



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“SENSORI PER IL MONITORAGGIO DELLA COMPOSIZIONE DEL
SUDORE E LORO UTILIZZO IN AMBITO SPORTIVO”**

Relatore: Prof.ssa Sarah Tonello

Laureanda: Gaia Bortolussi

ANNO ACCADEMICO 2021 –2022

20 settembre 2022

INDICE

ABSTRACT	1
1 INTRODUZIONE	2
2 SUDORE	3
2.1 La ghiandola sudoripara eccrina	3
2.2 Secrezione e composizione chimica del sudore	5
2.3 Sudore ed esercizio fisico	6
3 BIOSENSORI PER IL SUDORE	9
3.1 Introduzione ai biosensori	9
3.2 Integrazione con microfluidica	10
3.3 Classificazione dei principali biosensori	13
4 BIOSENSORI ELETTROCHIMICI	15
4.1 Trasduttori amperometrici	16
4.2 Trasduttori voltammetrici	18
4.3 Trasduttori conduttimetrici	19
4.4 Trasduttori impedimetrici	19
4.5 Trasduttori potenziometrici	19
5 BIOSENSORI OTTICI	22
5.1 Sensori colorimetrici	23
5.2 Sensori a fluorescenza	28
6 LIMITAZIONI E CRITICITÀ	34
6.1 Problemi legati al biofluido	34
6.2 Problemi relativi al design e ai biosensori	37
6.3 Problemi legati all'elettronica	39
7 SFIDE FUTURE	42
7.1 Progressi futuri legati al biofluido	42
7.2 Progressi futuri legati ai biosensori	43
7.3 Algoritmi per la raccolta dei dati e commercializzazione dei dispositivi	47
8 CONCLUSIONE	48
9 BIBLIOGRAFIA	49

ABSTRACT

Lo sport praticato a livelli agonistici richiede l'utilizzo di tecnologie che possano aiutare l'atleta a verificare il proprio stato di allenamento.

L'utilizzo di sensori indossabili può essere utile per prevenire infortuni, per migliorare le prestazioni e per monitorare il recupero a seguito di un periodo di stop. Le tecnologie utilizzate in ambito sportivo sono molto ampie; la tesi verterà principalmente sui sensori che utilizzano il sudore e la sua composizione come fonte di segnale. Il sudore, infatti, è una sorgente importantissima di informazioni sullo stato di idratazione e di affaticamento della persona.

Inoltre, si analizzeranno le principali criticità dei metodi studiati e le principali sfide da affrontare per migliorarli.

Sport played at a professional level requires the use of technologies that can help the athlete to check his training status.

Wearable sensors can be very useful in preventing injuries, improving performance and monitoring recovery after a long period of inactivity. Technologies used in sport industry offer a wide and varied range of solutions; this thesis will mainly focus on sweat sensors, that use sweat composition as a signal source. Indeed, sweat is a very important source of information on the hydration status and fatigue of the athlete. Furthermore, this study will examine the leading issues of the analysed methods and the main challenges to be faced in order to improve the techniques.

1 INTRODUZIONE

Praticare sport ad alto livello richiede allenamenti e protocolli personalizzati oltre che strumenti che consentano di monitorare lo stato di affaticamento dell'atleta. Il progredire delle tecnologie e l'accelerazione nello sviluppo di dispositivi indossabili hanno consentito ad atleti e allenatori di tenere sotto controllo la preparazione dello sportivo, permettendo di migliorare le prestazioni, di prevenire infortuni e favorire il ritorno all'allenamento in seguito a periodi di stop.

Un sensore indossabile è uno strumento libero da cavi per la rilevazione continua e non invasiva di biosegnali, analiti e forze biomeccaniche per monitorare la salute e le performance. I sensori indossabili permettono il continuo monitoraggio dell'atleta da parte dell'allenatore che ha così a disposizione i dati dell'allenamento in tempo reale. È inoltre possibile analizzare le prestazioni anche una volta terminate, grazie a sezioni di post analisi che consentono di pianificare le prossime sessioni di allenamento in base ai dati raccolti.

I sensori utilizzati possono prelevare varie tipologie di segnale e possono avere funzionalità e meccanismi diversi. Vengono utilizzati ad esempio sensori che rilevano la posizione e il profilo di movimento dell'atleta, come sensori basati sull'utilizzo di GPS che permettono agli allenatori di determinare meglio l'affaticamento fisico dell'atleta in tempo reale. Esistono poi sensori in grado di rilevare lo sforzo su una superficie che consentono di captare il danno subito da un atleta durante un urto e prevenire eventuali infortuni. Infine, per la valutazione di valori fondamentali da controllare in uno sportivo, si utilizzano sensori che rilevano il battito cardiaco, sensori che rilevano l'ossigenazione dei muscoli e sensori che rilevano la qualità del sonno.

In aggiunta ai più tradizionali parametri vitali (e.g. frequenza cardiaca, pressione, frequenza respiratoria), un crescente interesse è stato recentemente rivolto allo studio della variazione di specifici biomarcatori chimici contenuti all'interno del sudore. Il monitoraggio dei cambiamenti di concentrazione di ioni, metaboliti e proteine all'interno del sudore possono infatti risultare molto utili per valutare l'affaticamento dell'atleta. Il sudore permette inoltre di valutare lo stato di idratazione dell'atleta e di quantificare la perdita di elettroliti dovuta alla termoregolazione. Le informazioni ottenute dal sudore vengono poi utilizzate per reintegrare le sostanze perse e per valutare lo sforzo compiuto dall'atleta. [1]

2 SUDORE

La maggior parte dei dispositivi indossabili rilevano i principali parametri vitali (e.g. frequenza cardiaca) e quantificano l'attività fisica tramite un monitoraggio del movimento (e.g. numero passi, velocità, distanza percorsa). Tuttavia, ad oggi, la maggior parte degli strumenti non consente di portare informazioni circa lo stato di idratazione o il profilo biochimico dell'atleta, aspetti fondamentali per garantire un ottimale stato di salute in condizioni di esercizio fisico. Ci sono molti biofluidi candidati per far fronte a questa mancanza ma quasi tutti hanno delle forti limitazioni dovute all'indossabilità delle tecnologie utilizzate per rilevarli; il sangue e il liquido interstiziale possono essere infatti monitorati attraverso dispositivi impiantabili, ma sono difficilmente accessibili attraverso dispositivi meno invasivi. Per ovviare a questo problema l'attenzione si è spostata su fluidi biologici facilmente accessibili, come le lacrime, la saliva e il sudore. Tra di essi il sudore rappresenta sicuramente quello più promettente in quanto facilmente prelevabile dalla superficie della pelle e ricco di potenziali biomarcatori correlati a vari processi pato-fisiologici.

