



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

Corso di Laurea in
INGEGNERIA BIOMEDICA

Elaborato di prova finale
SENSORI INDOSSABILI PER IL
MONITORAGGIO DI LATTATO NEL SUDORE

Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello

Laureanda: Berto Aurora

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Data di Laurea 19/07/2023

SOMMARIO

I recenti sviluppi tecnologici nell'ambito di elettronica stampata, miniaturizzazione di circuiti e biomateriali hanno favorito l'accelerazione nell'integrazione di sensoristica in dispositivi indossabili finalizzati al monitoraggio real-time semplice ed efficace dello stato di salute del soggetto che lo indossa. Nello specifico, tra le grandezze oggetto di monitoraggio dei dispositivi indossabili, la composizione del sudore è di importanza fondamentale, grazie alla ricchezza delle informazioni ricavabili dalla variazione della sua composizione chimica in corrispondenza di eventi pato-fisiologici. Tra i numerosi biomarcatori, il lattato ricopre una rilevanza strategica in quanto, essendo coinvolto nel metabolismo anaerobico del glucosio, fornisce informazioni sullo stato di salute legato all'acidosi lattica.

Questo elaborato si propone di presentare una panoramica dei dispositivi indossabili finalizzati all'analisi del lattato presente nel sudore, e alla loro integrazione con sistemi di microfluidica ed elettronica portatile per consentire da un lato la corretta estrazione e distribuzione del sudore, e dall'altro il condizionamento elettronico e la trasmissione del segnale.

Ci si vuole focalizzare inizialmente sulle componenti strutturali e circuitali che compongono il sensore, esponendo numerose soluzioni alternative, commentate in modo da fornire un quadro completo e chiaro su vantaggi e svantaggi di ognuna di esse; e vengono poi espone le modalità di estrazione e di analisi del sudore. Successivamente verrà presentata una breve caratterizzazione di uno di questi dispositivi svolta in laboratorio, evidenziando come sia possibile realizzare una curva di calibrazione disponendo di un sensore a tre elettrodi e varie concentrazioni di perossido d'idrogeno. Come ultimo punto, si vogliono trarre le conclusioni sugli studi finora svolti sull'argomento, esponendo alcuni dei risultati che si sono finora ottenuti, e focalizzandosi alla fine su quali sono le principali criticità che interferiscono con la qualità e l'attendibilità delle misurazioni svolte con lo strumento attualmente sviluppato.

ABSTRACT

Recent technological developments in printed electronics, circuit miniaturization and biomaterials have helped accelerate the integration of sensors in wearable devices, which are functionalized to real time and easy monitoring of the wellbeing state of the subject wearing it. In particular, one of the most important parameters that can be measured with these devices is sweat, thanks to the richness of information that can be collected analyzing its composition in correspondence to physiological and pathological events. Among the many biomarkers contained in sweat, lactate covers a fundamental role, because it takes part into glucose anaerobic metabolism, and gives information on the state of health related to lactic acidosis.

This paper's aim is to present an overview of the wearable devices already developed. Then we will explain how these devices can reach information from sweat through lactate sensors. After that, we will see that they can be integrated into systems that use microfluidics and electronics patterns, that allows the correct extraction and distribution of sweat, and electronic conditioning and signal transmission.

Initially, we want to focus on the structural and circuital components that constitute the sensor, exposing different materials and designs, commented in order to provide a complete and clear overview of the advantages and the disadvantages of each of them. Then, ways of extraction and analysis of sweat will be exposed. Next, we will briefly show a sensor characterization carried out in the laboratory, highlighting how it is possible to realize a calibration curve using a three-electrode sensor and different concentration of hydrogen peroxide. In the end of the paper, we will summarize the results of the studies carried out so far on the subject, and then we will focus on the main problematics that still have to be overcome to guarantee the quality and reliability of the measurements done with the currently developed device.

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1. Sensori indossabili per l'analisi di lattato nel sudore	3
1.1.1. Lattato	5
1.1.2. Reazioni notevoli	5
2. PROGETTAZIONE	7
2.1. Supporto strutturale	7
2.1.1. Design	7
2.1.2. Materiali impiegati	8
2.2. Parte sensibile	10
2.2.1. Elettrodo di lavoro	10
2.2.2. Elettrodo ausiliario	11
2.2.3. Elettrodo di riferimento	12
2.2.4. Tecniche di fabbricazione	12
2.2.5. Configurazioni	13
2.3. Parte circuitale	14
2.3.1. Componenti elettroniche	14
2.3.2. Supporto energetico	14
3. FUNZIONAMENTO	16
3.1. Rilevazione ed estrazione del sudore	16
3.1.1. Ionoforesi	16
3.1.2. Idrogel	17
3.2. Meccanismi di analisi del sudore	19
3.2.1. Analisi chimica	19
3.2.2. Analisi fisica	21
3.3. Elaborazione del segnale	25
3.3.1. Calibrazione del sensore	25
3.3.2. Integrità dei dati	25
3.3.3. Alcuni risultati notevoli	26
4. ESPERIENZA DI LABORATORIO	29
5. CONCLUSIONI	41
BIBLIOGRAFIA	42

ELENCO FIGURE

Figura 1: Ghiandole sudoripare e ripartizione degli analiti.[4].....	3
Figura 2: Trasferimento di elettroni nella reazione del lattato con LOx [5].	6
Figura 3: Trasferimento di elettroni nella reazione del lattato con LDH [5].	6
Figura 4: Configurazione a tre elettrodi (a) con elettrodo di lavoro, ausiliario e di riferimento. Configurazione a due elettrodi (b) con elettrodo di lavoro e di riferimento [2].	13
Figura 5: Ionoforesi e ionoforesi inversa [4].	17
Figura 6: Schema di un patch indossabile, non alimentato e non invasivo per la rilevazione del sudore sulla pelle, comprendente un disco di idrogel e un canale microfluidico cartaceo. Sotto, le tre fasi successive di osmosi, diffusione capillare ed evaporazione [7,8].	18
Figura 7: Schema illustrativo di un sistema per la misurazione della pressione secretoria delle ghiandole sudoripare alla superficie della pelle con 12 valvole capillari a scoppio: (a, b, d) Schema integrativo del dispositivo, e sua vista esplosa; (c) vista prospettiva di una singola valvola integrata sulla pelle; (e, f) illustrazione dall'alto dei canali microfluidici parzialmente riempiti di acqua nel caso di una valvola non ancora scoppiata (e) e scoppiata (f).[13]	22
Figura 8: Schemi trasversali del trasporto del lattato usando come materiali di pompaggio due idrogel: (a, d) glucosio 4M, (b, e) PBS, e (c, f) uno strato in PDMS, nelle varie fasi dell'esperimento [7].	27
Figura 9: Curve ottenute dalla voltammetria ciclica applicata ai due sensori: quello in carbonio individuato dalla linea rossa, e quello in carbonio funzionalizzato con il blu di Prussia individuato invece dalla curva blu. I punti evidenziati riportano i rispettivi potenziali di riduzione (RED) e ossidazione (OX).	30
Figura 10: Ultimo ciclo delle voltammetrie cicliche svolte sui due sensori: a sinistra le curve riguardanti il sensore in carbonio, a destra quelle del sensore funzionalizzato con blu di Prussia. A ciascuna curva corrisponde una specifica concentrazione di perossido, come illustrato dalla legenda.	32
Figura 11: In rosso i valori di corrente della Tabella 5, in rosso tratteggiato la retta di interpolazione ottenuta per regressione lineare dai punti evidenziati; in blu le rette di interpolazione ottenute negli intervalli 2-20mM e 50-100mM.	34
Figura 12: Curve di cronoamperometria rilevate per i due sensori forniti di un potenziale in input costante e pari a 0.3V. L'asse delle correnti misura valori negativi, di conseguenza le correnti dovute alle concentrazioni maggiori sono quelle di valore minore (con segno) e viceversa.	36
Figura 13: Rette di regressione lineare, in blu per concentrazioni tra 0 e 10mM, in rosso per concentrazioni maggiori di 10mM, ottenuta dall'interpolazione dei valori di corrente medi misurati per entrambi i sensori negli ultimi 5 secondi di acquisizione (50 campioni) ottenuti tramite cronoamperometria usando come potenziale costante 0.3V	37

ELENCO TABELLE

Tabella 1: Analiti presenti nel sudore e corrispettivi concentrazioni, elemento di riferimento, e tecnica di rilevazione.....	4
Tabella 2: Concentrazioni di lattato medie ricavate dall'esperimento ognuna riguardante una specifica condizione di sforzo fisico.....	28
Tabella 3: Valori di potenziale e corrente dei due sensori. Al potenziale di riduzione elettrochimica corrisponde una corrente catodica, mentre al potenziale di ossidazione corrisponde una corrente anodica. Il segno della corrente dipende dal segno dell'impedenza dello strumento.....	30
Tabella 4: Composizione chimica della soluzione di perossido d'idrogeno utilizzata per ottenere le adeguate concentrazioni.....	31
Tabella 5: Correnti di picco ottenute graficamente dall'osservazione delle curve di voltammetria ciclica per i due sensori, al variare della concentrazione di perossido considerata.....	33
Tabella 6: Correnti medie ottenute dagli ultimi 50 campioni acquisiti durante la misurazione, corrispondenti agli ultimi 5 secondi di acquisizione.....	37
Tabella 7: Coefficienti angolari delle rette di interpolazione per i due sensori.....	38

1. INTRODUZIONE

L'elettrochimica è “un potente meccanismo di rilevazione per collezionare e riconoscere eventi biologici e convertire le informazioni di specifici analiti, come enzimi, proteine, anticorpi e acidi nucleici, in segnali elettrochimici misurabili” [2].

IUPAC definisce un biosensore come “un sistema autonomo integrato che provvede alla rilevazione di informazioni (quantitative o semi-quantitative) di un analita, usando una combinazione di elementi di trasduzione e di riconoscimento biologico” [3]. I requisiti che questi strumenti devono soddisfare sono:

- **Selettività**, l'abilità di un sensore di rilevare principalmente l'analita d'interesse in presenza di altre possibili specie che potrebbero interferire;
- **Sensibilità**, la misura di quanto accuratamente il segnale del sensore cambia in risposta a un cambiamento delle concentrazioni di analita;
- **Basso limite di rilevazione**, che indica la più bassa concentrazione che un sensore può rilevare e deriva dalla definizione di rapporto segnale-rumore (SNR). Il rumore può crescere a causa dell'interferenza di altri analiti, della deviazione dei sensori, o della variazione locale di concentrazioni dovute ad altre possibili cause;
- **Stabilità**, che si riferisce all'abilità del sensore di mantenere il proprio segnale nel tempo senza attenuazioni dovute a spostamenti o degradazione [4].

Altre caratteristiche fondamentali dei biosensori affinché essi possano essere impiegati in dispositivi indossabili al di fuori del laboratorio di ricerca devono riguardare anche: facilità di utilizzo, basso costo economico, portabilità e leggerezza per evitare ingombri o disagi nell'impiego. In generale, si compongono di un recettore, che selettivamente riconosce l'analita interessato, e un trasduttore, che converte il segnale biochimico in un segnale misurabile quantificando i cambiamenti fisico-chimici in confronto a elementi biologici e analiti di riferimento [3].

Questo elaborato pone l'attenzione sui dispositivi di monitoraggio autonomo di suddetti analiti, ossia sensori indossabili, realizzati con forme e materiali che gli conferiscano le caratteristiche di elasticità e adattabilità alle forme umane; in particolare si concentra su sensori indossabili per il monitoraggio dello stato di salute utilizzando le informazioni provenienti dall'analisi del sudore; focalizzandosi sul loro funzionamento, sulle informazioni da essi fornite e sui prospetti futuri per la progettazione di sensori effettivamente utilizzabili.

1.1. SENSORI INDOSSABILI PER L'ANALISI DI LATTATO NEL SUDORE

Il sudore è un fluido biologico che si può collezionare con tecniche non invasive, e inoltre contiene numerosi componenti chimici ed informazioni che possono essere utilizzati per il monitoraggio dello stato di salute generale del paziente, comprendente anche livello di stress, alimentazione ed esercizio fisico [4].

Nonostante anche altri fluidi corporei, come urina, saliva, lacrime, e liquido interstiziale, possano essere collezionati facilmente tramite tecniche non dolorose e non invasive, le loro applicazioni pratiche sono sostanzialmente limitate in molti aspetti, soprattutto per quanto riguarda igiene e privacy, e nel caso delle lacrime anche per il fatto che il volume di fluido, limitato dallo spazio oculare, è insufficiente per avere dati soddisfacenti.

Al contrario, la sudorazione, che non è altro che un processo fisiologico regolato dal sistema nervoso simpatico, gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi sia chimica che termica del corpo; inoltre, i dati sulla composizione chimica e le informazioni fisiche, ricavabili facilmente dall'analisi del sudore, riflettono lo stato di salute umano [1]. Al fine di utilizzare metodi di rilevazione real-time per il monitoraggio dello stato di salute di chi in questione, è di fondamentale importanza comprendere i meccanismi di ripartizione degli analiti nel sudore. La porzione di sudore maggiormente accessibile proviene da ghiandole eccrine composte di un bulbo secretorio, dove viene prodotto il sudore, e un condotto dermico che lo conduce fino alla superficie della pelle.

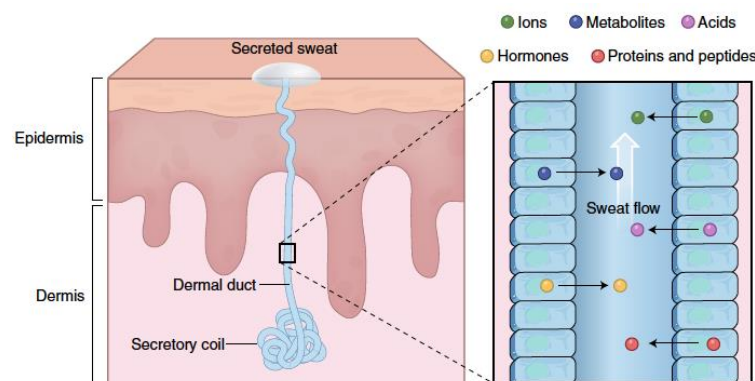


Figura 1: Ghiandole sudoripare e ripartizione degli analiti. Le ghiandole sudoripare sono composte di un bulbo secretorio dove il sudore viene inizialmente generato e un condotto dermico che fa confluire il sudore attraverso gli strati epiteliali sulla superficie della pelle.[4]

Le specie di ioni più abbondanti sono Na^+ e Cl^- , responsabili della produzione del sudore: essi infatti vengono trasportati dal sangue fino ai bulbi secretori per creare una differenza di osmolarità, che forza il passaggio dell'acqua nelle ghiandole sudoripare, mentre gli ioni Na^+ e

Cl⁻ vengono riassorbiti dalle pareti dei condotti dermali [4]. Il tasso di riassorbimento è pressoché costante e la quantità di ioni coinvolti è proporzionale alla quantità di sudore secreto, ciò a riprova del fatto che la concentrazione di ioni Na⁺ è maggiore durante l'esercizio fisico [12]. Il meccanismo di secrezione e ripartizione degli analiti nel sudore è ancora poco compreso, e varia a seconda della condizione fisica in cui viene analizzato (a riposo o durante l'esercizio fisico, in condizioni di stress o di alte temperature esterne). Di seguito, nella *Tabella 1* vengono riportati tutti gli analiti presenti nel sudore e il metodo tipicamente utilizzato per la loro estrazione; le quantità indicate sono state ottenute previa numerosi esperimenti e rappresentano un range indicativo.

