorenzo, Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces, *Analytica Chimica Acta* 555, 308 – 315, 2006
16. J. Perdomo, C. Sundermeier, H. Hinkers, O. Martinez Morell, W. Seifert, M. Knoll, Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose, *Biosensors & Bioelectronics* 14, 27 – 32, 1999
17. H. Lee, W. Wu, J. Lin, Y. Chin, K. Lee, T. Sun, Evolution of the TiO₂ Membrane on ITO PET Substrate Applied to a Lactate Biosensor using a Potentiometric Differential Readout Circuit, *IEEE SENSORS Conference*, 2008
18. N.G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann, G.C. Chemnitz, Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis, *Sensors and Actuators B* 67, 134 – 141, 2000
19. G. Jobst, I. Moser, M. Varahram, P. Svasek, E. Aschauer, Z. Trajanoski, P. Wach, P. Kotanko, F. Skrabal, G. Urban, Thin-Film Microbiosensors for Glucose-Lactate Monitoring, *Analytical Chemistry* 68, 3173 – 3179, 1996
20. R. Hintsche, Ch. Kruse, A. Uhlig, M. Paeschke, T. Lisec, U. Schnakenberg, B. Wagner, Chemical microsensor systems for medical applications in catheters, *Sensors and Actuators B* 26-27, 471 – 473, 1995
21. A. Rub, A. Rahman, G. Justin, A. Guiseppi-Elie, Towards an implantable biochip for glucose and lactate monitoring using microdisc electrode arrays (MDEAs), *Biomed Microdevices* 11, 75 – 85, 2009

22. E. Dempsey, D. Diamond, M. R. Smyth, G. Urban, G. Jobst, I. Moser, E. M. J. Verpoorte, A. Manz, H. M. Widmer, K. Rabenstein, R. Freaney, Design and development of a miniaturised total chemical analysis system for on-line lactate and glucose monitoring in biological samples, *Analytica Chimica Acta* 346, 341-349, 1997
23. F. Palmisano, M. Quinto, R. Rizzi, P. G. Zambonin, Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor, *Analyst*, 126, 866–870, 2001
24. M. Wu, H. Cai, X. Xu, J. P. G. Urban, Z. Cui, Z. Cui, A SU-8/PDMS Hybrid Microfluidic Device with Integrated Optical Fibers for Online Monitoring of Lactate, *Biomedical Microdevices* 7, 4, 323 – 329, 2005
25. D. Pfeiffer, B. Moller, N. Klimes, J. Szeponik, Amperometric lactate oxidase catheter for real-time lactate monitoring based on thin film technology, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 12. No. 6, pp. 539-550, 1997
26. J. Huang, Z. Song, J. Li, Y. Yang, H. Shi, B. Wu, J. Anzai, T. Osa, Q. Chen, A highly-sensitive L-lactate biosensor based on sol-gel film combined with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) modified electrode, *Materials Science and Engineering C* 27, 29 – 34, 2007
27. A.L. Hart, H. Cox, D. Janssen, Stabilization of lactate oxidase in screen-printed enzyme electrodes, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 11, No. 8, pp. 833-837, 1996
28. M. R. Romero, F. Garay, A. M. Baruzzi, Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes, *Sensors and Actuators B* 131, 590–595, 2008
29. S. Suman, R. Singhal, Amit L. Sharma, B.D. Malthotra, C.S. Pundir, Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase, *Sensors and Actuators B* 107, 768–772, 2005
30. X. Cui, C. M. Li, J. Zang, S. Yu, Highly sensitive lactate biosensor by engineering chitosan/PVI-Os/CNT/LOD network nanocomposite, *Biosensors and Bioelectronics* 22, 3288–3292, 2007
31. R. Garjonte, Y. Yigzaw, R. Meskys, A. Malinauskas, L. Gordon, Prussian Blue and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid, *Sensors and Actuators B* 79, 33-38, 2001

32. M. Kyrolainen, H. Håkanson, B. Mattiasson, P. Vadgama, Minimal-Fouling enzyme electrode for continuous flow measurement of whole blood lactate, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 12. No. 11, pp. 1073–1081, 1997
33. Palmisano, F., Centonze, D., Quinto, M., Zambonin, A microdialysis fibre based sampler for flow injection analysis: determination of L-lactate in biofluids by an electrochemically synthesised bilayer membrane based biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 11, 419–425, 1996