Con una composizione prevalentemente acquosa, il sudore è secreto in quantità media di 500-800 ml al giorno dalle ghiandole sudoripare che, essendo presenti su tutti i distretti cutanei, lo riversano sulla cute. La secrezione del sudore prende il via in seguito ad un meccanismo di termoregolazione che permette al corpo di raffreddarsi. Viene utilizzato anche in parte con funzione renale, consentendo di eliminare una certa quantità di urea e di metaboliti; serve inoltre a inumidire le superfici sottoposte ad attrito, permettendo una migliore presa e sensibilità tattile.

[2]

2.1 La ghiandola sudoripara eccrina

Esistono tre tipi diversi di ghiandole del sudore: la ghiandola eccrina, la ghiandola apocrina e la ghiandola apoecrina. Le ghiandole apocrine secernono un sudore ricco di lipidi utilizzato per la produzione di ferormoni mentre le ghiandole apoecrine sono limitate nella distribuzione come le apocrine ma secernono un sudore simile a quello eccrine la cui funzione è ancora sconosciuta, ma non viene utilizzato per la termoregolazione; per questo la trattazione si concentrerà sulle ghiandole eccrine.

Le ghiandole eccrine sono le più numerose e sono le responsabili della maggior parte della sudorazione. L'uomo possiede circa 2-5 milioni di ghiandole eccrine, con densità massima sulla fronte, sui palmi delle mani e sulla pianta dei piedi; non esistono differenze di numero legate al sesso. Le ghiandole sudoripare eccrine sono ghiandole tubulari semplici di tipo glomerulare di varie dimensioni. La parte secernente è posta in profondità dove il tubulo forma un gomito

(glomerulo) il cui diametro varia da qualche decimo di millimetro ad un millimetro. Ogni ghiandola raggiunge la superficie cutanea per mezzo di un dotto escretore che, dopo aver attraversato con un tragitto sinuoso il derma e l'epidermide, va ad aprirsi in corrispondenza di una cresta epidermica. Il glomerulo è costituito da una membrana basale sulla cui superficie interna si addossa uno strato di cellule mioepiteliali, a sua volta sormontato da uno strato di cellule epiteliali secernenti, distinte al microscopio elettronico in cellule chiare e scure.

Le cellule chiare, sierose, di forma piramidale sono responsabili dell'elaborazione della componente idrosalina del sudore. Le cellule scure, mucoidi, contengono nel citoplasma numerose piccole gocce di materiale mucoide che, una volta secreto, si distribuisce sulla superficie interna del dotto escretore; la funzione di tale materiale è quella di legare alcuni elettroliti rendendone possibile il riassorbimento.

Il dotto escretore nel tratto intradermico è tappezzato da due strati di cellule epiteliali. Le cellule dello strato profondo, a contatto con la membrana basale, hanno struttura simile alle cellule chiare e delimitano i capillari di secrezione intercellulari. Le cellule che raggiungono il lume presentano, al loro polo apicale, un orletto a spazzola formato da una fitta serie di microvilli al cui livello avviene il riassorbimento selettivo di elettroliti, rendendo così il sudore ipotonico rispetto al plasma.

Gli orifizi dei dotti escretori delle ghiandole sudoripare eccrine, sulle creste epidermiche, sono spesso provvisti di una laminetta cornea basculante che li maschera e li protegge dall'ingresso di microrganismi e materiale estraneo. I pori si rendono evidenti durante la sudorazione per la presenza di piccole gocce di secreto. [3]

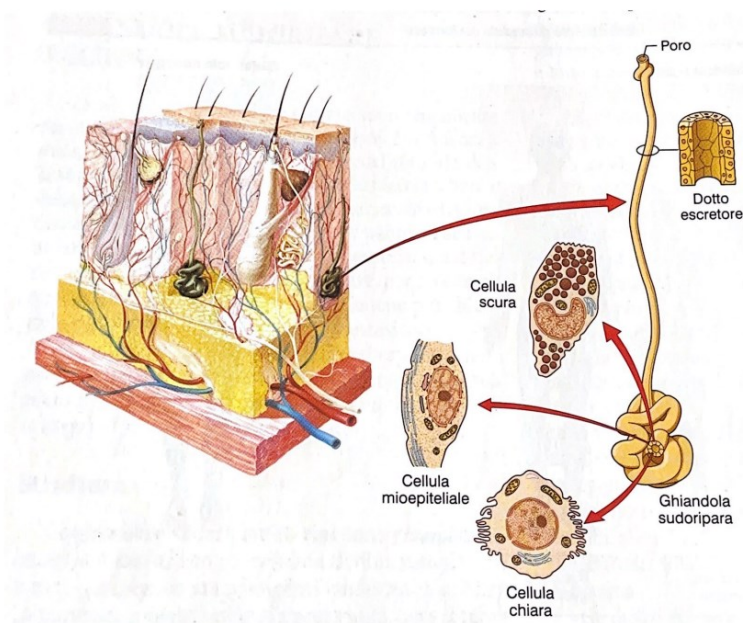


Figura 1 Rappresentazione schematica dell'organizzazione strutturale di una ghiandola sudoripara eccrina [3]

2.2 Secrezione e composizione chimica del sudore

A differenza di quanto avviene nelle ghiandole sebacee, che sono olocrine, la produzione di secreto nelle ghiandole sudoripare si realizza senza distruzione cellulare o perdita di citoplasma. Il sudore eccrino è un liquido inodore, incolore, limpido, costituito in gran prevalenza da acqua (98-99%), con composizione variabile dei soluti in base al sito corporeo (1-2%).

Dei soluti $\frac{3}{4}$ sono dati da sostanze inorganiche, prevalentemente cloruro di sodio (NaCl) e $\frac{1}{4}$ da sostanze organiche come urea, acido urico, acido lattico, creatinina. La densità del sudore oscilla tra 1.002-1.006 e il pH da 5 a 7,5.