Analita	Concentrazione nel sudore	Elemento di riconoscimento	Modalità di rilevazione
Na ⁺	10-100mM	Ionoforo di Na	Potenziometria
Cl ⁻	10-100mM	Ag-AgCl	
K ⁺	1-18.5mM	Ionoforo di K	
Ca ²⁺	0.41-12.4mM	Ionoforo di Ca	
pH	3-8	polianilina	
NH ⁴⁺	0.1-1mM	Ionoforo d'ammonio	
Glucosio	10-200μM	Glucosio ossidasi	Cronoamperometria
Lattato	5-20mM	Lattato ossidasi	
Etanolo	2.5-22.5mM	Alcol ossidasi	
Acido urico	2-10mM	Carbonio	Voltammetria ciclica
Acido ascorbico	10-50μM	Carbonio	
Zn ²⁺	100-1560 μg/l	Bismuto (Bi)	Voltammetria di strippaggio di onda quadrata
Cd ²⁺	<100μg/l	Bi	
Pb ²⁺	<100μg/l	Bi, Au	
Cu ²⁺	100-1000μg/l	Au	
Hg ⁺	<100μg/l	Au	
Cortisolo	8-140 ng/ml	ZnO, MoS ₂ (solfuro di molibdeno)	Spettroscopia di impedenza elettrochimica

Tabella 1: Analiti presenti nel sudore e corrispettivi concentrazioni, elemento di riferimento, e tecnica di rilevazione.

1.1.1. LATTATO

Il lattato, o acido lattico (LA) è il prodotto finale della degradazione anaerobica del glucosio nei tessuti, ed esiste in due forme speculari: L-lattato e D-lattato. La degradazione del lattato avviene per merito del fegato, che tramite ossidazione lo riconverte in piruvato (PA), che eventualmente può essere a sua volta convertito in glucosio dal ciclo di Cori.

La concentrazione di lattato nel sangue di una persona in salute si aggira attorno ai 0.5-1mM, ma, mentre da un lato è ancora in corso di studio la correlazione tra la concentrazione di lattato nel sangue con quella nel sudore (*vedi paragrafo 3.3.3*); d'altra parte è noto che il lattato situato nel sudore è il risultato del metabolismo energetico delle ghiandole sudoripare, e sotto condizioni anaerobiche un aumento della concentrazione di acido lattico può ridurre la produzione di sudore. I valori di lattato misurati nel sudore umano possono variare fino a un massimo di 20/25mM, e dipendono dalla parte del corpo in cui vengono misurati, da modalità e intensità della stimolazione, dall'ambiente e dalla quantità di sudore rilasciato.

Il controllo continuo dei livelli di lattato è di sostanziale importanza per diagnosticare e valutare lo stato di salute legato all'acidosi lattica [5]. Questo monitoraggio è fondamentale soprattutto per coloro che sono frequentemente sottoposti a situazioni di mancanza di ossigeno, come atleti, personale militare e donne durante la gravidanza, dal momento che critici livelli di lattato nel sudore possono causare una alterazione del pH dei fluidi corporei, con conseguenti effetti dannosi sulla salute umana, come acidosi muscolare, ipossia tissutale, sepsi e ictus cerebrale [8].

1.1.2. REAZIONI NOTEVOLI

Per l'analisi del lattato sono usati principalmente due enzimi: LOx (ossigeno liquido) e LDH (lattato deidrogenasi), che consumano i reagenti elettro-attivi per generare una specie elettro-reattiva che possa essere monitorata per correlare la risposta con le concentrazioni degli analiti. Le reazioni di questi enzimi sono particolarmente favorite dall'utilizzo di nanomateriali a base di carbonio per la fabbricazione di sensori per il lattato (*vedi paragrafo 2.1.2*).

LOx, un enzima rintracciabile anche in differenti fonti batteriche, catalizza l'ossidazione aerobica del lattato in piruvato, rilasciando perossido d'idrogeno (H_2O_2); viene poi ossidato sulla superficie dell'elettrodo, ripristinando la precedente concentrazione di ossigeno e fornendo una risposta proporzionale. Questo processo è riassunto nelle due reazioni sottostanti:

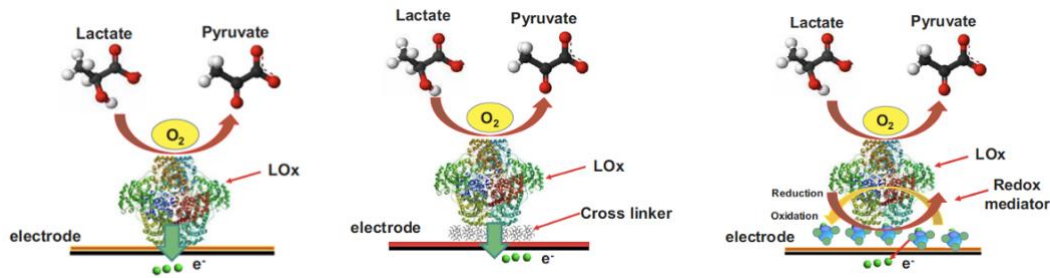
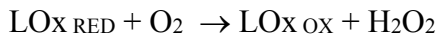
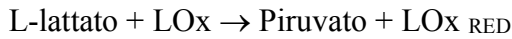


Figura 2: Trasferimento di elettroni nella reazione del lattato con LOx: nella prima figura diretto, nella seconda figura diretto con cross-linker, nella terza mediato con un redox mediator [5].

LDH, invece, gioca un ruolo importante nella respirazione cellulare, convertendo il glucosio in adenosintrifosfato (ATP). È un enzima che catalizza il lattato a piruvato grazie al il suo cofattore, la nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+). Lo svolgimento viene descritto dalla reazione:

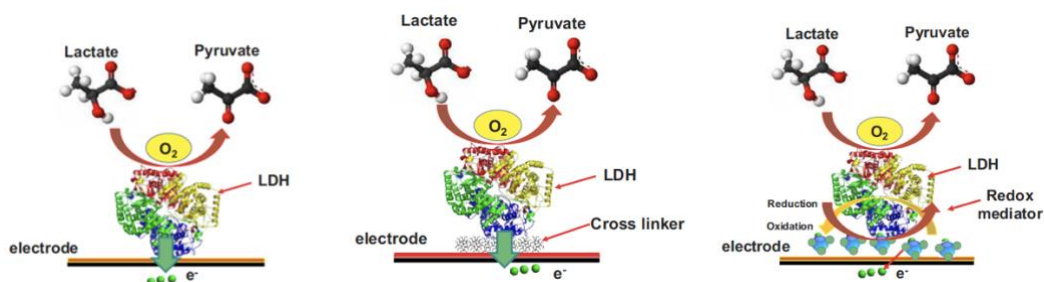


Figura 3: Trasferimento di elettroni nella reazione del lattato con LDH: nella prima figura diretto, nella seconda figura diretto con cross-linker, nella terza mediato con un redox mediator [5].

Per misurare attraverso LDH l'ammontare di lattato in situazioni di mancanza di ossigeno si può ricorrere a due metodi: la misurazione dell'ossidazione di NADH con PA oppure la riduzione di NAD^+ . LOx, d'altro canto, attira maggiormente l'attenzione dei ricercatori per la progettazione di biosensori, in quanto consente di eliminare le difficoltà dovute al coinvolgimento del coenzima NADH nell'ossidazione. In generale, questi biocatalizzatori sono immobilizzati sul supporto strutturale del sensore, vicini alla superficie degli elettrodi; e si è potuto osservare come la risposta risultante da una reazione di riduzione in presenza di specie elettro-attive in biosensori per il lattato dipenda linearmente dalla concentrazione dell'analita misurato, quando viene applicato un potenziale costante tra i due elettrodi di riferimento e di lavoro (*vedi capitolo 4*) [5].

2. PROGETTAZIONE

Gli elementi essenziali di cui si compone un sensore elettrochimico integrato in un dispositivo indossabile sono: un **supporto** inferiore, ovvero la base sulla quale poggiano gli **elettrodi**, costituenti la parte sensibile dello stesso; e una **parte circuitale**, per l'elaborazione a posteriori del segnale misurato. In questa sezione si presentano tutte le componenti del sensore, concentrandosi maggiormente sulle caratteristiche che ognuna di esse deve possedere, in conformità alle proprietà richieste per una ottimale estrazione del sudore, e sui materiali migliori per la sua realizzazione.

2.1. SUPPORTO STRUTTURALE

Dal momento che, come preannunciato, comodità e adattabilità sono due indicatori fondamentali per la realizzazione di un valido sensore indossabile, sono da evitare materiali rigidi, che possono causare irritazione cutanea e diventare pericolosi in caso vengano utilizzati durante l'esercizio fisico. Per ovviare alla difficoltà di adesione tra la pelle e le componenti più rigide dei sensori, talvolta metalliche o plastiche, sono stati sviluppati appropriati materiali e conformazioni.

2.1.1. DESIGN

Le proprietà meccaniche e fisiche dei materiali utilizzati nella progettazione dei sensori possono rendere talvolta complicato ottenere delle strutture solide ma al contempo flessibili, che aderiscano bene all'incarnato e di conseguenza riescano ad effettuare misure affidabili; per questo motivo, sono state sviluppate delle specifiche configurazioni che enfatizzano la flessibilità di materiali intrinsecamente duttili e malleabili.

I principali accorgimenti impiegati comprendono l'utilizzo di **materiali ultrasottili**, che grazie alla diminuzione dello spessore possiedono maggiore flessibilità; altrimenti si può optare per **strutture tessili**, con una struttura pluristratificata e ramificata che può assicurare tempi di deformazione abbastanza lunghi e garantire la permeabilità all'aria. Una ulteriore conformazione prevede l'utilizzo di **strutture ripiegate**, generalmente tridimensionali che consentono di utilizzare una maggiore superficie di analisi [1]. Queste strutture sono solitamente formate da uno substrato elastico, che viene modificato con materiali attivi, che a loro volta subiscono sollecitazioni di compressione dovute a restringimento termico o alla rimozione della tensione di trazione dal substrato compresso [2].

Una conformazione serpentina, contrariamente, lega l'elasticità del modello alla sua geometria e alla rigidità del substrato [2]; di questa categoria fa parte la "**island-bridge**", una

delle strutture maggiormente studiate per componenti elettronici flessibili, il cui meccanismo si basa fondamentalmente sulla differenza di proprietà delle due parti: “island”, che rimane inalterata per garantire stabilità alle componenti elettriche sovrastanti; e “bridge”, la costituente elastica, determinante nella caratterizzazione delle proprietà complessive della struttura.

Il **papercutting**, invece, è l’ultima tipologia di design strutturale ideata, che combinata con l’elettronica consente la progettazione di modelli tridimensionali a partire da una base 2D. Le delicate strutture cartacee rendono l’apparato elettronico adatto alla morfologia della pelle; inoltre esse consentono di isolare differenti elettrodi per il monitoraggio separato di singole componenti.

In alternativa, si possono usare le **schiume porose**, che si sono dimostrate in grado di assorbire il sudore dalla pelle umana sfruttando le strutture microporose della schiuma. In questo sistema può essere implementato anche un colorimetro che, inserendo specifici indicatori nella schiuma, riesce tracciare distinte componenti del sudore (*vedi paragrafo 3.2.1*). Oltre ad agire come dispositivo microfluidico, questi materiali proteggono anche gli elettrodi dal danneggiamento meccanico [1].

Infine, come ulteriore alternativa si può ricorrere alla progettazione di substrati elastici con specifiche strutture microscopiche per aumentare la flessibilità. Per facilitarne la realizzazione, si può ricorrere a tecnologie di stampa 3D che velocizzano il meticoloso processo di elaborazione di suddette strutture, anche direttamente sulla pelle o su altre superfici desiderate, utilizzando una combinazione variabile di materiali duttili e funzionali [3]. Un esempio è il **polidimetilsilossano** (PDMS), un noto elastomero siliconico, che viene largamente utilizzato per la progettazione di sensori indossabili. Il suo substrato, modellato a livello microscopico con continui e curvilinei dossi e valli tra loro interconnessi, lo rende resistente a trazione secondo più direzioni di sforzo [1].

2.1.2. MATERIALI IMPIEGATI

La scelta dei materiali da impiegare nella costruzione di questa parte dei sensori è di fondamentale importanza, dal momento che costituiscono la componente dello strumento che deve interfacciare adeguatamente la parte elettronica con la pelle del soggetto, sia per garantire una migliore esperienza nell’utilizzo, sia per consentire il corretto funzionamento della parte circuitale. Di seguito sono riportati alcuni dei materiali finora sperimentati.

La prima categoria comprende i **polimeri di plastica**, come ad esempio poliammide (PI), polietilentereftalato (PET), e poliestere (PE), che vengono già largamente utilizzati come

substrati e materiali di incapsulamento per componenti elettroniche flessibili [1]. Infatti, su di essi possono essere applicate tecniche per la produzione di elettronica flessibile, tra le quali si citano FPCBs (circuito stampato flessibile), inkjet printing, e roll-to-roll (R2R), alcune delle quali possono essere realizzate anche con tecniche di stampa 3D [3]. Purtroppo però, nonostante questi materiali si conformino bene alla morfologia della pelle umana, e consentano la collezione di dati disturbati da poco segnale rumoroso, la loro intrinseca rigidità rappresenta un ostacolo alla loro applicazione nei sensori indossabili.

Secondariamente, si possono avere anche **polimeri di gomma**, come polidimetilsilossano (PDMS), già introdotto nell'ultima sezione del paragrafo precedente, ed Ecoflex. Questi sono caratterizzati da intrinseca flessibilità, che li rende validi candidati per la realizzazione di sensori indossabili, soprattutto nell'ambito dell'esercizio fisico; inoltre sono impiegati anche in dispositivi che utilizzano celle microfluidiche per la raccolta del sudore. Questi materiali, però, non sono traspiranti; ciò rappresenta un punto a loro sfavore, in quanto potrebbero risultare scomodi da portare o provocare irritazioni cutanee se indossati per un periodo di tempo troppo lungo. Una ulteriore alternativa è rappresentata da **stoffe e tessuti**, materiali naturali e per questo fortemente biocompatibili con lo strato cutaneo sottostante. Essi presentano anche una notevole capacità di assorbimento dei liquidi, e per ciò vengono utilizzati anche nella realizzazione di dispositivi con celle microfluidiche. Sensori costruiti con questi materiali presentano una capacità di analisi molto accurata delle perdite locali di sudore, pH, o della concentrazione di cloro o glucosio. Infine, si possono usare **materiali cartacei**, favoriti da basso costo, degradabilità e rinnovabilità; similmente a quanto visto per i tessuti, anche la carta favorisce l'assorbimento di sudore grazie alla sua capillarità. Ciononostante, la sua fragilità e poca resistenza quando indossata, la rendono inadatta ad essere utilizzata come materiale per la realizzazione di sensori, qualora questi debbano essere indossati per parecchio tempo.

Una menzione particolare meritano le **celle microfluidiche**, che sono attualmente oggetto di numerosi studi, in quanto presentano notevoli vantaggi quando utilizzate nella progettazione di sensori indossabili. Il sudore, entrando nei canali delle celle, si separa dalla pelle e impedisce ad altre sostanze chimiche da questa provenienti, di entrarvi all'interno. Altri due vantaggi dell'utilizzo di queste strutture sono la minimizzazione della quantità di sudore evaporato, che aumenta l'attendibilità delle misure ricavate; e la possibilità di dirigere altrove il sudore più vecchio per permettere l'ingresso di nuovo fluido nella zona sensibile del sensore [1]. Per la loro fabbricazione si possono usare tecniche di stampa 3D [3], micro-fabbricazione, e incisione laser.

Recentemente si stanno anche studiando supporti per sensori indossabili realizzati con materiali che si possono considerare quasi invisibili, come nanoparticelle basate su inchiostri conduttivi e quasi trasparenti all'occhio umano, polimeri conduttivi, ossidi metallici modellati, film di metalli ultrafini. Questo conferirebbe un valore aggiunto al dispositivo non tanto dal punto di vista funzionale, quanto da un punto di vista della privacy dell'individuo che lo sta indossando [12].

2.2. PARTE SENSIBILE

La parte sensibile del sensore comprende tre elettrodi differenti, ognuno dei quali deve soddisfare specifici requisiti per ottenere alla fine uno strumento adattabile e flessibile alla morfologia umana.