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questa tesi era quello di descrivere e caratterizzare il funzionamento di un biosensore a rilevazione amperometrica per il lattato. Per far ciò si è voluto presentare nel capitolo uno i principi di elettrochimica su cui si basa un sensore; si è partiti dalla presentazione di un'interfaccia con i vari passaggi che hanno portato a costruire un modello di lavoro valido, che fosse affrontabile analiticamente. Si è passati successivamente alla descrizione dei fenomeni che caratterizzano l'interfaccia di un sistema elettrodo – elettrolita, affrontati in taluni momenti anche molto rigorosamente dal punto di vista matematico, e si è concluso presentando i conduttori di interesse ai fini della tesi.

Nel capitolo due si è introdotto la parte “bio” del sensore, ovvero gli enzimi e il lattato, e di conseguenza l'acido lattico. È stata fatta un overview sugli enzimi e sulla cinetica che caratterizza una reazione enzimatica così da poter dare delle basi per comprendere al meglio i fenomeni che avvengono all'elettrodo e i dati che possono essere recepiti dal sensore. Successivamente è stato presentato il lattato, partendo dalla creazione dell'acido lattico dal processo di glicolisi anaerobica, fino ad arrivare alle implicazioni diagnostiche che può avere un eccesso di lattato ematico.

Il capitolo tre ha fornito una presentazione teorica di cosa sia un sensore e da quali parametri viene caratterizzato. Successivamente si è brevemente descritto quali siano i tipi di biosensori in base al metodo di trasduzione, soffermandosi sui biosensori amperometrici e sulla loro classificazione in generazioni basata sul meccanismo di trasporto elettronico che si verifica fra sito attivo e soluzione bulk. Si è concluso il capitolo presentando da un punto di vista teorico le varie tecniche di immobilizzazione che sono poi state studiate e comparate nel capitolo sei.

Nei capitoli quattro e cinque sono state descritte le tecniche di misurazione utilizzate per caratterizzare l'elettrodo di un biosensore (Ciclovoltammetria (CVM) e Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica (EIS)) e la tecnica più diffusa per registrare la risposta amperometrica del sensore, ovvero la cronoamperometria.

Le voltammetrie (CVM e cronoamperometria) sono state presentate nel capitolo quattro; è stata fatta una descrizione generale delle tecniche di misura e delle risposte che si registrano, soffermandosi al termine del capitolo sulla presentazione delle misure

effettuate su microelettrodi, dal momento che sarebbero stati studiati nel capitolo finale di questa tesi.

Nel capitolo cinque è stata descritta la spettroscopia di impedenza, partendo dai concetti base, passando per le ipotesi di lavoro e concludendo con una descrizione dei modelli interpretativi dei dati ottenuti.

Il capitolo sei rappresenta la conferma della teoria spiegata nei capitoli precedenti; si è infatti fatto uno studio sullo stato dell'arte dei biosensori analizzando i dati ottenuti dagli studi effettuati su 29 dispositivi. È stato fatto un confronto su alcuni parametri salienti: il limite di rivelazione, la stabilità del sensore nel tempo, il potenziale applicato all'elettrodo, la sensibilità e la dipendenza dal flow rate dei dispositivi per l'analisi in flusso. Tramite questo si è cercato di verificare con i dati quanto era stato teorizzato precedentemente, utilizzando le conoscenze maturate per spiegare eventuali incongruenze o per sottolineare la bontà delle considerazioni fatte. Sulla base di questo si è giunti a concludere che per ottenere un biosensore si deve fare un compromesso che soddisfi nel miglior modo possibile tutti i parametri analizzati. Per sottolineare questo si è deciso di descrivere più ampiamente un dispositivo in particolare che si ritiene soddisfare adeguatamente tali parametri.

APPENDICE A

TABELLA RIASSUNTIVA DEI DISPOSITIVI STUDIATI

Nella pagina seguente vengono riassunti tutti i dispositivi studiati nel corso di questa tesi.

Vengono caratterizzati per tipologia di misurazione, enzima utilizzato per la rilevazione, tecnologia dell'elettrodo, stabilità, potenziale applicato all'elettrodo, costante di Michaelis – Menten (cfr Cap 2), limite di rilevazione, range lineare, sensibilità e presenza di dispositivi FIA.

Le referenze sono associate alla bibliografia del capitolo 6.