La secrezione del sudore è discontinua, con un ritmo periodico alternato nei vari gruppi di ghiandole e indotto da vari tipi di stimoli. Il calore, per esempio, induce la sudorazione della fronte, del collo, del dorso, del torace e del dorso delle mani; stimoli emozionali determinano intensa sudorazione dei lati del tronco, delle ascelle, delle palme delle mani e delle piante dei piedi. La quantità di sudore secreta nelle 24 ore è variabile, potendo raggiungere anche in casi estremi 10-12 litri.

La principale funzione svolta dalle ghiandole eccrine è la termoregolazione per mezzo dell'evaporazione del sudore che, sottraendo calore al corpo, ne determina il raffreddamento.

Il passaggio dell'acqua liquida a gassosa, con l'evaporazione del sudore sulla superficie cutanea, causa un abbassamento della temperatura della superficie stessa e di conseguenza del sangue che circola nei capillari più superficiali. La sudorazione entra in gioco anche nella regolazione dell'equilibrio idrico dell'organismo e favorisce, grazie alla partecipazione della componente acquosa, la formazione del film idrolipidico cutaneo. È inoltre un'importante via di escrezione per l'organismo, aiutando i reni nella loro funzione. [3]

I due elementi essenziali nella composizione del sudore e quindi della reintegrazione delle sostanze perse sono il sodio e il potassio. Il sudore contiene all'incirca 50 mmol/L di Na^+ e circa 5 mmol/L di K^+ . Il sodio contribuisce alla osmolalità del plasma e del liquido extracellulare, forma gradienti elettrochimici a livello di membrana e fa parte di un sistema omeostatico che interessa tutto l'organismo. Le perdite giornaliere di sodio sono modeste, ma queste aumentano con un'elevata attività fisica. Anche il potassio viene perso attraverso il sudore, seppur in quantità minori rispetto al sodio; per questo i supplementi idrici spesso contengono oltre all'acqua e al sodio anche potassio ed altri elettroliti. [4]

Un altro elemento prezioso da reintegrare in caso di forte diminuzione è lo zinco; la diminuzione non controllata di questo analita può compromettere le funzionalità della muscolatura scheletrica, influenzare le funzioni cardiorespiratorie durante l'esercizio e peggiorare le prestazioni sportive. [5]

I componenti organici del sudore come l'urea, il lattato e l'ammoniaca svolgono un'azione importante nello stabilire la condizione di salute e di affaticamento dell'atleta.

Il lattato e l'ammoniaca, ad esempio, permettono di valutare il passaggio da una condizione aerobica ad una anaerobica dell'individuo mentre l'urea serve per controllare il corretto funzionamento renale.

L'importanza dell'analisi del sudore e quindi delle quantità perse dei singoli elettroliti è data dal fatto che assumere in maniera incontrollata gli ioni persi non solo può essere inefficace in termini di reintegrazione ma anche provocare danni a livello di salute. Il sodio, per esempio, se consumato in eccesso e senza un adeguato controllo può provocare ipertensione arteriosa. [4]

Analyte	Health Condition
Lactate	Shift from aerobic to anaerobic metabolic conditions
pH	Pathogenesis of skin diseases, wound healing
Sodium Chloride	Dehydration, Cystic fibrosis
Ammonia	Shift from aerobic to anaerobic metabolic conditions
Glucose	Diabetes
Ethanol	Inebriation
Urea/Uric Acid	Renal dysfunction
Creatinine	Renal dysfunction
Cortisol	Stress
Iron, Copper	Sports anemia

Figura 2 Lista dei principali analiti presenti nel sudore umano e le conseguenze associate alla loro variazione [6]

2.3 Sudore ed esercizio fisico

Durante l'attività fisica acqua ed elettroliti vengono persi in conseguenza alla termoregolazione in maniera differente da individuo a individuo. In alcune situazioni, come nel caso di esercizio intenso, prolungato e in ambienti caldi, la perdita di sudore può essere tale da provocare degli scompensi di acqua e analiti che causano un impatto nelle performance sportive. È per questo motivo che le informazioni ricavate dalla composizione del sudore possono aiutare gli atleti a recuperare le sostanze perse in maniera controllata. [7]

Il sudore prodotto dall'attività motoria, che differisce in composizione da quello prodotto a causa del calore e dello stress, avrà un profilo dell'analita dinamico che riflette un'attività metabolica alta. Questa tipologia di sudore, infatti, è una conseguenza ai cambiamenti repentini

che il corpo subisce durante l'attività fisica in quanto il raffreddamento attraverso l'evaporazione fornisce la più rilevante difesa fisiologica contro il surriscaldamento.

In conseguenza allo stress termico, da 2 a 4 milioni di ghiandole sudoripare eccrine del corpo secernono grandi quantità di soluzione salina ipotonica (da 0,2 % a 0,4 % di NaCl). Attraverso questo meccanismo la vaporizzazione dell'acqua dalle vie respiratorie e dalla superficie cutanea trasferisce continuamente calore all'ambiente favorendo il raffreddamento dell'organismo.

La sudorazione inizia parecchi secondi dopo l'attività vigorosa e, dopo 30 minuti, raggiunge un equilibrio che è direttamente correlato al carico durante l'esercizio. [8] Una persona acclimatata ha il picco di sudorazione di 3 L/h durante un'attività fisica intensa al caldo che corrisponde a 12 L ogni giorno; ad esempio, i maratoneti d'élite perdono all'incirca 5 L/h durante la gara che corrispondono all'incirca al 6 -10% della massa totale.

Una diretta conseguenza della sudorazione, per il fatto che il sudore è composto per il 98-99% di acqua, è la perdita di liquidi che, se non controllata, può portare alla disidratazione. Si ha disidratazione quando l'organismo contiene meno acqua della norma con conseguente diminuzione del volume dei fluidi. A seconda che insieme all'acqua diminuisca, resti inalterata o aumenti anche la concentrazione dei soluti, si parla di disidratazione ipotonica, isotonica o ipertonica rispettivamente. Per quanto riguarda l'atleta è necessario prevenire la disidratazione ipertonica; ciò si può realizzare tramite assunzioni di acqua frequenti e limitate prima ancora che insorga il senso della sete. [4] La disidratazione indotta da 2 a 3 ore di attività fisica ad alta intensità in ambiente caldo raggiunge livelli che impediscono la dissipazione di calore e compromettono gravemente la funzionalità cardiovascolare e le prestazioni. Inoltre, oltre alla diminuzione di acqua, la disidratazione comporta anche il cambiamento della concentrazione dei soluti; la carenza del catione extracellulare Na^+ porta alla diminuzione del volume plasmatico, provocando la diminuzione del flusso sanguigno periferico e del tasso di sudorazione. In conseguenza di ciò il controllo termoregolatorio risulta più difficile in quanto l'aumento dell'ematocrito porta ad un peggioramento dell'irrorazione dei tessuti, sfavorendo di conseguenza le prestazioni sportive. La sudorazione può far perdere da 13 a 17 g di sale al giorno (da 2,3 a 3,4 g per litri di sudore), 8 g in più rispetto a quanto consumato normalmente.