2.2.1. ELETTRODO DI LAVORO

L'elettrodo di lavoro, o working electrode (WE) è la componente principale del sensore, e deve possedere determinate caratteristiche, tra cui: **alta stabilità chimica** contro la corrosione e il danneggiamento dovuto agli elettroliti o ai fluidi corporei quando viene applicato un potenziale; **ampio range di potenziali rilevabili**, per riuscire a individuare analiti diversi, con differenti potenziali redox; **alta conduttività**; **biocompatibilità** senza il rischio che possa produrre reazioni tossiche o immunologiche quando esposto ai fluidi dei tessuti biologici con cui entra in contatto; capacità di essere **modificato chimicamente** sulla superficie dalle biomolecole da riconoscere; e infine **eccellente deformabilità meccanica** per conformarsi alle forme corporee. Per la sua realizzazione, si possono utilizzare dei nanomateriali, principalmente di carbonio, metallici oppure ibridi.

I **nanomateriali in carbonio** comprendono i nanotubi di carbonio (CNTs) e il grafene. I **CNTs** possiedono alta forza meccanica e inerzia chimica e riescono bene ad immobilizzare enzimi, proteine e altre biomolecole; oltre a questo sono caratterizzati da una elevatissima conducibilità, che permette di migliorare le caratteristiche elettrochimiche di inchiostri non nanostrutturati. Essi risultano particolarmente utili per la detection elettrochimica del lattato in quanto permettono di abbassare notevolmente il potenziale di ossidoriduzione che va applicato alla cella, riducendo quindi il rischio di interferenze da parte di altre sostanze. A questi si può aggiungere il PEDOT (poli(3,4-etilenediossiofene)) come rivestimento conduttivo e legante, per ovviare al problema di alta resistenza di contatto e ottenere prestazioni elettrochimiche migliori. Il **grafene** è un nuovo nanomateriale bidimensionale ottenuto dalla riduzione chimica o termica dell'ossido di grafene. Per essere impiegato nella realizzazione di sensori, il grafene deve essere combinato con una maglia d'oro per

incrementare la sua attività elettrochimica; nonostante ciò, permane il problema della sua poca flessibilità, che potrebbe causare danneggiamenti allo strumento.

I **nanomateriali metallici** (in particolare rame e oro), sono dotati di eccellente conduttività elettrica e flessibilità meccanica, ma possono andare incontro ad ossidazione e corrosione in presenza di elettroliti. I nanomateriali a base di oro sono quelli maggiormente utilizzati per la realizzazione di elettrodi di lavoro grazie alle loro proprietà uniche, tra cui alta conduttività elettrica, ampio range di potenziale, grande robustezza meccanica, durabilità fisica e chimica, facilità di fabbricazione e alta biocompatibilità con la pelle. Di questa categoria fanno parte diverse tipologie di materiali, tutti realizzati usando come base l'oro: nanotubi (AuNTs), nanofili (AuNWs) e nanosheets. I primi due vengono soprattutto utilizzati con un supporto inferiore di PDMS, per aumentare maggiormente la flessibilità e la resistenza alla deformazione meccanica.

I **nanomateriali ibridi** combinano le proprietà di più materiali in un unico sistema per la realizzazione di elettrodi flessibili. Alcune di queste combinazioni prevedono l'unione di grafene e nanofili in argento (AgNWs), che ovviano alla poca resistenza del grafene accorciando la lunghezza delle giunzioni tra i nanofili, e incrementano la flessibilità del materiale; altri combinano ossido di grafene ridotto (rGO) con nanotubi in carbonio (CNTs), per ottenere maggiore flessibilità e conduttività elettrica; altri invece accostano AuNTs con CNTs [2].

Studi recenti stanno esplorando la possibilità che alcuni elettrodi possano rimediare automaticamente a propri danneggiamenti meccanici grazie ai nanomateriali di cui sono composti, senza l'intervento di alcuna fonte esterna; questa intrinseca capacità di autoriparazione dipende dalle interazioni dinamiche covalenti o non covalenti che sussistono tra gli atomi del materiale stesso. Molti degli elettrodi con questa capacità finora documentati si basano su pressione esterna, temperatura, o campo magnetico per iniziare il processo di riparazione [12].

2.2.2. Elettrodo AUSILIARIO

Un elettrodo ausiliario, o counter electrode (CE) è solitamente usato per chiudere il circuito con l'elettrodo di lavoro per assicurarsi che la reazione avvenga su quest'ultimo e non venga limitata la risposta in corrente della rilevazione. I requisiti che questo componente deve soddisfare sono simili a quelli che riguardano l'elettrodo di lavoro, analogamente per i materiali che lo compongono [2].

2.2.3. Elettrodo di riferimento

Idealmente, un elettrodo di riferimento, anche detto reference electrode (RE), è un elettrodo non polarizzato e di potenziale noto, che deve rimanere costante, mentre la differenza di potenziale dell'elettrodo di lavoro varia. L'elettrodo maggiormente utilizzato è **Ag-AgCl**, composto in argento e cloruro d'argento, che viene solitamente abbinato ad un supporto in Ecoflex, PDMS o PET. Vi sono due metodi principali con i quali si può collocare questo elettrodo sul sensore: nel primo caso sulla superficie del supporto viene distribuito uno strato di Ag-AgCl di uno spessore prefissato; nel secondo caso sulla superficie viene collocato uno strato d'argento che viene sottoposto a clorazione, in seguito alla quale viene depositato un ulteriore strato d'argento (spesso nanofili AgNWs) tramite elettrodeposizione o deposizione chimica. Rispetto ai classici elettrodi rigidi Ag-AgCl, questa sistemazione consente di preservare maggiore flessibilità meccanica ed elasticità. Altre tecniche per incrementare la flessibilità comprendono l'utilizzo di una struttura serpentina nella deposizione dell'elettrodo, oppure di unire alla soluzione Ag-AgCl un 10% di Ecoflex prima della deposizione sul supporto del sensore. Infine, per ovviare al problema della scarsa stabilità dell'elettrodo in relazione alla concentrazione di ioni (in particolar modo per lo ione Cl^-), viene usato uno strato di PVB (polivinilbutirrale), immune alle fluttuazioni di concentrazione di Cl^- , per coprire l'elettrodo e preservare una maggiore stabilità chimica [2].

2.2.4. Tecniche di fabbricazione

Per la loro produzione si possono usare tecniche di micro-fabbricazione, che risulta essere però molto costosa a discapito dell'alta precisione. Alternativamente, si possono usare tecniche di stampa inkjet, serigrafia, timbratura, stampaggio roll-to-roll (R2R), scrittura a laser diretta e stampaggio 3D, che riducono i costi di produzione. Le tipologie di stampaggio 3D si possono suddividere in categorie in base al processo di deposizione dei materiali: la **fotopolimerizzazione VAT** prevede l'esposizione di una luce UV al polimero foto-indurente (in genere fotopolimeri acrilici, e polimeri a base epossidica) per indurre la polimerizzazione fino ad ottenere un oggetto 3D finale; la **Material Jetting (MJ)** combina tecniche di fotopolimerizzazione con altre di inkjet printing, e consiste nell'utilizzo di un dispenser multicanale per erogare le particelle o il materiale fotopolimerico in base alla configurazione dello strato inferiore, curata da una sorgente di luce UV. Infine, le tecniche basate sull'estrusione dei materiali, comportano la deposizione di materiale direttamente sul substrato attraverso una testa d'ugello controllata dal computer mediante un sistema pneumatico o meccanico [3]. Di queste fa parte anche l'**AJP (Aerosol Jet Printing)**, una tecnica di fabbricazione che presenta notevoli vantaggi in termini di costo, velocità, facilità, e versatilità dei materiali impiegabili, e che utilizza principalmente come ink Ag-AgCl e

carbonio come materiali da porre su una struttura in CNTs o grafene. I vantaggi che derivano dall'utilizzo di questa tecnica sono dovuti particolarmente al suo peculiare processo di produzione senza contatto che utilizza gas per atomizzare, trasportare e disporre gli inchiostri [10].

2.2.5. CONFIGURAZIONI

I tre elettrodi sopracitati si possono disporre in diverse configurazioni per la trasduzione del segnale d'ingresso, le due più comuni sono quella a tre elettrodi e quella a due.

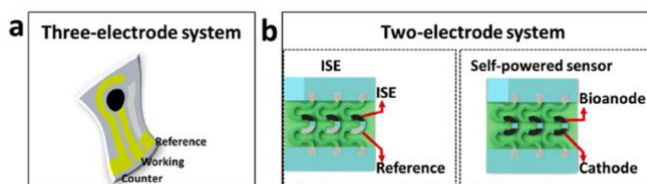


Figura 4: Configurazione a tre elettrodi (a) con elettrodo di lavoro, ausiliario e di riferimento. Configurazione a due elettrodi (b) con elettrodo di lavoro e di riferimento [2].

La configurazione a **tre elettrodi** si è dimostrata essere molto efficace nella rilevazione e nel monitoraggio di glucosio, lattato e acido urico; ed è quella più comunemente applicata quando si utilizzano tecniche voltammetriche e amperometriche per la rilevazione delle informazioni dal sudore (*vedi paragrafo 3.1.1*), nelle quali è necessaria una iniezione costante di corrente nella cella; essa inoltre può fornire risultati di rilevamento più sicuri e affidabili anche in caso di elevata tensione applicata [2]. Nel caso in analisi, sono da preferire configurazioni a tre elettrodi in quanto la variazione di potenziale deve essere indotta esternamente per favorire la reazione di ossidoriduzione che permette l'estrazione del lattato.

Contrariamente, nel caso si volessero raccogliere le concentrazioni degli ioni presenti nel sudore, si dovrebbe preferibilmente utilizzare una configurazione a due elettrodi. La configurazione a **due elettrodi** infatti, si compone dei soli elettrodi di lavoro e di riferimento, e viene maggiormente utilizzata con tecniche di rilevazione potenziometriche che, basandosi sulla rilevazione di un potenziale in condizione di Open Circuit Potenzial, avvengono a corrente nulla. Per consentire una maggiore selettività a uno specifico ione, l'elettrodo di lavoro viene modificato con una membrana semipermeabile allo ione d'interesse (ad esempio, polianilina per la rilevazione del pH; ionoforo di Na unito a PVC (polivinilcloruro) per la rilevazione di ioni Na^+). In aggiunta a questa struttura, si possono inserire altri due elettrodi di lavoro: un (bio)anodo e un (bio)catodo che, in presenza di analiti, inneschino una reazione di ossidazione con un passaggio di elettroni dall'anodo al catodo attraverso un circuito esterno; il livello di corrente misurata, generata dal passaggio di questi, indica i livelli di concentrazione dell'analita [2].

2.3. PARTE CIRCUITALE

La funzionalità di qualsiasi sensore integrato in dispositivi indossabili è strettamente legata alla progettazione di un'opportuna elettronica di condizionamento che attua appropriati schemi di analisi, processa il segnale del sensore, filtra il rumore e trasmette il segnale finale grezzo, o il risultato quantitativo ottenuto dal confronto dello stesso con una calibrazione precedentemente svolta, a un dispositivo per l'analisi computazionale o a un display per la visualizzazione [4]. In questa sezione ci si occupa di presentare le componenti elettriche necessarie al funzionamento del sensore, e di esporre i metodi grazie ai quali l'intero dispositivo riceve il supporto energetico necessario al proprio funzionamento.

2.3.1. COMPONENTI ELETTRONICHE

Lo scheletro elettronico che sta alla base del funzionamento e dell'interpretabilità dei dati rilevati dal sensore si compone di una sorgente analogica per il **condizionamento** del segnale, ovvero l'elaborazione preliminare del segnale stesso, svolta per renderlo adatto ad essere trattato dal sistema di acquisizione e misura, senza alterarne le caratteristiche essenziali; seguita da un convertitore analogico digitale (**ADC**), un dispositivo che trasforma il segnale analogico in ingresso in un segnale digitale, in cui ogni campione è rappresentato da una parola binaria di bit; e da un **microcontrollore** pre-programmato che, dato il segnale in uscita, lo converte nei corrispondenti valori di concentrazione [4].

2.3.2. SUPPORTO ENERGETICO

Per conferire energia sufficiente allo strumento senza che eventuali batterie interferiscano con la flessibilità e la miniaturizzazione del dispositivo stesso, sono stati sviluppati metodi di ricarica wireless come il near-field communication (NFC) o la ricarica ad ultrasuoni, oppure metodi di autoricarica come celle solari o celle che si ricaricano rilevando l'attività umana.

Per quanto riguarda i supporti elettrici wireless sopracitati, il metodo di **ricarica ad ultrasuoni** richiede uno specifico modulo trasduttore, che limita la possibilità di utilizzo in una applicazione giornaliera; mentre il metodo **NFC** si compone di un microchip e un'antenna radio che riceve segnali a breve distanza; il supporto elettrico è alimentato da un voltaggio costante (circa 2.75V) che può essere utilizzato per ricaricare l'unità del microcontrollore (MCU), mentre i dispositivi personali che possiedono il modulo NFC possono ricaricare il sensore via wireless, ricevere comandi e ottenere i risultati ricavati dall'analisi dei dati.

I dispositivi di autoricarica, d'altra parte, operano senza l'utilizzo di un supporto elettrico esterno; i metodi principali prevedono l'utilizzo di celle solari, TENG (Triboelectric

nanogenerator) e celle bio-fluidiche (BFC). Le **celle solari** sono un metodo sostenibile e di natura non inquinante che utilizza l'energia rinnovabile proveniente dai raggi luminosi del sole, questo però può costituire un impedimento nel momento in cui si verificano giornate nuvolose o altre condizioni che limitano l'assorbimento di energia. Il **TENG** è un dispositivo che usa la corrente di spostamento di Maxwell come mezzo di conversione dell'energia meccanica in energia elettrica e segnali. Dal momento che il corpo umano è in movimento per la maggior parte del tempo, questo metodo di autoricarica può potenzialmente produrre abbastanza energia per il funzionamento garantito del sensore. In questo dispositivo i condensatori servono come modulatori e dispositivi di archiviazione di energia prodotta. Infine il **BFC** è un dispositivo di conversione energetica che utilizza soprattutto le reazioni enzimatiche per convertire energia chimica situata nelle composizioni organiche dei bio-fluidi in energia elettrica. Consiste in un anodo, un catodo e una soluzione elettrolitica che porta carica tra i due elettrodi del bio-fluido, e può usare come fonte di energia lattato e glucosio, contenuti in grandi quantità nella composizione chimica del sudore: si realizza una reazione elettrochimica enzimatica che provvede continuamente alla produzione di energia per il funzionamento di tutto il sensore [1].

3. FUNZIONAMENTO

Nel seguente capitolo vengono affrontate le tematiche principali che costituiscono il funzionamento complessivo del sensore. Inizialmente vengono espone le tecniche di rilevazione del sudore, seguite dalle modalità con le quali è possibile analizzarlo per ricavare le informazioni necessarie per la comprensione del proprio stato di salute. Infine vengono espone alcune esperienze documentate.

3.1. RILEVAZIONE ED ESTRAZIONE DEL SUDORE

Alcune problematiche ricorrenti che si devono affrontare quando si progettano sensori elettrochimici per il sudore riguardano bassi livelli di sudorazione, l'evaporazione del campione, la possibile contaminazione con la pelle, la difficoltà di ottenere sudore fresco e gli effetti del tasso di sudorazione sulla quantità di analiti presenti nello stesso [4]. Per ovviare a queste inconvenienze, sono state adottate numerose tecniche, tra le quali si citano irritazione da calore, guanti e cuscinetti che assorbono il sudore. Questi metodi per l'estrazione del sudore fanno leva sul fatto che le dita, i palmi e la parte posteriore delle mani possiedano la densità maggiore di ghiandole sudoripare, e che la raccolta del sudore sia particolarmente favorita dall'inibizione dell'evaporazione dello stesso; di conseguenza sono stati sviluppati dei veri e propri guanti che una volta indossati impediscono l'evaporazione del sudore. Altrimenti è possibile sottoporre il soggetto ad irritazione termica, il ciò include per esempio svolgere esercizio fisico o lo stare in un ambiente con una temperatura elevata, dal momento che in queste situazioni il corpo secerne quantità di sudore maggiori per mantenere i propri livelli di omeostasi [1]. È immediato osservare che queste due soluzioni, nonostante siano concettualmente efficaci, non sono applicabili fuori dal laboratorio. Un problema fondamentale che nasce dall'analisi dei metodi di rilevazione sopracitati è la difficoltà di estrazione di sudore per un periodo di tempo non limitato e in condizioni di riposo o di attività sedentarie. Nelle due sezioni che seguono vengono espone due metodi alternativi che riescono ad ovviare a questa criticità, aprendo nuove possibilità anche riguardo lo studio delle correlazioni che sussistono tra concentrazioni di lattato nel sudore e nel sangue.