Molti atleti ed allenatori credono che l'acqua comprometta l'attività sportiva, integrando quindi solo metà dei liquidi persi durante l'attività fisica (meno di 500 mL/h); in realtà una corretta programmazione di integrazione dei liquidi permette di mantenere il volume plasmatico in modo che la circolazione e la sudorazione varino in maniera ottimale.

Inoltre, la reintegrazione controllata degli elettroliti è fondamentale per non avere alcuna ripercussione a livello sportivo; se la bevanda non contiene una quantità di sodio sufficiente,

l'assunzione dei liquidi in eccesso aumenta solo l'urina senza comportare un miglioramento della reidratazione. Una concentrazione plasmatica alta di sodio promuove lo stimolo della sete, la ritenzione dei liquidi e ripristina il volume plasmatico; ecco perché le bevande contengono da 0.5 a 0.7 g di sodio per litro se l'attività fisica supera un'ora.

Anche l'allenamento gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di termoregolazione. L'allenamento aumenta la sensibilità e la capacità di risposta della sudorazione; in questo modo la sudorazione inizia ad una temperatura interna inferiore, rispondendo più efficacemente a variazioni della temperatura corporea rispetto a soggetti sedentari. [8]

3 BIOSENSORI PER IL SUDORE

3.1 Introduzione ai biosensori

Il sensore in utilizzo biomedicale è uno strumento che consente di misurare i segnali di origine biologica e che, attraverso le sue componenti, permette di prelevare, elaborare ed esporre in maniera chiara le informazioni acquisite dall'analisi per poterle utilizzare in ambito medico.

Pur nella loro diversità tutti i sistemi di misura sono riconducibili a uno schema generale che tiene conto di alcune caratteristiche comuni.

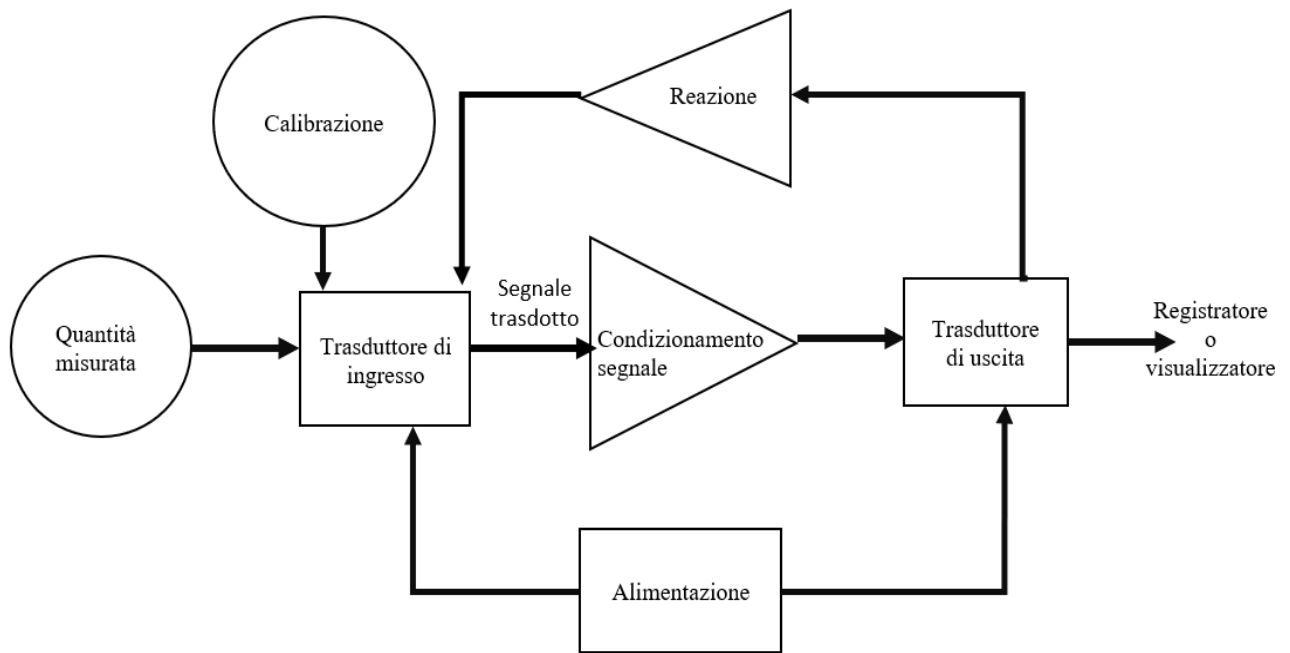


Figura 3 Schema generale di un sensore [9]

La quantità che deve essere misurata è rilevata dal trasduttore di ingresso (o rilevatore); lo stadio di ingresso deve essere in grado di convertire l'energia dalla forma alla quale si presenta al sensore, ad una forma che possa essere elaborata dagli stadi successivi e quindi presentata all'operatore; il trasduttore di ingresso può richiedere un'alimentazione e quindi essere passivo oppure non necessitare di alcuna fonte di energia ed essere quindi attivo.

Lo stadio di elaborazione del segnale è generalmente un sistema elettronico. Esso permette, per mezzo di microprocessori, memorie, convertitori analogico digitali, filtri, amplificatori, di operare sul segnale fornito dal trasduttore d'ingresso e di trasformarlo nella forma più adatta per essere trasmesso allo stadio di uscita. Nel caso in cui il segnale in uscita dal trasduttore sia già direttamente legato alla variabile da rilevare, l'elaborazione del segnale si limiterà ad amplificare e filtrare il segnale, cercando il più possibile di ridurre il rumore.

Il trasduttore di uscita deve trasformare il segnale elettrico in uscita dall'elaborazione in un segnale che possa essere presentato direttamente all'esterno o immagazzinato in una memoria. Il segnale che giunge allo stadio di uscita, che è stato modificato dallo stadio di elaborazione, dovrà essere digitale o analogico a seconda del tipo di dispositivo utilizzato per presentare il risultato finale.