3.1.1. IONOFRESI

La ionofresi e la ionofresi inversa sono dei processi, largamente sviluppati, per stimolare la secrezione locale del sudore in una specifica zona della pelle senza causare disagio nel paziente. Durante la ionofresi, un farmaco sudorifero stimolante come la **pilocarpina** viene somministrato sull'epidermide applicando una bassa corrente attraverso uno strato di idrogel. Questo medicinale stimola le ghiandole eccrine colinergiche situate sotto l'epidermide, le

quali favoriscono la produzione di sudore alla sua composizione di equilibrio. Al contrario, la ionoforesi inversa si basa sul flusso osmotico inverso dei fluidi sub-dermici applicando una corrente attraverso l'idrogel, ma senza l'introduzione di alcuna molecola di farmaco [12].

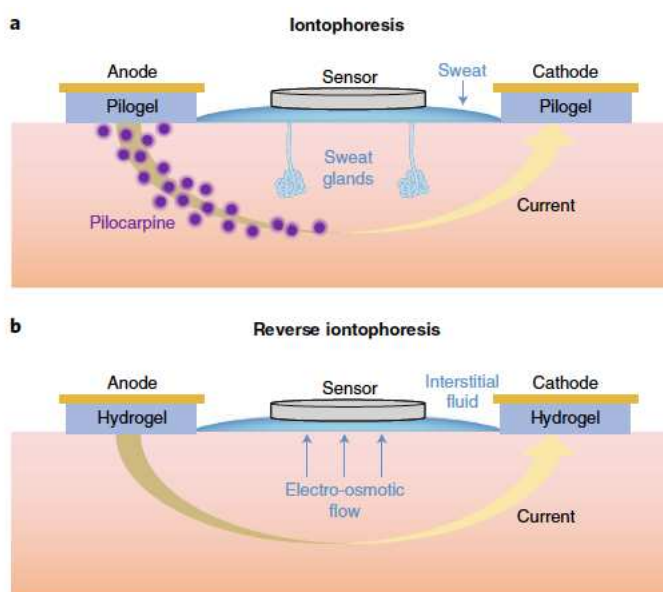


Figura 5: Ionoforesi e ionoforesi inversa: la ionoforesi (a) si basa sull'applicazione di corrente per la stimolazione locale del sudore tra gel contenenti il farmaco stimolante che viene guidato sotto la superficie della pelle e innesca le ghiandole vicine per il rilascio di sudore. La ionoforesi inversa (b) utilizza l'applicazione di corrente per guidare elettro-osmoticamente il fluido interstiziale attraverso l'epidermide fino alla superficie della pelle, senza l'utilizzo di alcun farmaco [4].

Questo metodo è stato utilizzato per realizzare la parte sensibile ai componenti chimici della pelle di un sensore per il monitoraggio simultaneo di emodinamica (pressione sanguigna e battito cardiaco) in correlazione a quello di biomarcatori metabolici (lattato, glucosio, caffeina, e alcol) [9]. In ogni caso, un mal dosaggio nella corrente o nelle sostanze chimiche può risultare in una sensazione di bruciore sulla pelle del paziente; metodi per ovviare a questa problematica sono attualmente oggetto di studi [1].

3.1.2. IDROGEL

Un ulteriore metodo che sta riscontrando notevole interesse da parte dei ricercatori per l'estrazione di sudore dalla pelle prevede l'utilizzo dei cosiddetti idrogel, che sfruttano la naturale termoregolazione del sudore, ovvero la continua secrezione di sudore anche durante attività di routine o sedentarie, che il corpo umano compie al fine di mantenere stabile la propria temperatura. Questi strumenti sono stati utilizzati sia per l'analisi di glucosio estratto dal sudore [6], sia per l'analisi del lattato [7]. Gli idrogel sono dei "cerotti" contenenti una concentrazione di soluto e applicabili sulla pelle, che sfruttano meccanismi fisici non invasivi per favorire l'estrazione di sudore a riposo, durante l'esercizio fisico e anche a posteriori, senza la necessità di alcun supporto elettrico.

Il cerotto ideato ha tre sezioni principali: una camera circolare dove si trova un disco di idrogel; una striscia rettangolare di carta, inserita tra due sottili strati di PDMS; e una larga superficie, solitamente di carta, che consente l'evaporazione del sudore che vi giunge. L'idrogel arricchito di soluto viene posto nella prima sezione circolare, che interfaccia direttamente la pelle; per la sperimentazione di questi cerotti sono state usate soluzioni diverse: un **idrogel di glucosio 4M ipertonico**, e un **idrogel PBS** (con un tampone salino di fosfato) **isotonico**; e prima dell'applicazione del cerotto, la superficie è stata lavata con alcol isopropilico e acqua deionizzata (DI) [8].

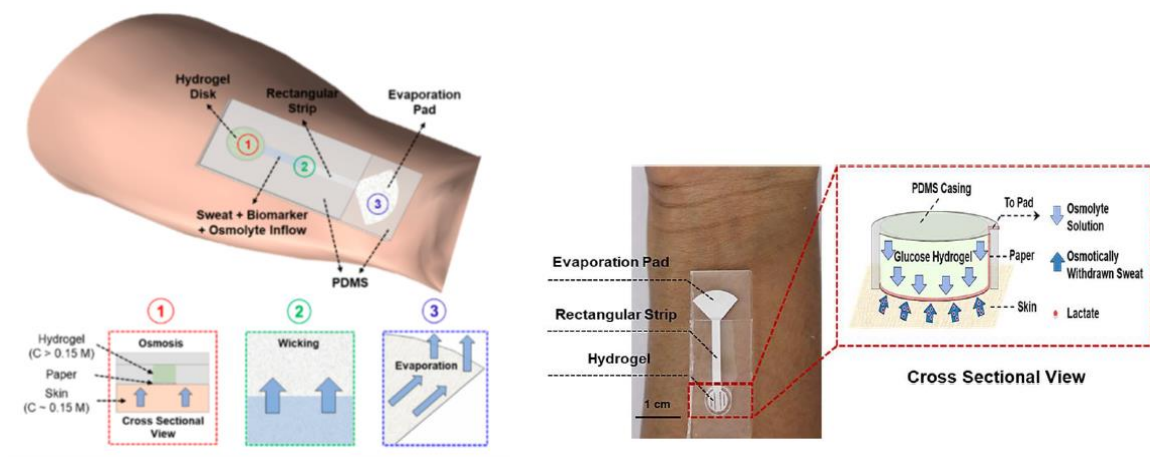


Figura 6: Schema di un patch indossabile, non alimentato e non invasivo per la rilevazione del sudore sulla pelle, comprendente un disco di idrogel e un canale microfluidico cartaceo. Sotto, le tre fasi successive di osmosi, diffusione capillare ed evaporazione [7,8].

Il suo funzionamento si basa sull'azione simultanea di tre semplici effetti: osmosi, assorbimento capillare e evaporazione. La forza osmotica tra la pelle e l'idrogel è generata dall'alta concentrazione di soluto presente in quest'ultimo, che consente un passaggio spontaneo del sudore dalla pelle al cerotto, senza la necessità di una alimentazione elettrica esterna; in seguito, il sudore raccolto assieme agli analiti al suo interno viaggia attraverso il canale cartaceo rettangolare per mezzo di azione capillare fino a giungere alla superficie di evaporazione, dove la componente liquida del sudore evapora lasciando sul tampone solamente le componenti non volatili [7]. Il tampone cesserebbe di funzionare solamente se i potenziali chimici di acqua nel sudore e di acqua nell'idrogel si eguagliassero, oppure se si raggiungesse la saturazione del tampone con il deposito di sali o analiti [8]. In generale, in alcuni test fisici svolti, detti "dry rub" test, si è notato come l'osmosi predomini come fenomeno fisico in caso di quantità minime di sudore, mentre nel caso di attività fisica di media o alta intensità prevalga il trasporto attivo di sudore (*vedi paragrafo 3.3.2*) [7].

3.2. MECCANISMI DI ANALISI DEL SUDORE

L'analisi delle componenti elettrochimiche e delle informazioni fisiche ricavabili dal sudore può favorire la comprensione di numerose indicazioni riguardanti lo stato di salute delle persone. In questa sezione vengono esposti i due principali meccanismi di analisi: chimico, comprendente analisi elettrochimica, colorimetria e fluorimetria; e fisico, che si basa sull'osservazione della quantità totale e della perdita di sudore, e sull'analisi di pressione e temperatura corporee.

3.2.1. ANALISI CHIMICA

Una gran varietà di studi si è occupata di analizzare le relazioni che sussistono tra lo stato di salute e le concentrazioni delle componenti chimiche nel sudore; ad esempio, i livelli di Na^+ e Cl^- durante l'esercizio fisico riflettono la perdita di acqua dall'epidermide. Per rintracciare queste concentrazioni, sono state sviluppate modalità di rilevazione elettrochimica e ottica, che vengono qui di seguito esposte.

Analisi elettrochimica

L'analisi elettrochimica presenta notevoli vantaggi come elevata sensibilità, breve tempo di risposta e la possibilità di collezionare e analizzare dati per un lungo periodo. Per la rilevazione del segnale si possono usare vari meccanismi, tra cui si menzionano potenziometria, cronoamperometria, voltammetria, e spettroscopia di impedenza elettrochimica. I metodi elettrochimici **potenziometrici** sono utilizzati principalmente per la rilevazione di ioni presenti in grande concentrazione e dotati di una propria carica, come Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- e H^+ (che si aggirano sulle mM, come si può vedere nella *Tabella 1*). La loro concentrazione può essere calcolata servendosi dell'equazione di Nerst, e utilizzando una differenza di potenziale posta tra i due elettrodi; per ridurre l'interferenza di altri ioni, questo metodo richiede grande selettività e l'utilizzo di membrane ione-selettive (ISMs) [1].

Al contrario, i metodi di analisi amperometrici e voltmetrici basano il loro funzionamento sulla misurazione di una corrente dovuta ad un voltaggio in input costante (segnale a gradino o impulso). L'**amperometria** rileva la risposta in corrente generata dalla reazione di ossidoriduzione che avviene tra l'elettrodo di lavoro, dove si trova l'enzima interessato, e quello ausiliario; a questi talvolta vengono aggiunti dei catalizzatori per accelerare la reazione [1]. In generale questo metodo è applicato per la rilevazione selettiva dei metaboliti presenti nel sudore, come lattato, acido urico e etanolo. In particolare, è molto diffusa la **cronoamperometria** come metodo di rilevazione dei livelli di lattato; questa tecnica tempo-dipendente, genera una corrente in uscita dagli elettrodi che si è dimostrata essere proporzionale alla concentrazione di analita interessato; e, in generale prevede sempre

l'aggiunta di un mediatore, tra cui 1-4naftoquinone (NQ) e tetratiafulvalene (TTF), per favorire la reazione con un voltaggio minore in input [2]. Si può vedere come essa sia già stata utilizzata con sensori alla cui base è posto un idrogel [8], con altri che utilizzano la pilocarpina [9], e anche con sensori costruiti con la tecnica di stampa 3D chiamata AJP (Aerosol Jet Printing) [10].

D'altra parte, la curva di corrente registrata tramite **voltammetria** consente di monitorare informazioni di più analiti contemporaneamente [1]. In particolare, la voltammetria ciclica (CV) viene utilizzata particolarmente in esperimenti per indagare la cinetica di trasferimento degli elettroni e i processi di ossidazione e riduzione di alcune molecole; e consente di ricavare importanti informazioni come potenziale di picco, corrente di picco e la separazione dei picchi redox. Altre tecniche derivate dalla voltammetria sono DPV (Different Pulse Voltammetry) e SWV (Square Wave Voltammetry) [2]. Infine la **spettroscopia di impedenza elettrochimica** (EIS) viene usata per riflettere le caratteristiche resistive della superficie del sensore analizzando la relazione tra la corrente in output e il voltaggio sinusoidale in input [1].

I problemi di queste metodologie si possono riassumere nella difficoltà di fornire un elevato potenziale in ingresso e nelle interferenze con altri ioni, che si possono ovviare con l'aggiunta di membrane permselective e mediatori artificiali (TTF e PB, rilevatore Prussian Blue). Altre criticità, tra cui disturbo di segnali irrilevanti, temperatura, umidità, o dovute alla presenza di altri analiti, si possono ovviare con tecniche di analisi del segnale postume (*vedi paragrafo 3.3.1*).

Colorimetria

Questo principio diagnostico si basa sui cambiamenti di colore dovuti alle reazioni chimiche tra i reagenti e gli analiti interessati; è un metodo a scarsissimo consumo energetico, facile da comprendere e di basso costo. Solitamente viene utilizzato su camere microfluidiche o sulla superficie di regioni per l'assorbimento di sudore con un reagente colorimetrico; ma la descrizione che fornisce sulle concentrazioni di analita rilevato si può definire solo semi-quantitativa. Un problema fondamentale che rende difficoltoso l'utilizzo di questa tecnica è rappresentato dall'evaporazione del sudore e dalla contaminazione che questo può ricevere una volta esposto in atmosfera; a questo si può ovviare utilizzando sensori con strutture simili a quelle degli idrogel sopracitati (*vedi paragrafo 3.1.2*) [1].

Fluorimetria

La fluorimetria è l'ultimo metodo che viene citato per l'analisi chimica del sudore. Questo metodo viene maggiormente utilizzato grazie alla sua alta sensibilità nella rilevazione di tracce di analiti nel sudore [1]. Alcuni sensori per il lattato utilizzano tecniche di rilevazione ottica per l'analisi delle concentrazioni di analita; queste si possono dividere in due categorie principali: sensori di lattato a base di elettro-chemiluminescenza; e sensori di lattato a base di fluorescenza. Nell'**elettro-chemiluminescenza (ECL)**, si collezionano e analizzano i fotoni di luce prodotti dal rilassamento delle molecole eccitate in una reazione chimicamente avviata, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di uno dei reagenti coinvolti nella reazione elettrochimica. La reazione in questione non necessita di alcuna eccitazione esterna, in quanto avviene in presenza di ossigeno, o grazie all'ossidazione del perossido d'idrogeno (*vedi paragrafo 1.1.2*) [5]. I sensori a base di **fluorescenza**, invece, si basano sull'intensità della luce emessa o sulla durata della irradiazione luminosa dopo un periodo di eccitazione [5]; questo metodo è stato utilizzato per la rilevazione di glucosio, di zinco e si può applicare anche alla misurazione delle concentrazioni di altri analiti, tra cui Cl^- , Na^+ [1].

3.2.2. ANALISI FISICA

Il sudore contiene, oltre a una gran varietà di informazioni chimiche, anche alcune indicazioni fisiche che consentono di valutare lo stato di salute delle persone. Le informazioni più importanti che si possono ricavare derivano dall'analisi della variazione del volume di sudore, e dei valori di pressione e temperatura corporei.

La **variazione del volume di sudore** agisce come indicatore sullo stato di idratazione del corpo, ma riflette anche lo stato di benessere dell'utilizzatore, sia da un punto di vista fisico che psicologico. Per la rilevazione di queste informazioni si adopera preferibilmente la colorimetria, che usa coloranti come marcatori per riflettere la perdita di sudore in zone localizzate. La sudorazione può essere espressa come la relazione tra velocità media e dissipazione del calore; e il meccanismo di rilevazione trasforma queste informazioni in segnali elettrici come resistenze e capacità. Un problema insorgente riguarda l'aumento di impedenza tra i due elettrodi, che influisce sulla capacità di misurazione degli stessi.