Lo stadio di presentazione dei risultati deve essere facilmente accessibile e comprensibile dall'utilizzatore e deve mettere in evidenza tutto ciò che interessa la misura tralasciando le informazioni poco rilevanti o superflue. Lo stadio di uscita potrà quindi essere un display, una stampante, un indicatore a lancetta, che forniscano una rappresentazione immediata del risultato oppure la memoria di un computer dove immagazzinare i dati per poi elaborarli in un secondo momento.

Non tutti gli elementi e le linee sono presenti in tutti i dispositivi. La sorgente del segnale standard di calibrazione, anch'essa non necessariamente presente, permette di calibrare il sensore correttamente anche durante l'uso. [9]

I biosensori sono dispositivi comprendenti un elemento sensibile di origine biologica, usualmente in forma di film sottile, che è intimamente collegato o direttamente integrato ad un elemento trasduttore. In generale lo scopo primario è di riuscire a produrre un segnale elettronico o ottico proporzionale alla concentrazione di una specie chimica o di un insieme di prodotti. Un biosensore può essere quindi considerato come una combinazione di un biorecettore costituito da una componente biologica e il trasduttore. I recettori biologici possono essere uno o più enzimi, componenti di membrane, cellule, anticorpi o antigeni, DNA, RNA o anche frammenti di tessuto biologico. Essi sono i responsabili del riconoscimento delle specie di interesse e conferiscono selettività e sensibilità al dispositivo finale. Le molecole biologiche sopra elencate interagiscono in maniera specifica e reversibile con la molecola target, innescando una serie di cambiamenti ad alcuni parametri fisico-chimici. Tali interazioni comportano variazioni di calore, massa, luce, ioni o elettroni che a loro volta possono essere convertite in un segnale elettrico dal trasduttore e successivamente amplificate, elaborate e visualizzate. [9]

3.2 Integrazione con microfluidica

L'utilizzo crescente negli ultimi anni del sudore come biofluido facilmente accessibile, composto chimicamente da analiti di estrema importanza per la salute, ha favorito l'aumento dei sensori indossabili utilizzati, permettendo lo sviluppo di tecniche di acquisizione e di analisi diverse.

La raccolta di campioni del sudore per l'analisi della sua composizione chimica si fonda su dischetti assorbenti e microtubi in plastica che vengono posti sulla pelle; l'analisi del biofluido raccolto viene poi svolta dai tipici strumenti da laboratorio per la valutazione chimica. Tuttavia, questi metodi sono incompatibili con il monitoraggio da remoto, la continua valutazione o l'uso sul campo a causa della loro dipendenza da procedure multistadio per la preparazione dei campioni e costosi hardware da tavolo per l'analisi. Per il superamento dell'approccio convenzionale e delle sue limitazioni sono stati fondamentali i recenti miglioramenti nell'elettronica flessibile e nella rilevazione chimica che hanno permesso di costituire dispositivi poco ingombranti e altamente funzionali. [10]

Le caratteristiche esteriori richieste ai sensori per favorire il loro utilizzo sono relative alla forma, alle dimensioni, alla facilità di posizionamento, alla robustezza e alla durata, che ne consentono un impiego più ampio in base alle specifiche pretese. Le dimensioni del sensore dipendono da quelle degli elementi che lo compongono e in certe situazioni si richiede che esse siano il più piccole possibili; la progettazione cerca di ottenere questo risultato tenendo presenti le possibilità offerte dalla tecnologia e cercando di soddisfare contemporaneamente le altre esigenze. La miniaturizzazione è al giorno d'oggi possibile sia per i dispositivi elettronici che meccanici e consente di riunire vari elementi in un unico dispositivo integrato; le dimensioni ridotte permettono di non influenzare il sistema sotto osservazione, facilitano il posizionamento del sensore nel punto esatto in cui si vuole effettuare la misura oltre che a non essere ingombranti nel caso di utilizzo duraturo. [9]

Per le applicazioni in ambito sportivo è richiesto l'utilizzo di un sensore a stretto contatto con la pelle per una raccolta ottimale del sudore e della sua analisi, che permetta un uso dinamico e resistente; per questa ragione i sensori indossabili devono preferibilmente adattarsi alla non planarità della pelle ed essere quindi flessibili. Quando si considera la produzione e i materiali di un dispositivo indossabile bisogna considerare il fatto di produrre dispositivi molto sensibili, selettivi, flessibili, biocompatibili e circuiti dell'ordine di grandezza dei micro e dei nano.

I dispositivi indossabili per il sudore esistenti includono cerotti e tatuaggi epidermici; per quanto riguarda il continuo monitoraggio dell'attività fisica, i sensori vengono integrati in accessori comuni come polsini o fasce che possono essere comodamente indossati senza ostruire il movimento. Inoltre, è fondamentale che durante l'allenamento l'atleta abbia accesso diretto alle informazioni riguardanti il proprio stato di salute; per questo motivo i dispositivi più recenti hanno integrato un circuito che processa il segnale per l'analisi in tempo reale dei dati e la trasmissione ad un computer o ad un cellulare. Tipicamente si utilizza il Bluetooth per il suo basso costo di installazione, buona compatibilità e poche richieste di hardware rispetto altri protocolli come il Wi-Fi. [7]