La **pressione** del sudore può fornire, invece, numerose informazioni riguardanti lo stato di salute, l'intensità dell'esercizio fisico, fattori di stress mentale, e altre informazioni di interesse; il suo valore può essere rilevato mediante apposite valvole a scoppio. Un ruolo cruciale della pressione è quello di dirigere il flusso di sudore all'interno dei canali microfluidici costituenti il sensore. Durante i periodi di attività, infatti, le ghiandole sudoripare producono pressioni, associate ad effetti osmotici (dovuti alla differenza di

osmolarità, e più un particolare alle diverse concentrazioni di ioni Na^+ e Cl^-) tra il plasma e il sudore, per dirigere il liquido sulla superficie della pelle. A questo riguardo, è stato condotto uno studio su un sistema microfluidico indossabile e sottile che applicato alla superficie della pelle consentisse di effettuare misurazioni precise e continue delle pressioni fluidiche secretorie generate sulla superficie della pelle dalle ghiandole eccrine sudoripare (superficie SPSG o s-SPSG) in varie locazioni del corpo e sotto diverse condizioni fisiche. Il dispositivo utilizza una raccolta di strutture microfluidiche, ognuna con una valvola capillare a scoppio (CBV) selezionata con una differente pressione di scoppio (BP) nel range fisiologico. Se la pressione del fluido, o s-SPSG, è maggiore della pressione BP del canale, la CBV fa passare il fluido che viene raccolto in un microserbatoio contenuto nello strato microfluidico del dispositivo.

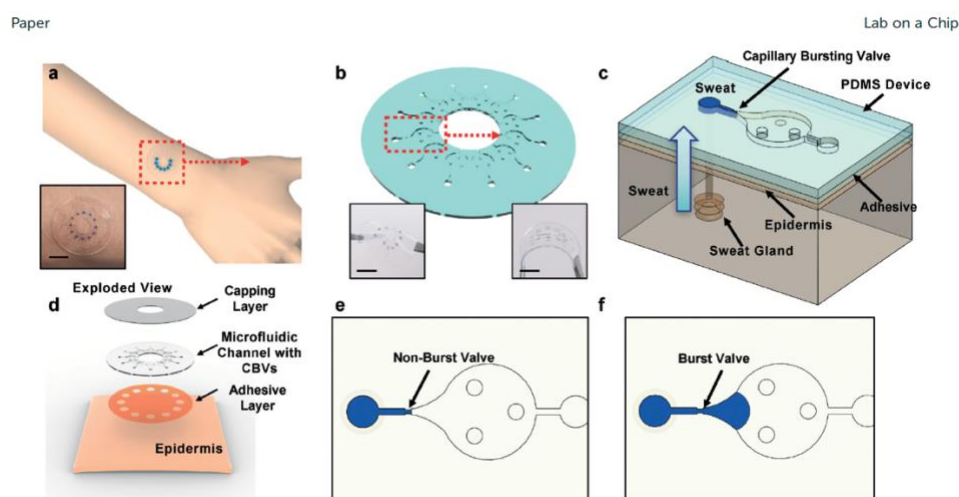


Figura 7: Schema illustrativo di un sistema per la misurazione della pressione secretoria delle ghiandole sudoripare alla superficie della pelle con 12 valvole capillari a scoppio: (a, b, d) Schema integrativo del dispositivo, e sua vista esplosa; (c) vista prospettiva di una singola valvola integrata sulla pelle; (e, f) illustrazione dall'alto dei canali microfluidici parzialmente riempiti di acqua nel caso di una valvola non ancora scoppiata (e) e scoppiata (f).[13]

Il dispositivo finale, utilizzato per condurre lo studio, include 12 CBV, ognuna con una differente pressione, con spessori da $10\mu\text{m}$ a $120\mu\text{m}$ con un incremento di $10\mu\text{m}$ tra un canale ed il suo successivo; ad ogni valvola corrisponde un differente microserbatoio, ed in ognuno di questi, per i test in vivo, è stato inserito un indicatore colorimetrico per una rapida lettura visiva. Per evitare che le misurazioni vengano artefatte dalla temperatura corporea, dalla presenza di oli o altre sostanze della pelle, prima di ogni misurazione la pelle del volontario è stata pulita con una soluzione alcolica. Il volume di sudore necessario a riempire il canale è solo di $0.1\mu\text{L}$, il che significa che anche quantità modeste di sudore possono riempire

facilmente la cavità. Per l'elaborazione dei risultati ottenuti si cita l'equazione di Young-Laplace, che descrive la pressione di scoppio per un canale rettangolare:

$$BP = -2\sigma \left[\frac{\cos \theta_I^*}{b_e} + \frac{\cos \theta_A}{h} \right] \quad (3.1)$$

Dove σ è la tensione superficiale del fluido; θ_A è l'angolo di contatto di avanzamento critico del canale, che deriva dalla misurazione dell'angolo nel momento in cui una goccia inizia a muoversi sulla superficie di una lastra di PDMS inclinata (nel caso dell'acqua corrisponde a $125^\circ \pm 2^\circ$); θ_I^* è il $\min [\theta_A + \theta_e, 180^\circ]$; β è l'angolo di divergenza del canale; h è l'altezza della sezione di divergenza; e infine b_e è la misura dello spessore, che tiene conto di imperfezioni nel processo di fabbricazione che possono causare un leggero arrotondamento nei bordi delle regioni di uscita delle CBV, aumentando in questo modo la larghezza effettiva del canale; viene determinato dalla relazione $b_e = b + 2r_e(1 - \cos \theta_e)$, dove θ_e è un numero compreso tra 0 e β e indica la posizione dell'interfaccia anteriore. La pressione di scoppio BP varia all'avanzare verso l'interfaccia: la pressione di scoppio critica BP_{cr} è determinata massimizzando l'equazione soprastante rispetto alla posizione di avanzamento dell'interfaccia θ_e . Dall'elaborazione dell'equazione, e considerando solo BP_p , ossia la parte di pressione di scoppio dipendente da θ_e , si ottiene la seguente relazione:

$$\frac{BP_p b}{2\sigma} = \frac{-1}{1 + 2(r_e/b)(1 - \cos \theta_e)}, \quad \pi - \theta_A \leq \theta_e \leq \beta \quad (3.2)$$

Da questa si può dimostrare che la pressione BP diminuisce all'aumentare del rapporto r_e/b e che il modello di Young-Laplace degenera quando il rapporto r_e/b tende a zero. Alcune incertezze nella misurazione della s-SPSG coinvolgono in parte le lievi variazioni nelle dimensioni critiche delle CBV e in parte l'eterogeneità spaziale nelle caratteristiche delle ghiandole sudoripare della pelle. Questo tipo di incertezze può essere ovviato tramite la progettazione di un dispositivo che includa un singolo canale di ingresso e una struttura microfluidica unica e interconnessa, e nel quale la prima CBV abbia la BP inferiore e lo spessore maggiore, in modo tale che la BP aumenti proporzionalmente con il diminuire della cavità seguendo una direzione prefissata nel dispositivo.

Successivamente sono stati condotti dei test su volontari giovani e in salute, durante l'esercizio fisico con tre tipologie di attrezzature (cyclette, ellittica e tapis roulant) e in una

sessione a riposo in una sala sauna. Gli studi coinvolgono dispositivi posti sull'avambraccio, sulla parte superiore del braccio, sul petto, sulla parte superiore e inferiore della schiena e sulla coscia, con misurazioni di pressione ogni 20 minuti. In accordo coi principi della fluidodinamica, i risultati ottenuti affermano che la pressione, data dalla differenza tra quella alla fine del condotto e quella dell'aria, è proporzionale alla quantità di flusso di sudore; e che la pressione secretoria delle ghiandole sudoripare aumenta in modo proporzionale con il volume di sudore secreto. Si è inoltre potuto osservare che a seconda dell'attività fisica svolta, la s-SPSG è di volta in volta maggiore in corrispondenza della zona del corpo maggiormente stimolata nell'esercizio (ad esempio, durante la cyclette la pressione maggiore si è misurata sulla coscia, mentre durante l'ellittica sull'avambraccio); inoltre le BP maggiori si sono misurate sempre durante l'attività con l'ellittica, e quelle inferiori nel periodo di rest nella sauna. Per spiegare queste osservazioni, si consideri la seguente equazione, che descrive la pressione generata localmente dalla ghiandola sudoripara:

$$P = \sigma RT \Delta C$$

(3.3)

dove σ è il coefficiente di riflessione osmotica, R la costante ideale dei gas, T la temperatura corporea e ΔC la differenza di concentrazione tra il sudore e il plasma, che definisce l'osmolarità.

In generale, è stata misurata una s-SPSG che complessivamente varia tra 1.8 ± 0.1 e 5.6 ± 0.5 kPa. Dalla misurazione della concentrazione di cloruro, svolta durante l'esperimento, è emerso che questa rimane sempre pressoché costante durante le varie fasi di esercizio, e di conseguenza si è supposto che la variazione di s-SPSG sia dovuta ai movimenti fisici dei muscoli e dei tessuti circostanti, oltre che ad altri processi fisiologici tra cui la vasodilatazione associata ad attività fisica; inoltre, dal momento che la pressione del sudore deriva dalle interazioni tra sudore e plasma nel sangue, le variazioni della temperatura corporea e del flusso sanguigno potrebbero contribuire alle differenze in s-SPSG [13].

La **temperatura**, d'altra parte, può essere misurata con metodi elettrici e colorimetrici; e rappresenta un importante parametro per compensare il rilevamento chimico nei sensori per il monitoraggio del sudore, perché ha un effetto significativo sulla quantità di reazione enzimatica [1]. Per questo motivo, molti dispositivi vengono integrati con sensori di temperatura [9].

3.3. ELABORAZIONE DEL SEGNALE

Alcune problematiche come la contaminazione della pelle e l'interferenza con altri analiti, possono influenzare il segnale anche in seguito alla sua acquisizione. In questa sezione vengono proposti dei metodi di elaborazione del segnale digitale post-acquisizione, concentrandosi maggiormente sugli espedienti che permettono di eliminare suddetti artefatti, per avere misurazioni più pulite. Ci si sposta poi, sull'esposizione di alcuni risultati in letteratura in merito alle correlazioni che sussistono tra la concentrazione di lattato misurata dal sensore, quella presente nel sangue, e il volume complessivo di sudore secreto.

3.3.1. CALIBRAZIONE DEL SENSORE

Una volta progettato il sensore, è di fondamentale importanza valutarne la calibrazione e le possibili instabilità che esso può presentare. Per questo motivo, una prima analisi, prevede di imporre al dispositivo un voltaggio in input per valutare la risposta impulsiva e misurare la corrente in uscita nel tempo, accertandosi che questa, in caso di potenziale costante, vari il meno possibile. Successivamente, per caratterizzare in modo più approfondito il sensore, si può procedere svolgendo una prima analisi "statica" del dispositivo, durante la quale viene posta una goccia di soluzione contenente lattato sull'elettrodo e poi misurata la corrente d'uscita; e una seconda analisi "dinamica", integrando il sensore con un canale fluidico che assicuri un continuo flusso di campioni sulla superficie dell'elettrodo. Di importante valore ha inoltre l'osservazione che la variabilità del tempo di risposta del sensore dipende in maniera considerevole dalla posizione in cui viene posto l'analita [10]. Altri parametri di fondamentale importanza per accertare l'attendibilità delle proprie misurazioni sono il **limite di rilevazione (LOD)**, esprimibile come il rapporto tra tre volte la deviazione standard della corrente misurata e la sensibilità dello strumento; il rapporto segnale rumore (**SNR**) e la densità spettrale di potenza (**PSD**). Questi parametri, sono stati di fondamentale importanza nella caratterizzazione di due sensori prodotti usando la tecnica di stampa 3D Aerosol Jet Printing [3], e utilizzati per la misurazione di perossido d'idrogeno [10], e di lattato in quanto hanno consentito di verificare risultati attendibili ottenuti anche in caso di concentrazioni di lattato superiori a quelle misurabili a riposo, e pari a quelle che si riscontrano durante un'attività fisica di medio-alta intensità [11].

3.3.2. INTEGRITÀ DEI DATI

Come preannunciato, la contaminazione dalla pelle, l'evaporazione del sudore e gli effetti dovuti al tasso di sudorazione possono compromettere le misurazioni effettuate dal sensore. Di seguito vengono esposti due metodi per affrontare questi problemi che interessano l'integrità e l'attendibilità dei dati che si andranno poi ad interpretare. Il primo metodo

prevede l'integrazione di elementi microfluidici all'interno del biosensore, in modo tale che il sudore, una volta entrato nei canali, venga isolato dalla superficie della pelle, prevenendo così il continuo passaggio di sostanze chimiche dalla pelle al sudore (*vedi paragrafo 2.1.2*). Un secondo procedimento, invece, prevede la misurazione simultanea di più componenti, che può aiutare a determinare se variazioni nel segnale del sensore derivano da cambiamenti nelle concentrazioni dell'analita o da effetti dovuti al tasso di sudorazione. Come già citato, anche la temperatura corporea può influenzare il segnale del sensore, e dovrebbe essere costantemente monitorata per consentire calibrizioni accurate. Ulteriori questioni in merito all'integrità dei dati sorgono quando i sensori mostrano reattività con più di un analita invece di essere perfettamente selettivi; anche in questo caso si procede con un monitoraggio simultaneo di più componenti, in modo da isolare più accuratamente quello d'interesse.

Successivamente alla fase di acquisizione, il **filtraggio** dei segnali grezzi del sensore per eliminare il rumore gioca un ruolo fondamentale nell'elaborazione del segnale stesso. Il movimento del corpo è una delle cause principali della comparsa del rumore nel segnale misurato, in quanto altera le impedenze e le conduttività all'interfaccia tra le componenti sensibili e il resto del sensore. In questi casi, il segnale viene filtrato con un filtro passa-basso per eliminare le componenti di rumore ad alta frequenza dovute al movimento o alla fluttuazione nell'ambiente dello strato sensibile.

In seguito, a seconda che il segnale sia stato misurato con tecniche potenziometriche, amperometriche o voltmetriche, si devono usare appropriate tecniche di **condizionamento** per preservare solamente le componenti del segnale di interesse, che siano esse DC, transienti, o AC, a discapito delle altre. Il condizionamento è necessario anche per minimizzare la perdita di segnale proveniente dall'elettrodo di lavoro, in quanto questo, essendo area-dipendente, è sicuramente di scarsa ampiezza [4].

3.3.3. ALCUNI RISULTATI NOTEVOLI

Si espongono ora i risultati riportati in letteratura riguardanti la relazione che sussiste tra la concentrazione di lattato nel sudore in comparazione con il volume totale di sudore prodotto e la concentrazione di lattato nel sangue. In un esperimento per testare il funzionamento di un sensore in PDMS con inserimento di un idrogel, sono stati misurati i livelli di concentrazione di lattato di otto candidati (cinque femmine e tre maschi di età comprese tra i 20 e i 28 anni), in cinque condizioni fisiche diverse: a riposo (NEX), durante e dopo un esercizio di media intensità (MEX e PMEX), e durante e dopo un esercizio di alta intensità (HEX e PHEX), queste ultime due svolte a una distanza di 24 ore dalle due precedenti. Per tutte le fasi,

ciascuna delle quali della durata complessiva di due ore, prima dell'applicazione del sensore la pelle è stata lavata con alcol e acqua deionizzata [7].

Durante lo svolgimento dell'esperienza sono stati utilizzati diversi tipi di sensori, due di questi disponevano di uno strato di idrogel interposto tra il sensore e la pelle (il primo un idrogel di glucosio 4M, mentre il secondo un idrogel PBS), mentre su un terzo vi era collocato un disco di PDMS per valutare la variazione di quantità di sudore secreto dalla pelle in risposta alla tipologia di sensore utilizzato.