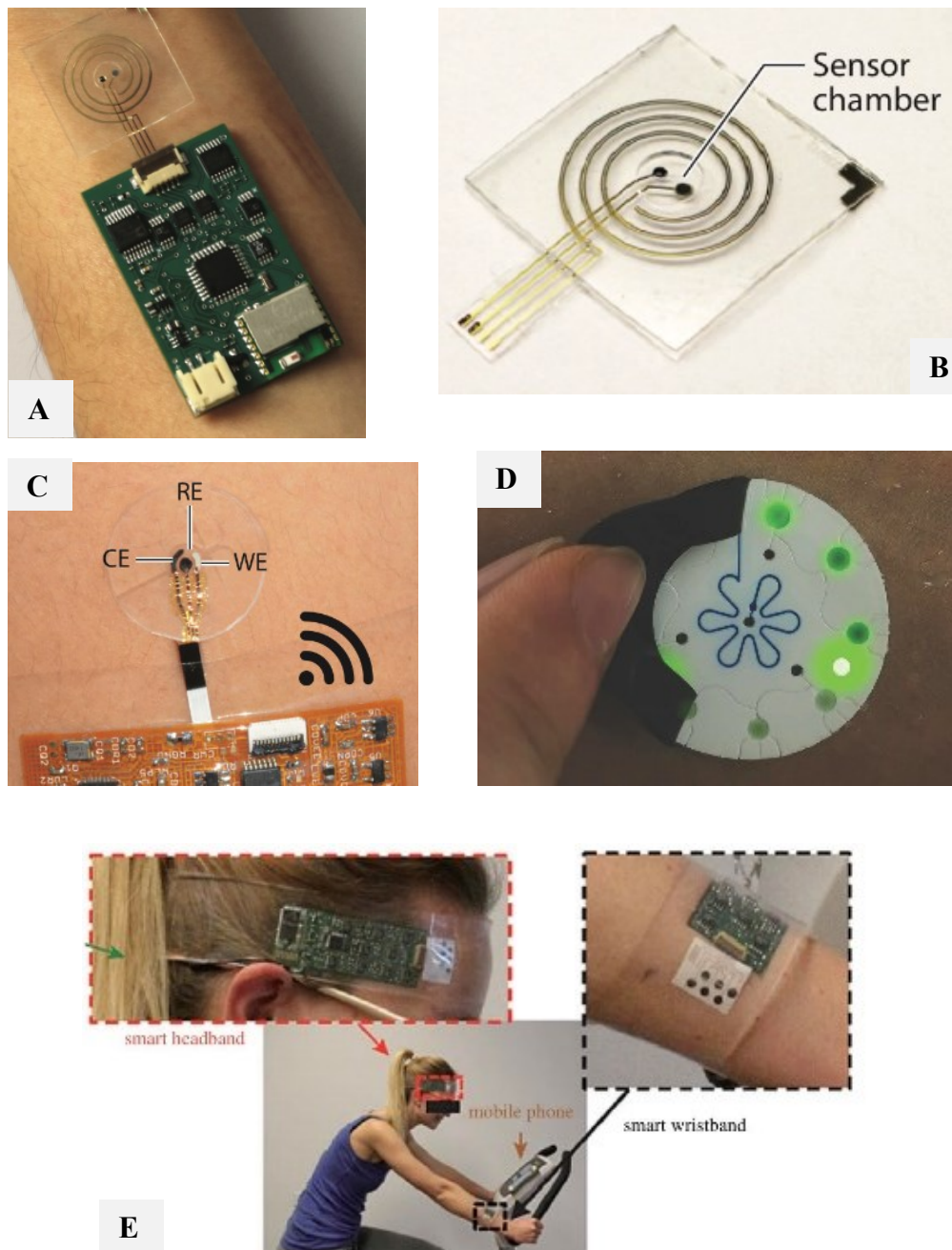


Figura 4 Principali sensori utilizzati per l'analisi del sudore: (A) sensore elettrochimico per il sodio con canale microfluidico per monitorare simultaneamente il tasso di sudorazione; (B) fotografia del sistema microfluidico; (C) immagine di un sensore elettrochimico per il lattato costituito da canali microfluidici [10]; (D) esempio di sensore ottico (a fluorescenza) [11]; (E) sensore posizionato sulla fronte durante un esercizio fisico [12]

In generale, la scelta della configurazione del dispositivo dipende da diversi fattori come il costo, il peso, l'ingombro, la riutilizzabilità, l'accessibilità, il tempo per la raccolta dei campioni, la biocompatibilità e la tipologia di analiti che devono essere rilevati. La configurazione dei dispositivi può essere classificata in sensori del sudore *on-skin* (e.g. fasce per il sudore, cerotti, tatuaggi e microfluidica indossata) e in sensori del sudore *near-skin* (e.g. indumenti).

I dispositivi *on-skin* raccolgono e analizzano i campioni di sudore nello stesso punto, minimizzando l'evaporazione. Grazie alla vicinanza al sito di collezione dei campioni, questi dispositivi possono rilevare variazioni nella concentrazione degli analiti in tempi molto ridotti prima che si abbia la loro degradazione. Di questa categoria fanno parte le fasce per il sudore, i cerotti epidermici e i tatuaggi; le ultime due tipologie sono in contatto diretto con la pelle e consentono di misurare i parametri del sudore in qualsiasi regione corporea. Nonostante ciò, a differenza delle fasce per il sudore, hanno bisogno di una maggiore resistenza meccanica e adesione alla cute soprattutto sotto attività fisiche ad alta intensità.

I dispositivi *near-skin* assorbono costantemente il sudore e lo trasportano attraverso canali fluidici agli elettrodi. I parametri dei canali fluidici possono essere ottimizzati per migliorare il flusso, per ridurre le contaminazioni e minimizzare il tempo di analisi. Un esempio di sensori *near-skin* indossabili sono gli indumenti. Diverse tipologie di materiali (e.g. viscosa, cotone) possono essere utilizzati per raccogliere il sudore e analizzarlo. Una problematica di questa tipologia di sensori è la poca chiarezza su quanti cicli di lavaggio sono in grado di sopportare senza compromettere le prestazioni. [6]

3.3 Classificazione dei principali biosensori

Esistono vari meccanismi di rilevamento per l'analisi dei componenti del sudore; le principali tecnologie utilizzate sono i sensori elettrochimici e i sensori ottici.

L'approccio elettrochimico è il metodo più comune e versatile; attraverso la misurazione di correnti o potenziali ai capi degli elettrodi è possibile ottenere la concentrazione degli analiti.

Verranno analizzati poi due metodi di trasduzione ottici: i dispositivi colorimetrici e i dispositivi fluorimetrici. In questa tipologia di sensori le reazioni chimiche e/o interazioni indotti dagli analiti producono dei cambiamenti quantificabili nella lunghezza d'onda e nell'intensità, tipicamente nel range del visibile. La loro costruzione semplice e l'abilità di operare senza una fonte di energia in un design leggero e ridotto si adatta perfettamente alle richieste sopra riportate. [10]

I sensori ottici consentono un buon livello di sensibilità e specificità se comparati a quelli elettrochimici, ma devono superare degli ostacoli importanti per quanto riguarda la loro ripetibilità, la loro alta dipendenza dalle variabili di contorno, l'alta fragilità, la limitata flessibilità e la difficile portabilità e integrabilità del sistema complessivo di lettura con sistemi più complessi. I sensori elettrochimici, d'altra parte, sono più facili da fabbricare anche perché sono più comuni e da miniaturizzare, facilitando la possibilità della loro integrazione sullo stesso substrato di rilevazione e anche di circuiti di lettura customizzata. [13]

Sensing principle	Suitable analytes
Fluorescent technology	Cl ⁻ , Na ⁺ , Cu ²⁺ , Hg ⁺
Electrochemical method	Glucose, lactate, Na ⁺ , K ⁺ , pH, Cl ⁻
Colorimetric method	Glucose, lactate, pH, Cl ⁻

Figura 5 Analiti del sudore suddivisi in base al metodo utilizzato per la loro analisi [14]

4 BIOSENSORI ELETTROCHIMICI

I sensori elettrochimici sono dispositivi che forniscono informazioni sulla concentrazione degli analiti grazie all'utilizzo di un metodo di trasduzione elettrochimico. Un biosensore elettrochimico è un dispositivo integrato autonomo che è capace di fornire informazioni specifiche quantitative o semiquantitative utilizzando un elemento di identificazione biologico (recettore biochimico) che è tenuto a contatto spaziale diretto con un trasduttore elettrochimico. I sensori elettrochimici permettono di ottenere una conversione diretta di un evento biologico in un segnale elettrico che li rende particolarmente desiderabili per analizzare il contenuto e la concentrazione di un campione biologico o di un analita di interesse. Questo si basa sul rilevamento di una proprietà elettrica (e.g. resistenza, corrente, potenziale, capacità, impedenza) attraverso differenti metodi di trasduzione.

In base al metodo di trasduzione utilizzato, i sensori elettrochimici si dividono in cinque tipologie diverse: amperometrici, potenziometrici, voltammetrici, impedimetrici e conduttimetrici. [15]

Lo schema generale di un sensore elettrochimico è composto da due o tre elettrodi, l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo di lavoro sempre presenti, e l'elettrodo ausiliario presente solo nel caso in cui serva misurare una corrente, inseriti all'interno di una cella elettrochimica. Poiché la cella elettrochimica convenzionale è ingombrante e non indossabile sono state messe a punto nuove tecnologie per miniaturizzare lo strumento, come ad esempio una cella microfluidica elettrochimica con microelettrodi che facilita la gestione dei campioni, la pulizia degli elettrodi e l'indossabilità dello strumento.

L'elettrodo di lavoro è l'elettrodo dove avviene la reazione di interesse; in un sistema elettrochimico con tre elettrodi, quello di lavoro può essere sia l'anodo che il catodo in base al tipo di reazione che avviene sull'elettrodo di riferimento (riduzione o ossidazione).

L'elettrodo di riferimento è usato per produrre un potenziale costante che viene confrontato con quello che si sviluppa sul potenziale di lavoro.

L'ultima tipologia di elettrodo è quello ausiliario che viene utilizzato per chiudere la corrente del circuito; è solitamente fatto da un materiale inerte e non partecipa nella reazione elettrochimica. Poiché la corrente scorre tra l'elettrodo di lavoro e quello ausiliario, la superficie totale dell'elettrodo ausiliario dovrà essere più grande di quella dell'elettrodo di lavoro in modo da non limitare la cinetica del processo elettrochimico sotto osservazione. [15]

Lo schema tradizionale dei biosensori non è adatto per essere reso indossabile, in maniera particolare per la grandezza e la rigidità, che si contrappone alle necessità dei sensori per il

sudore di essere leggeri, di piccole dimensioni e portatili. È quindi fondamentale miniaturizzare tutti le componenti dei sensori elettrochimici, compresi gli elettrodi che dovranno essere costituiti da materiali flessibili e resistenti. La scelta dei materiali per la composizione degli elettrodi dipende dal biomarcatore di interesse nel sudore. Una delle caratteristiche fondamentali degli elettrodi implementati nei sensori indossabili è la loro flessibilità, che viene raggiunta attraverso l'utilizzo di substrati polimerici flessibili che vengono poi trattati con agenti conduttivi in base al biomarcatore di interesse; l'esempio più comune di substrato polimerico flessibile è il polietilene tereftalato (PET). [6]

sweat sensor analyte	type of sensor
Ca ²⁺	potentiometric ISE
Cl ⁻	potentiometric ISE
ethanol	enzymatic amperometric
glucose	enzymatic amperometric
glucose	enzymatic amperometric
lactate	enzymatic amperometric
lactate	non-enzymatic impedimetric
Na	potentiometric ISE
pH	potentiometric ISE

Figura 6 Metodi di trasduzione elettrochimica principalmente utilizzati per l'analisi dei componenti del sudore [12]

Come si evince dalla tabella i due metodi di trasduzione principalmente utilizzati nei sensori elettrochimici per analizzare gli analiti di interesse sportivo (e.g Na⁺, K⁺, lattato) sono la trasduzione amperometrica e potenziometrica.

Di seguito verranno analizzate tutte e cinque le tipologie di trasduzione utilizzate, soffermandosi principalmente su quella amperometrica e quella potenziometrica.

4.1 Trasduttori amperometrici

I trasduttori amperometrici misurano le correnti risultanti dalla riduzione e ossidazione elettrochimica di una specie elettroattiva attraverso l'elemento di bioriconoscimento sotto una tensione costante applicata all'elettrodo di lavoro. La forza trainante per la reazione di trasferimento degli elettroni della specie elettroattiva è il potenziale applicato che costringe le specie a prendere o cedere elettroni. La corrente ottenuta è una misura diretta della quantità

della reazione di trasferimento degli elettroni che, allo stesso tempo, è proporzionale alla concentrazione dell'analita. [15]

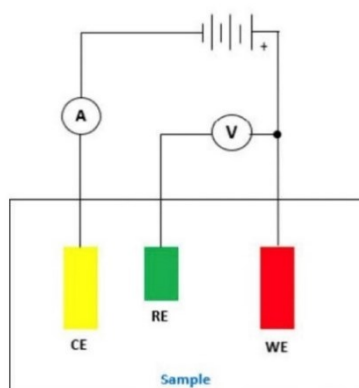


Figura 7 Struttura di un sensore amperometrico; in verde è evidenziato l'elettrodo di riferimento, in rosso l'elettrodo di lavoro e in giallo l'elettrodo ausiliario [16]

Solitamente i sensori amperometrici vengono classificati in base all'applicazione e alla struttura ma anche in base al materiale dell'elettrodo di lavoro, all'elemento biologico di riconoscimento e al metodo di immobilizzazione utilizzato. Si utilizza principalmente un elettrodo di riferimento fatto di argento/cloruro di argento al potenziale di riferimento tra +0.2 e +0.25 V. L'analita di rilevanza in ambito sportivo maggiormente analizzato con la trasduzione amperometrica è il lattato. La rilevazione del lattato con la tecnica amperometrica può essere svolta sia attraverso un biosensore enzimatico che, grazie ai recenti sviluppi e studi sul campo, attraverso un sensore non enzimatico.