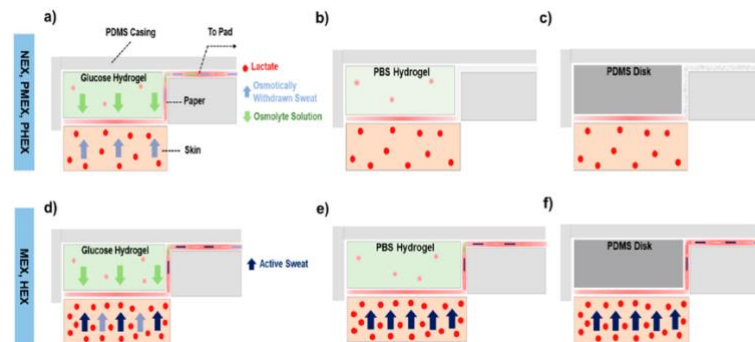


Figura 8: Schemi trasversali del trasporto del lattato usando come materiali di pompaggio due idrogel: (a, d) glucosio 4M, (b, e) PBS, e (c, f) uno strato in PDMS, nelle varie fasi dell'esperienza [7].

La *Figura 8* illustra degli schemi trasversali del trasporto del lattato del sudore con diversi materiali di pompaggio all'interfaccia con la pelle, che mostrano che il campionamento osmotico del lattato si verifica solo nel cerotto di idrogel di glucosio 4M, mentre gli altri due materiali riescono a raccogliere sudore solo da trasporto attivo; di conseguenza, per il resto della trattazione di questa esperienza si farà riferimento solo al sensore con idrogel di glucosio 4M.

Questo esperimento ha permesso di analizzare, come prima cosa, la relazione tra il volume di sudore è la concentrazione di lattato prodotta facendo uso dell'indice di correlazione di Pearson calcolato per i due eventi; in tutte le fasi, ad eccezione per la PMEX, la concentrazione di lattato aumenta linearmente con l'aumentare della quantità di sudore prodotta, e la concentrazione maggiore si è riscontrata durante la fase HEX. Il motivo per cui durante la PMEX l'indice di correlazione ha un valore negativo è probabilmente dovuto al fatto che il lattato viene riconvertito in piruvato quando il corpo diminuisce di temperatura in seguito all'esercizio e, come risultato finale, l'ammontare totale del lattato nel sudore decresce. Nella *Tabella 2* si vedono le concentrazioni di lattato misurate dal sensore con un idrogel di glucosio 4 M ipertonico.

NEX	MEX	PMEX	HEX	PHEX
9.38 mM	19.30 mM	13.08 mM	13.62 mM	3.18 mM

Tabella 2: Concentrazioni di lattato medie ricavate dall'esperimento ognuna riguardante una specifica condizione di sforzo fisico.

Da queste possiamo notare come l'esercizio fisico induca il metabolismo anaerobico, che consegue con un aumento del lattato nel sudore, e inoltre causi un rilascio di una maggiore quantità di sudore, che comporta a sua volta un incremento di lattato misurato. Come già citato, la notevole differenza riscontrata tra PMEX e MEX è dovuta alla conversione di lattato in piruvato durante il recupero fisico. La scarsa differenza tra HEX e MEX è dovuta al fatto che la secrezione di una maggiore quantità di sudore durante la fase HEX comporta che il lattato, nonostante sia presente in maggiore quantità, risulti essere più diluito. Infine dal confronto tra PHEX e PMEX possiamo dedurre che la velocità di scomparsa del lattato durante la fase di recupero da esercizio intenso sia molto più veloce della medesima fase ma in seguito a uno sforzo moderato, raggiungendo livelli basali di lattato in meno di due ore dalla fine dello sforzo.

Dalla misurazione simultanea dei livelli di lattato nel sangue, è apparsa innanzitutto una scarsa correlazione durante la fase NEX, quasi sicuramente dovuta alla mancanza di stimoli fisici; il lattato nel sudore e nel sangue, infatti, durante questa fase è dovuto principalmente all'azione delle ghiandole sudoripare situate in prossimità delle fibre muscolari di tipo I, che generano energia principalmente per vie aerobiche. Allo stesso modo, non sussiste alcuna correlazione tra lattato nel sudore e nel sangue in entrambe le fasi MEX e PMEX. Questo induce a pensare che l'origine dell'aumento della concentrazione di lattato risieda nelle ghiandole delle fibre muscolari di tipo IIa e non nel sangue. Difatti, durante la fase HEX, nella quale vengono stimulate le fibre muscolari di tipo IIa (che lavorano con entrambi i metabolismi aerobico e anaerobico) e quelle di tipo IIb (che generano energia puramente per via anaerobica), si riscontra un notevole aumento del lattato sia nel sudore che nel sangue, nel quale avviene per mantenere l'equilibrio acido-base in seguito al calo della concentrazione di ioni HCO_3^- e del pH del plasma. In conclusione, possiamo affermare che esiste una forte relazione che lega le concentrazioni di lattato nel sudore e nel sangue nel caso di forte affaticamento fisico, mentre questa non si presenta nelle altre situazioni di esercizio, nelle quali i due fenomeni risultano praticamente slegati.

4. ESPERIENZA DI LABORATORIO

In questa sezione dell'elaborato si propongono dei risultati ottenuti tramite un'analisi svolta in laboratorio di due sensori a tre elettrodi, il primo realizzato in carbonio con tecniche Screen Printing, e il secondo analogo ma funzionalizzato con il blu di Prussia, un mediatore a base di composti derivanti dal ferrocianuro, che favorisce la determinazione della quantità di perossido d'idrogeno in caso di basso potenziale di rilevamento. L'obiettivo dell'esperienza è quello di mostrare un esempio di caratterizzazione di un sensore elettrochimico amperometrico per la quantificazione di perossido d'idrogeno. Tale caratterizzazione include tre fasi differenti:

1. in una prima parte i due sensori, imbevuti di una soluzione di Ferro-ferricianide, sono stati sottoposti a voltammetria ciclica per una prima generale valutazione del loro comportamento;
2. successivamente ci si è occupato di cercare il potenziale in cui il perossido d'idrogeno si ossida o riduce, tramite l'esecuzione di una voltammetria ciclica per ogni concentrazione che viene esaminata;
3. infine il potenziale ricavato nel passaggio precedente è stato utilizzato per eseguire una serie di cronoamperometrie, anche queste una per ogni concentrazione in analisi, per valutare la risposta dei sensori.

Voltammetria ciclica con Ferro-ferricianide

Inizialmente, fornita una soluzione di Ferro-ferricianide 10mM, si è valutata la risposta generale dei due sensori quando posti a contatto con una soluzione chimica tramite voltammetria ciclica. La soluzione utilizzata è stata ottenuta diluendo 100 μ L di una soluzione di Ferro-ferricianide 100mM con 900 μ L di acqua MilliQ secondo un rapporto 1:10; per lo svolgimento della voltammetria, si è utilizzato un range di potenziale tra -0.5V e +0.5V, e sono stati considerati tre cicli. Di seguito viene illustrato l'ultimo dei tre cicli eseguiti. Il grafico mostra l'andamento delle correnti, che fornisce indicazioni fondamentali in merito al processo di ossidoriduzione della soluzione utilizzata. Dalla figura si possono individuare due risposte, una catodica e una anodica, a seconda del segno del potenziale impresso; il valore di riduzione elettrochimica corrisponde al valore misurato in seguito alla fase di crescita lineare del potenziale (primo sweep) a cui corrisponde un valore di corrente catodica; viceversa, il valore di ossidazione elettrochimica si misura nel picco di potenziale che segue a una sua diminuzione lineare, e individua così il valore di corrente anodica (secondo sweep).

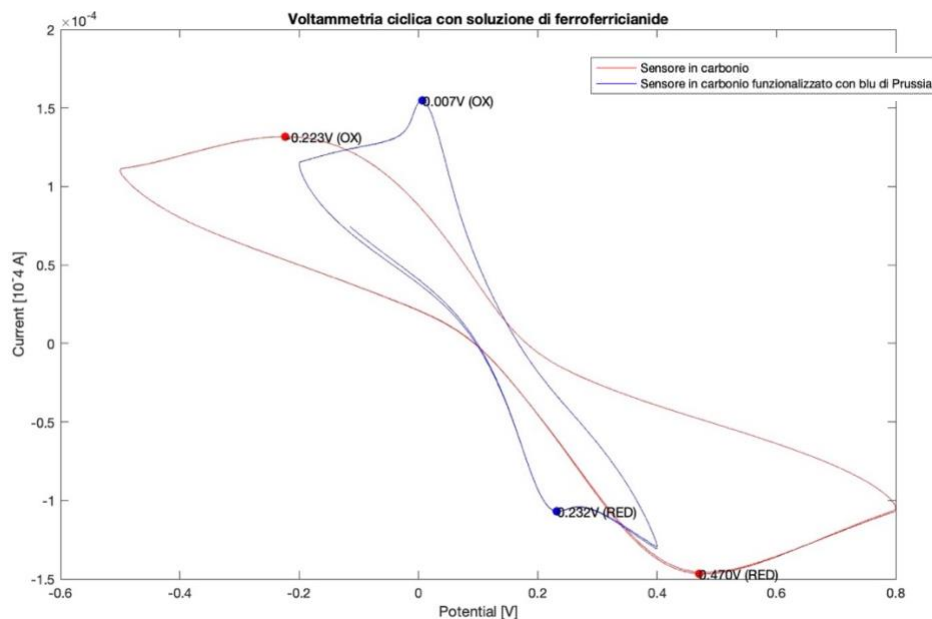


Figura 9: Curve ottenute dalla voltammetria ciclica applicata ai due sensori: quello in carbonio individuato dalla linea rossa, e quello in carbonio funzionalizzato con il blu di Prussia individuato invece dalla curva blu. I punti evidenziati riportano i rispettivi potenziali di riduzione (RED) e ossidazione (OX).

Si può notare come il sensore funzionalizzato con blu di Prussia presenti due picchi con ampiezza maggiore rispetto a quelli del sensore in carbonio; più nello specifico, i valori di potenziale di riduzione o ossidazione, con le rispettive correnti catodiche e anodiche, vengono illustrati nella tabella sottostante.

	Sensore in carbonio		Sensore con blu di Prussia	
	POTENZIALE (V)	CORRENTE (10^{-4} A)	POTENZIALE (V)	CORRENTE (10^{-4} A)
Riduzione	0.470	-1.468	0.232	-1.070
Ossidazione	-0.223	1.316	0.007	1.548

Tabella 3: Valori di potenziale e corrente dei due sensori. Al potenziale di riduzione elettrochimica corrisponde una corrente catodica, mentre al potenziale di ossidazione corrisponde una corrente anodica. Il segno della corrente dipende dal segno dell'impedenza dello strumento.

Dall'osservazione di grafico e tabella, si nota come ai potenziali di riduzione, di valore maggiore rispetto ai valori di ossidazione, corrisponde una corrente minore; viceversa per la fase di ossidazione; ciò dovuto al segno dell'impedenza dello strumento. Inoltre, da questi dati si evidenzia come la reazione di ossidoriduzione sia facilitata nel sensore funzionalizzato con blu di Prussia, e di conseguenza i valori dei potenziali redox sono minori rispetto a quelli rilevati dal sensore in carbonio. Di seguito si procede con la valutazione, tramite voltammetria ciclica, della reazione di ossidoriduzione di una soluzione di perossido d'idrogeno sui due sensori.

Voltammetria ciclica con perossido d'idrogeno

Il potenziale da usare nella cronoamperometria deve essere tale da garantire una elevata risposta in corrente, di conseguenza per la sua determinazione è necessario eseguire delle voltammetrie cicliche, una per ogni concentrazione di perossido, e individuare graficamente il voltaggio a cui corrisponde un punto di massimo nella curva. In questa sezione, dunque, si è valutato il comportamento dei due sensori in risposta a una soluzione di perossido d'idrogeno a varie concentrazioni tramite voltammetria ciclica, svolta utilizzando un range di potenziale tra -0.8V e +0.8V.

Il perossido d'idrogeno usato per l'esperienza era al 3% v/v, che in termini molari corrisponde a:

$$\frac{3 \text{ g}}{100 \text{ mol}} = \frac{3 \text{ g}}{34.0147 \text{ g/mol}} = 0.88 \text{ mol} \rightarrow \frac{0.88 \text{ mol}}{0.1 \text{ L}} = 0.9M$$

(4. 1)

Per ottenere le soluzioni da esaminare, inizialmente sono stati diluiti 100µL di perossido d'idrogeno 3% v/v in 800µL di acqua MilliQ secondo un rapporto 1:9, per ottenere prima una soluzione con concentrazione 100mM. In seguito questa è stata utilizzata per ricavare le altre soluzioni in esame tramite diluizione in acqua MilliQ secondo dei rapporti proporzionali prestabiliti, che vengono illustrati nella tabella sottostante:

Concentrazione (mM)	Rapporto	Perossido (µL)	Acqua MilliQ (µL)
100	1:1	100	0
50	1:2	100	100
20	1:5	100	400
10	1:10	100	900
5	1:20	100	1900
2	1:50	100	4900

Tabella 4: Composizione chimica della soluzione di perossido d'idrogeno utilizzata per ottenere le adeguate concentrazioni.

Di seguito vengono riportati i grafici che mostrano le voltammetrie cicliche ottenute compiendo, analogamente al caso precedente, tre cicli per ciascuna misurazione. In ciascuno di questi vengono raffigurate le sei curve rappresentative ciascuna di una specifica concentrazione di perossido, come evidenziato dalla legenda; per ciascuna curva viene preso in considerazione solamente l'ultimo ciclo. Possiamo notare come, al diminuire della concentrazione, la curva che viene registrata diminuisca gradualmente di pendenza, raggiungendo quindi valori di corrente sempre inferiori.

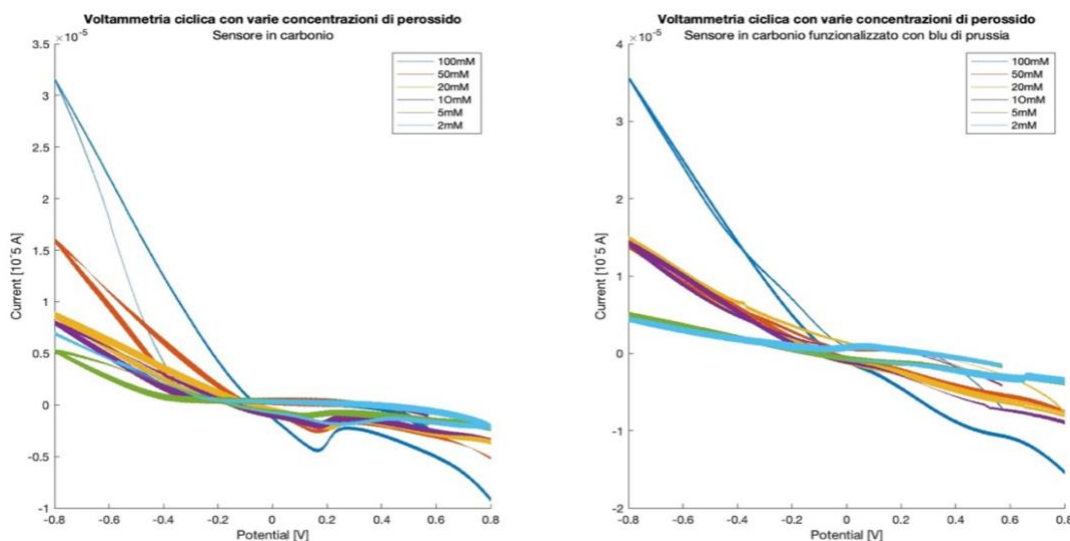


Figura 10: Ultimo ciclo delle voltammetrie cicliche svolte sui due sensori: a sinistra le curve riguardanti il sensore in carbonio, a destra quelle del sensore funzionalizzato con blu di Prussia. A ciascuna curva corrisponde una specifica concentrazione di perossido, come illustrato dalla legenda.

Dall'osservazione di questi grafici, è stato possibile stabilire che con buona approssimazione un potenziale idoneo per lo svolgimento della cronoamperometria è di 0.3V; questo potenziale è stato assunto costante sia per le misure amperometriche svolte con il sensore in carbonio, sia per quelle svolte con il sensore funzionalizzato con il blu di Prussia, in quanto a questi corrispondono con buona approssimazione potenziali di riduzione rispettivamente di $0.15 \div 0.4V$ e $0.25 \div 0.5V$. Si ritiene necessario osservare che in questo caso si è scelto di utilizzare il potenziale corrispondente al valore di riduzione elettrochimica, ma l'esperienza si sarebbe svolta analogamente se si fosse preso in considerazione il potenziale di ossidazione elettrochimica.

Una prima valutazione viene svolta sulle correnti di picco catodiche rilevabili dall'osservazione dei grafici soprariportati: si ricavano analiticamente i valori di correnti catodiche, per ciascuna concentrazione, rilevabili nel punto in cui si verifica il picco di potenziale, in questa sezione non desunto costante. L'obiettivo di questa prima analisi è valutare la presenza o meno di una relazione approssimativamente lineare che lega le correnti di riduzione catodica dei due sensori al variare delle concentrazioni in analisi. Le correnti sono state rilevate semplicemente individuando nei grafici ordinata e ascissa del punto a cui corrisponde un punto di minimo nella curva. L'utilizzo di questi dati è stato utile per l'analisi di una prima relazione di regressione lineare tra corrente catodica e concentrazione di perossido d'idrogeno analizzata; che tiene in considerazione il valore massimo in modulo della corrente al variare della concentrazione senza l'assunzione, come invece verrà svolto in seguito, di un potenziale fisso e costante. I valori ricavati sono raccolti nella tabella sottostante.

Sensore in carbonio		Sensore in carbonio con blu di Prussia	
CONCENTRAZIONE (mM)	CORRENTE CATODICA (10 ⁻⁶ A)	CONCENTRAZIONE (mM)	CORRENTE CATODICA (10 ⁻⁶ A)
2	1.7535	2	2.7750
10	1.9305	5	3.2600
20	2.0575	20	5.4550
50	2.7325	50	5.6420
100	4.4175	100	10.4550

Tabella 5: Correnti di picco ottenute graficamente dall'osservazione delle curve di voltammetria ciclica per i due sensori, al variare della concentrazione di perossido considerata.

Dall'elaborazione sono stati trascurati i dati per il sensore in carbonio e per quello funzionalizzato con blu di Prussia ricavati rispettivamente a 5mM e a 10mM, in quanto non rispondevano in modo ottimale alla crescita lineare evidenziata dall'analisi degli altri campioni.

L'interpolazione di suddetta relazione lineare è stata svolta con l'ausilio di un breve codice MatLab che restituisse, una volta forniti i valori di corrente e concentrazione in input, la retta che meglio approssima la relazione lineare che sussiste tra i valori ricavati. Più nello specifico, si è utilizzato il metodo della retta dei minimi quadrati per verificare la pendenza della retta che collega i valori di corrente catodica. I grafici della *Figura 11* di seguito riportati raffigurano la curva di calibrazione che lega l'andamento delle correnti di picco per i due sensori, sull'asse delle ordinate, alla concentrazione di perossido considerata, sull'asse delle ascisse, segnata in rosso tratteggiato. Da una prima osservazione, possiamo subito notare che non è possibile individuare una buona linearità nell'intervallo di concentrazioni tra 2mM e 100mM in quanto questo è troppo ampio; questa considerazione trova riscontro in altri articoli scientifici sulla calibrazione di sensori per il lattato, nei quali si è vista la necessità di compiere ripetute calibrazioni in diversi range di concentrazione per l'analisi dello strumento ideato [11].

Abbiamo dunque provato ad esaminare intervalli più ristretti di concentrazioni, tra 2mM e 20mM il primo, e tra 50mM e 100mM il secondo e, con un procedimento analogo al precedente, abbiamo costruito delle rette di calibrazione ciascuna per ogni intervallo, visualizzate in blu nei grafici seguenti. Vediamo che in questo caso i punti evidenziati in rosso, corrispondenti ai valori di corrente riportati nella *Tabella 5*, presi in intervalli più ristretti, sono collegati da una precisa relazione di linearità; ciò dovuto al fatto che i due sensori rispondono in modo diverso e mostrano sensibilità diversa anche al variare della concentrazione in analisi.

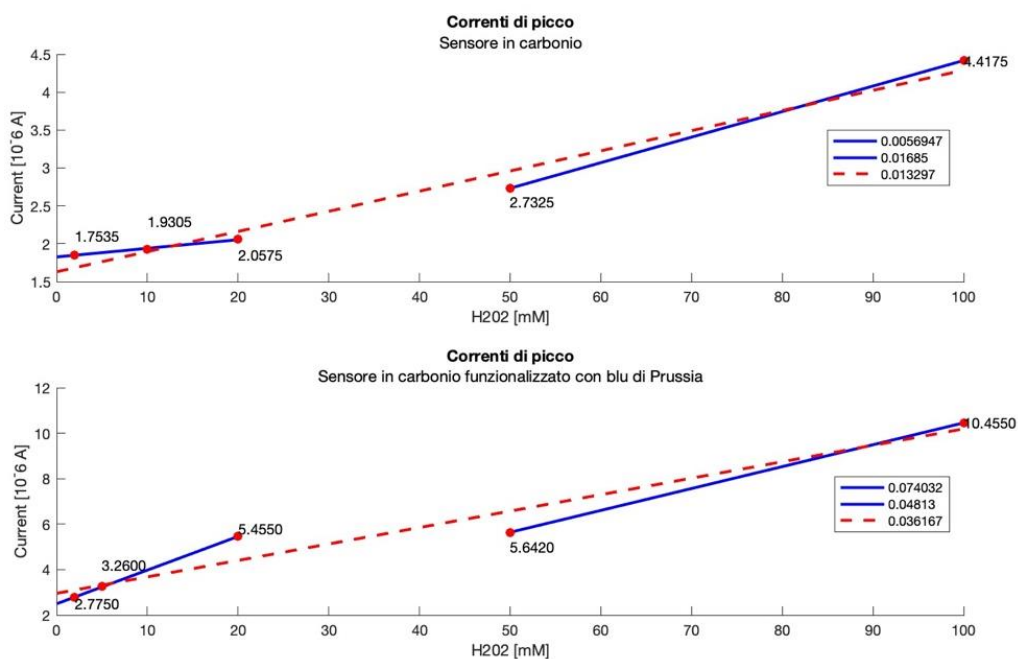


Figura 11: In rosso i valori di corrente della Tabella 5, in rosso tratteggiato la retta di interpolazione ottenuta per regressione lineare dai punti evidenziati; in blu le rette di interpolazione ottenute negli intervalli 2-20mM e 50-100mM.

Da una prima osservazione dei dati contenuti nella tabella e della seguente rappresentazione grafica è possibile notare come, a parità di concentrazione, i valori di corrente rilevati dal sensore in carbonio siano di ampiezza sensibilmente minore rispetto a quelli rilevati dal sensore con blu di Prussia.

La legenda a lato dei due grafici, riporta i coefficienti angolari delle rette evidenziate nella figura; il primo coefficiente angolare corrisponde, per entrambi i sensori, alla pendenza della retta di calibrazione tra 2mM e 20mM che vale rispettivamente **5.6947 $\mu\text{A/M}$** per il sensore in carbonio e **74.032 $\mu\text{A/M}$** per il sensore funzionalizzato con blu di Prussia. Notiamo che la notevole differenza che sussiste tra i valori dei due coefficienti si riflette in una maggiore predisposizione del sensore arricchito da mediatore a rilevare valori di corrente a concentrazioni molto basse, rispetto all'analogo senza mediatore. Il secondo coefficiente angolare riportato dalla legenda, invece, riporta il valore di pendenza della retta di interpolazione nell'intervallo tra 50mM e 100mM e vale rispettivamente **16.85 $\mu\text{A/M}$** per il sensore in carbonio e **48.13 $\mu\text{A/M}$** per il sensore con blu di Prussia. Notiamo che anche in questo caso il valore riportato per il sensore con mediatore è maggiore di quello riportato per l'analogo in carbonio, ma la sensibilità del sensore in carbonio è aumentata con l'aumentare della concentrazione, così come il valore del coefficiente angolare, mentre per il sensore con il blu di Prussia è avvenuto il contrario. Questo conferma il fatto che i sensori semplici in carbonio non sono adatti alla rilevazione di differenze di corrente in range di concentrazioni

molto piccole, mentre cominciano ad avere maggiore efficacia in range più alti; d'altra parte, la modifica con il mediatore rende i sensori in carbonio più sensibili alle basse concentrazioni. Come vedremo più approfonditamente con il proseguimento dell'esperienza, dal momento che i valori fisiologici del lattato nel sudore appartengono a un range di concentrazione tra 5 e 20mM, possiamo già notare che i sensori arricchiti con mediatore siano da preferire nell'eventualità di un'applicazione in sensoristica indossabile per il monitoraggio del lattato.

L'ultimo coefficiente angolare riportato nella figura corrisponde alla pendenza della retta ottenuta interpolando tutti i dati della *Tabella 5* in un'unica elaborazione; nonostante questi valori ci consentano di affermare una generale maggiore sensibilità del sensore arricchito con mediatore, a cui corrisponde una pendenza di $36.167 \mu\text{A/M}$, rispetto al sensore semplice in carbonio, di coefficiente angolare $13.297 \mu\text{A/M}$, la semplice valutazione di questa elaborazione non ci consente di compiere osservazioni più approfondite in merito alla sensibilità dei due sensori al variare della concentrazione considerata, e fornisce solo un risultato approssimativo e una descrizione grossolana del comportamento dei due dispositivi durante l'intera esperienza.

Passiamo ora alla valutazione dei risultati ottenuti svolgendo sui due sensori, per ciascuna concentrazione di perossido presa in analisi, una cronoamperometria che ci restituisca il valore in saturazione di corrente uscente dal sensore.

Cronoamperometria con perossido d'idrogeno

Il potenziale di riduzione di 0.3V, ricavato nella sezione precedente, viene ora utilizzato come potenziale di riferimento nella cronoamperometria: tecnica che consente di misurare il valore di corrente in uscita dai due sensori al variare delle concentrazioni di perossido d'idrogeno, mentre il potenziale è mantenuto costante. Ciascuna acquisizione svolta in questa fase è durata 60 secondi in modo da consentire al segnale di stabilizzarsi. Dall'analisi dei grafici di seguito riportati, si può notare innanzitutto che i valori di corrente misurati sono di segno negativo, il che conferma che, fornito un potenziale positivo in input, il segno della corrente erogata è determinato dal segno dell'impedenza del sensore, che dall'osservazione dei dati registrati dallo strumento risulta essere, per l'appunto, negativo. Questo porta come conseguenza il fatto che ai valori di corrente delle concentrazioni maggiori corrispondono nel grafico i valori più negativi (e quindi le curve che si trovano più sotto) e viceversa; dunque al diminuire della concentrazione corrisponde un avvicinamento allo zero della curva della corrente.

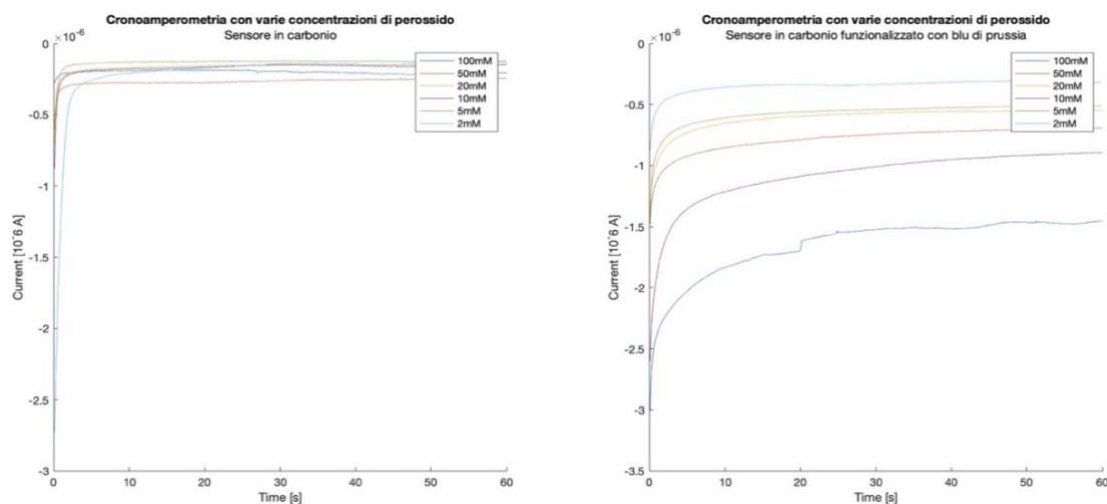


Figura 12: Curve di cronoamperometria rilevate per i due sensori forniti di un potenziale in input costante e pari a 0.3V. L'asse delle correnti misura valori negativi, di conseguenza le correnti dovute alle concentrazioni maggiori sono quelle di valore minore (con segno) e viceversa.

Notiamo innanzitutto che il sensore in carbonio, a parità di potenziale, rileva valori di corrente in modulo inferiori rispetto a quelli evidenziati dal sensore con mediatore. Dall'analisi dei due grafici, si vede che per il sensore in carbonio (grafico a sinistra) i valori rilevati sono tutti compresi nell'intervallo $0.1 \div 0.3 \mu\text{A}$; mentre nel grafico a destra, riguardante il sensore in carbonio funzionalizzato con blu di Prussia, i valori si distribuiscono nel range $0.4 \div 1.6 \mu\text{A}$. Questo ci consente di affermare che le correnti rilevate dal sensore con il mediatore sono in media maggiori di quelle rilevate da un normale sensore di carbonio, grazie alla caratteristica del mediatore di facilitare il trasporto degli elettroni tra soluzione ed elettrodo. Si nota come questa caratteristica del sensore funzionalizzato con il blu di Prussia rimanga inalterata anche in caso non si considerino solamente le correnti di picco, ma si prendano in analisi valori di corrente corrispondente a un potenziale fissato, che può non corrispondere precisamente al potenziale di riduzione per data concentrazione.

L'ultima parte dell'esperienza consiste nel verificare analiticamente la relazione che sussiste tra corrente emessa e concentrazione di perossido in analisi. Per fare ciò, è stato sviluppato un breve codice MatLab, con il quale si sono calcolati per entrambi i sensori i valori medi di corrente calcolati sugli ultimi 50 campioni, corrispondenti agli ultimi cinque secondi di acquisizione, in modo che la corrente si stabilizzi e che si esauriscano i fenomeni transitori. Di questi si prende, per ciascuna concentrazione di perossido, il loro valore assoluto, in modo da ricavare poi una relazione di regressione lineare. Nella tabella sottostante vengono riportati i valori di corrente ricavati per le varie misurazioni, da cui si può notare che, come accennato precedentemente, la corrente del sensore funzionalizzato è sempre maggiore rispetto a quella misurata dall'altro dispositivo.

Sensore in carbonio		Sensore in carbonio con blu di Prussia	
CONCENTRAZIONE (mM)	CORRENTE (10^{-7} A)	CONCENTRAZIONE (mM)	CORRENTE (10^{-7} A)
2	1.2346	2	3.1966
5	1.2933	5	5.1462
10	1.5110	10	8.9843
100	2.0875	100	14.6720

Tabella 6: Correnti medie ottenute dagli ultimi 50 campioni acquisiti durante la misurazione, corrispondenti agli ultimi 5 secondi di acquisizione.

Si passa ora alla visualizzazione della curva di regressione lineare ottenuta dall'interpolazione dei dati contenuti nella tabella soprastante. L'asse delle ascisse riporta il valore delle concentrazioni di perossido; sull'asse delle ordinate, invece, vengono riportati i valori della corrente media ottenuta tenendo in considerazione gli ultimi 5 secondi di acquisizione, corrispondenti agli ultimi 50 campioni rilevati dallo strumento. Questa discriminazione rispetto ai valori iniziali consente di escludere l'influenza dei fenomeni transitori, che avvengono nei primi secondi di acquisizione, e permangono finché la curva di corrente non si stabilizza al proprio valore di regime. Nei grafici sotto riportati vengono messe in evidenza due rette, la prima evidenziata in blu, esplicitativa della relazione tra corrente a 0.3V e concentrazione di perossido tra 2mM e 10mM, mentre la seconda rappresentativa della relazione tra corrente a 0.3V e concentrazioni maggiori di perossido, da 10mM a 100mM.

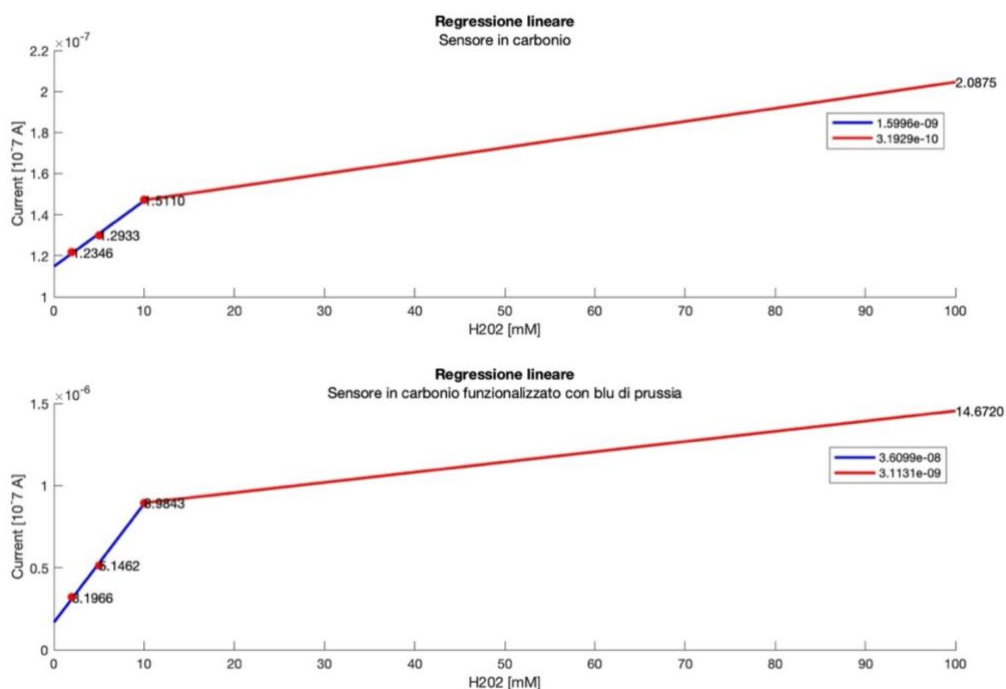


Figura 13: Rette di regressione lineare, in blu per concentrazioni tra 0 e 10mM, in rosso per concentrazioni maggiori di 10mM, ottenuta dall'interpolazione dei valori di corrente medi misurati per entrambi i sensori negli ultimi 5 secondi di acquisizione (50 campioni) ottenuti tramite cronopotenziometria usando come potenziale costante 0.3V

Dall'osservazione delle rette di interpolazione, notato che i valori di corrente sono raffigurati in ordine crescente di concentrazione, e che le rette ottenute sono entrambe monotone strettamente crescenti; si può affermare che il valore di corrente erogata dal sensore è direttamente proporzionale alla concentrazione di perossido utilizzato. In questa sezione si è scelto di visualizzare due rette di interpolazione distinte per le due correnti per evidenziare come, a conferma dei grafici riportati nella *Figura 11*, esista una precisa relazione lineare tra valori di corrente a basse concentrazioni di perossido e successivamente tra valori di corrente a concentrazioni più alte. Il motivo per cui si verifica questo fenomeno, è dovuto a un effetto di saturazione che si osserva alle alte concentrazioni, e che porta come conseguenza il verificarsi di un minore aumento di corrente, a parità di differenza di concentrazione. Un risultato analogo è stato ottenuto nella caratterizzazione di un sensore ottenuto con tecnica di stampaggio Aerosol Jet printing [11]. La legenda posta a lato dei grafici evidenzia i coefficienti angolari delle due rette per ciascun sensore, che vengono riportati anche nella tabella sottostante. Oltre al fenomeno sopraesposto dovuto alla saturazione, si osserva che anche in questo caso, la pendenza delle rette di caratterizzazione ottenute dal sensore funzionalizzato con blu di Prussia sono maggiori di quelle derivate dal sensore in carbonio.

Sensore in carbonio		Sensore in carbonio con blu di Prussia	
0-10mM	1.5996 $\mu\text{A/M}$	0-10mM	36.099 $\mu\text{A/M}$
10-100mM	0.31929 $\mu\text{A/M}$	10-100mM	3.1131 $\mu\text{A/M}$

Tabella 7: Coefficienti angolari delle rette di interpolazione per i due sensori.

Notiamo come in entrambi i casi la pendenza della retta diminuisca sensibilmente alle alte concentrazioni a causa del fenomeno di saturazione, concludendo che un processo di linearizzazione della relazione tra queste e la corrente erogata dal sensore è ottimale ed efficace solo se applicato ad un range di concentrazioni ristretto. Vediamo inoltre che, nonostante il sensore funzionalizzato con blu di Prussia mostri una maggiore efficacia rispetto a quello in carbonio in entrambi i casi di valutazione, risulti approssimativamente meno efficace nella rilevazione di valori elevati di correnti ad alte concentrazioni. Mentre, per quanto riguarda il sensore in carbonio, notiamo che in questo caso la pendenza della retta tra 10mM e 100mM è minore di quella tra 0 e 10mM, a differenza di quanto osservato nella *Figura 11*, nella quale si era evidenziato un aumento di sensibilità alle alte concentrazioni, che si rifletteva in un aumento di pendenza nella retta tra 50mM e 100mM rispetto a quella a concentrazioni inferiori (tra 2 e 20mM). Il motivo di questa apparente discordanza risiede nuovamente nell'intervallo di concentrazioni in analisi: in questo ultimo esempio stiamo

prendendo un intervallo di concentrazioni relativamente ampio, che copre valori tra 10mM e 100mM, e che quindi non consente di visualizzare appropriatamente il fenomeno di aumento di sensibilità del sensore in carbonio, verificato in precedenza per concentrazioni superiori di 50mM, ma risente principalmente dell'effetto di saturazione di corrente, e di conseguenza la pendenza della retta diminuisce. Notiamo, però, che dal confronto dei due sensori il fenomeno di aumento di sensibilità ha degli effetti sul sensore in carbonio, in quanto questo subisce una diminuzione di pendenza dovuta alla saturazione notevolmente inferiore di quanto avviene per il sensore con mediatore.

In merito a questa osservazione possiamo compiere le seguenti valutazioni, che fanno puramente riferimento ai dati ricavati dall'esperienza in analisi e vengono esposte per illustrare in maniera più semplice le osservazioni svolte durante l'esperienza. Per il sensore in carbonio, le pendenze delle rette ad alte e basse concentrazioni stanno tra loro in un rapporto indicativamente pari a 1:5, il che significa che, all'aumento di un fattore 1 rilevato ad alte concentrazioni corrisponde un aumento di un fattore 5 a basse concentrazioni, a parità di differenza di concentrazione tra le due misure; con un ragionamento analogo, per il sensore arricchito da mediatore il rapporto diventa 1:12, a conferma che un rapporto maggiore comporta maggiore discriminazione tra le misure ricavate. Se invece valutiamo i rapporti tra le pendenze rilevate dai due sensori per le medesime concentrazioni vediamo che i coefficienti angolari delle due rette nell'intervallo 0-10mM rispettivamente per il sensore in carbonio e il sensore funzionalizzato con blu di Prussia stanno tra loro in rapporto 1:23, il che significa che, a parità di concentrazione, all'aumento di un fattore 1 di corrente nel sensore in carbonio corrisponde un aumento di un fattore 23 nel sensore con mediatore, mentre nell'intervallo tra 10 e 100mM il rapporto si riduce a 1:10.

Nonostante questa apparente diminuzione di efficacia di entrambi i sensori in riferimento a misurazioni svolte a concentrazioni elevate, facciamo notare che le concentrazioni fisiologiche di lattato presenti nel sudore sono comprese in un range di concentrazioni tra 5 e 20 mM (*vedi paragrafo 1.1 Tabella 1*), per cui per la valutazione dell'efficacia di rilevazione dei due sensori fanno maggiore riferimento le misurazioni rilevate per concentrazioni di perossido inferiori. Possiamo quindi affermare che i vantaggi risultanti dall'utilizzo del sensore funzionalizzato con il blu di Prussia comprendono: un range più ampio di correnti misurabili, e una maggiore discriminazione nel valore di corrente rilevata, tra valori prossimi di concentrazione. In poche parole, il sensore in carbonio rileva efficacemente diversi valori di corrente a seconda della concentrazione in analisi, ma restituisce in output una corrente molto piccola in ampiezza, e poco diversa da quelle restituite a valori prossimi di

concentrazione; inoltre lavora meglio a concentrazioni più elevate, che non corrispondono ai valori fisiologici di concentrazione di lattato. D'altra parte, il sensore con il blu di Prussia è in grado di emettere in output una corrente maggiore in ampiezza, e la differenza tra due misurazioni di corrente rilevate a concentrazioni simili di perossido è maggiore.

L'esperienza svolta ci mostra come la corrente in output mantenga un valore costante, in seguito all'esaurimento di fenomeni transitori, e proporzionale alla concentrazione esaminata; e inoltre aumenti con l'aumentare della concentrazione in analisi, ma in modo diverso a seconda del range di concentrazione considerato. Si può altresì affermare come i sensori in carbonio rappresentino di base una valida alternativa alla rilevazione di segnali tramite le tecniche utilizzate, che riguardano l'analisi e il monitoraggio delle concentrazioni di perossido d'idrogeno; ma che questi risultino essere ancora più efficienti quando arricchiti da un mediatore che favorisca la rilevazione di corrente anche a potenziali molto bassi. Nel caso di un biosensore, questo potrebbe agevolare l'utilizzo e l'efficacia dello strumento in quanto le concentrazioni di sudore rilasciate dal corpo umano sono molto basse e di conseguenza si vede la necessità di una componente che riesca a rilevare cambiamenti significativi di concentrazione anche in questi casi. Possiamo infine affermare che, considerando il perossido d'idrogeno come il prodotto della reazione di ossidoriduzione del lattato, si possono utilizzare queste metodologie per il monitoraggio dei livelli di acido lattico prodotti durante le varie fasi del giorno.

5. CONCLUSIONI

Riassumendo quanto esposto in questo elaborato, i biosensori indossabili per il monitoraggio di analiti, in questo caso lattato, situati nel sudore secreto dalle ghiandole eccrine durante i vari processi fisiologici quotidiani, rappresentano una valida prospettiva futura per il monitoraggio giornaliero, autonomo e real-time dei parametri fisici del soggetto che lo utilizza. L'esposizione di alcuni risultati ottenuti in studi su volontari adulti, ha evidenziato una possibile relazione tra la concentrazione di lattato nel sudore, e quella di lattato nel sangue, che avviene solamente nella circostanza in cui lo sforzo fisico coinvolga anche le fibre muscolari di tipo II, che operano in condizioni anaerobiche; mentre altri studi hanno evidenziato una correlazione tra l'intensità dello sforzo fisico attuato e la pressione con la quale il sudore viene secreto dalle ghiandole sudoripare, legato anche alla parte corporea in cui è stato indossato il sensore. Le possibilità di poter ricostruire dei legami che descrivano l'interdipendenza di suddetti parametri fisici, si prospetta di fondamentale importanza nell'ipotesi di un impiego quotidiano di questi strumenti, ed è dunque attualmente oggetto di studio. Si è inoltre evidenziato come uno dei materiali più idonei alla progettazione di questi dispositivi sia il carbonio; e come l'aggiunta di componenti ausiliari come idrogel e pilocarpina possano favorire l'escrezione, e di conseguenza il raccoglimento, del sudore, mentre altri tra cui il blu di Prussia, consentano di ottenere risultati in corrente migliori e più facilmente utilizzabili per essere poi elaborati ed interpretati, come si è evidenziato nell'esperienza di laboratorio. Nel complesso sono state individuate numerose tecniche per la progettazione ottimale di questi sensori; permangono però ancora alcune criticità, la maggior parte legate alla sperimentazione in vivo, che è opportuno valutare per assicurarsi che questi dispositivi possano essere utilizzati universalmente; tra queste si citano differenza di età e sesso tra i potenziali utilizzatori, che può risultare in una differente composizione chimica del sudore; la ancora poca conoscenza dei metodi migliori per un efficiente supporto elettrico dello strumento; e la difficoltà di garantire una elevata sensibilità allo strumento, evitando che questo possa influenzare negativamente le misure qualora vi siano disturbi aggiuntivi dovuti ai movimenti del corpo. Si può concludere affermando che, una volta superate queste criticità, la produzione di suddetti dispositivi produrrebbe un sistema di monitoraggio di alta accettazione clinica, stabile e a basso costo, e potrebbe per questi motivi svolgere un ruolo fondamentale nel monitoraggio della salute quotidiana e delle attività atletiche, nonché nella prevenzione, diagnosi, trattamento e prognosi delle malattie.

BIBLIOGRAFIA

1. Wenzheng Heng, Geng Yang, Woo Soo Kim, Kaichen Xu, Emerging wearable flexible sensors for sweat analysis (2021);
2. Q. Zhai, W. Cheng, Soft and stretchable electrochemical biosensors (2019);
3. Ashish Kalkal, Sumit Kumar, Pramod Kumar, Rangadhar Pradhan, Magnus Willander, Gopinath Packirisamy, Saurabh Kumar, Banshi Dhar Malhotra, Recent advances in 3D printing technologies for wearable (bio)sensors (2021);
4. Mallika Bariya, Hnin Yin Yin Nyein, Ali Javey, Wearable sweat sensors (2018);
5. Fahmida Alam, Sohini RoyChoudhury, Ahmed Hasnain Jalal, Yogeswaran Umasankar, Shahrzad Forouzanfar, Naznin Akter, Shekhar Bhansali, Nezhil Pala, Lactate biosensing: the emerging point-of-care and personal health monitoring (2018);
6. Pei-Heng Lin, Sian-Chen Sheu, Chien-Wei Chen, Sheng-Cih Huang, Bor-Lan Li, Wearable hydrogel patch with noninvasive, electrochemical glucose sensor for natural sweat detection (2022);
7. Tamoghna Saha, Jennifer Fang, Sneha Mukherjee, Charles T. Knisely, Michael D. Dickey, Orlin D. Velev. Osmotically enabled wearable patch for sweat harvesting and lactate quantification (2021);
8. Tamoghna Saha, Jennifer Fang, Murat A. Yokus, Sneha Mukherjee, Alper Bozkurt, Michael A. Daniele, Michael D. Dickey, Orlin D. Velev. A wearable patch for prolonged sweat lactate harvesting and sensing (2021);
9. Juliane R. Sempionatto, Muiyang Lin, Lu Yin, Ernesto Del al paz, Kexin Pei, Thitaporn Sonsard, Andre N. de la Loyola Silva, Ahmed A. Korshed, Fangyu Zhang, Nicholas Tostado, Sheng Xu, Joseph Wang. An epidermal patch for the simultaneous monitoring of hemodynamic and metabolic biomarkers (2021);
10. Tiziano Fapanni, Emilio Sardini, Mauro Serpelloni, Sarah Tonello. Nano-functionalized electrochemical sensors by aerosol jet printing (2022);
11. Sarah Tonello, Tiziano Fapanni, Stefano Bonaldo, Giada Giorgi, Claudio Narduzzi, Alessandro Paccagnella, Mauro Serpelloni, Emilio Sardini, Sandro Carrara. Amperometric measurements by a novel aerosol jet printed flexible sensor for wearable applications (2023);
12. A. M. Vinu Mohan, Vinoth Rajendran, Rupesh K. Mishra, Mathiyarasu Jayaraman. Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors (2020);
13. Jungil Choi, Yeguang Xue, Wei Xia, Tyler R. Ray, Jonathan T. Reeder, Amay J. Bandodkar, Daeshik Kang, Shuai Xu, Yonggang Huang, John A. Rogers. Soft, skin-mounted microfluidic systems for measuring secretory fluidic pressures generated at the surface of the skin by eccrine sweat glands (2017).