Per quanto riguarda la prima tipologia, l'utilizzo degli enzimi nei sensori ne ha migliorato notevolmente la specificità grazie alla loro capacità di catalizzare un solo tipo di reazione dimostrando predisposizione per un particolare substrato o gruppi di substrati.

Esistono due enzimi che vengono comunemente utilizzati nella fabbricazione di biosensori per il lattato e sono il lattato ossidasi (LOD) e il lattato deidrogenasi (LDH). La corretta fabbricazione dei biosensori enzimatici dipenderà principalmente dalla corretta immobilizzazione degli enzimi. Esistono numerosi metodi per la stabilizzazione degli enzimi, alcuni dei quali sono l'aggiunta di sostanze stabilizzanti, come zucchero, zucchero alcolico, polioli, polielettrodi, la modificazione chimica dei gruppi laterali dell'enzima e l'immobilizzazione dell'enzima, che di solito viene eseguito attraverso assorbimento, legami covalenti, reticolazione e intrappolamento.

I sensori enzimatici sono stati quelli maggiormente utilizzati grazie alla loro alta selettività e sensibilità. Nonostante ciò, i ricercatori hanno recentemente iniziato ad esplorare la possibilità di incrementare sensori non enzimatici per ovviare alle limitazioni della prima tipologia come,

ad esempio, il complicato processo di immobilizzazione dell'enzima, poca stabilità termica e chimica, e alti costi dei metodi di fabbricazione. La stabilità è uno dei problemi principali dei sensori enzimatici in quanto gli enzimi si possono denaturare facilmente dopo il processo di immobilizzazione, compromettendo la loro funzionalità; inoltre, gli enzimi possono essere facilmente influenzati dai cambiamenti ambientali come temperatura, pH e umidità. Ci sono sempre più ricerche che si concentrano sui sensori non enzimatici per i loro vantaggi in termini di costo, stabilità e metodi di fabbricazione più semplici. Recenti studi sui sensori non enzimatici indicano che i recettori sintetici possono fornire le basi per caratterizzare la rilevazione in maniera da superare molti dei limiti sopra esposti. Uno degli approcci utilizzati nei dispositivi non enzimatici sono i MOF, nanomateriali solidi cristallini che si possono facilmente assemblare da soli attraverso la coordinazione di ioni con legami organici. L'elettrodo di acquisizione sintetizzato attraverso i MOF è in grado di rilevare il lattato sensibilmente; nonostante ciò, la fabbricazione dei materiali a base di MOF necessita ancora di un ampio sviluppo per quanto riguarda la loro sintesi, incluso l'adattamento al processo di micro e nano-fabbricazione per i quali non è ancora presente un'ampia letteratura.

Nonostante i sensori a base enzimatica soffrano per le numerose limitazioni, l'uso degli enzimi come agenti di rilevamento consente ancora numerosi vantaggi grazie alla specificità del metodo; questo però non preclude futuri sviluppi del metodo non enzimatico. [16]

4.2 Trasduttori voltammetrici

Nei trasduttori voltammetrici si impiegano tensioni variabili nel tempo in maniera diversa (voltammetria lineare e voltammetria ciclica) e la corrente misurata presenta caratteristiche che dipendono dal modo in cui la tensione è stata fatta variare. In generale, questo tipo di trasduzione analizza gli effetti della concentrazione delle specie da monitorare sulla caratteristica corrente-tensione delle reazioni di ossido-riduzione coinvolte.

La voltammetria lineare prevede che il potenziale venga fatto variare linearmente da un valore all'altro (finestra di potenziale); in questo caso la curva mostra dei picchi in corrispondenza dei potenziali a cui avvengono delle reazioni di ossidazione/riduzione. La voltammetria ciclica è simile a quella lineare solo che il potenziale passa ciclicamente dal valore superiore a quello inferiore ad una velocità costante ben definita; anche in questa modalità i picchi segnalano le reazioni di ossidazione e riduzione e, dalla loro ampiezza, è possibile risalire alla concentrazione dei reagenti a meno che non vengano attivati altri fenomeni. [9]

Un vantaggio fondamentale della trasduzione voltammetrica è il basso rumore, che dota il biosensore di una alta sensibilità. In aggiunta è capace di recepire molti componenti che hanno diversi potenziali di picco in un singolo esperimento elettrochimico, permettendo il rilevamento

di più analiti. Il voltammogramma, grafico della corrente sul potenziale, fornisce informazioni sulle reazioni chimiche. [15]

4.3 Trasduttori conduttimetrici

L'evento di bioriconoscimento che cambia la concentrazione ionica può essere monitorato utilizzando biosensori conduttimetrici. La maggior parte delle reazioni includono un cambiamento nella concentrazione della specie ionica che porta ad un cambiamento nella conduttività elettrica o nel flusso di corrente. Normalmente un biosensore conduttimetrico consiste di due elettrodi metallici separati da una certa distanza e una tensione alternata applicata tra gli elettrodi che causa un flusso di corrente. Durante un evento di bioriconoscimento la composizione ionica cambia e il cambiamento nella conduttanza tra gli elettrodi metallici viene misurata. I migliori vantaggi dello strumento conduttimetrico sono il fatto che non necessita di un elettrodo di riferimento, è poco costoso, è facilmente miniaturizzabile e ha una risposta elettrica diretta. Sfortunatamente il metodo conduttimetrico ha meno sensibilità comparato agli altri metodi elettrochimici e dipende fortemente dalla risposta della capacità. [15]

4.4 Trasduttori impedimetrici

La spettroscopia ad impedenza elettrochimica (EIS) è considerata una tecnica rapida per la caratterizzazione della struttura e l'operazione di funzionalizzazione degli elettrodi con biomateriali. L'immobilizzazione dei biomateriali sugli elettrodi produce cambiamenti nell'impedenza; quindi, cambiamenti nell'interfaccia generati da processi di bioriconoscimento possono essere rilevati da questa tecnica elettrochimica. L'EIS è una tecnica ampiamente utilizzata per sondare la bioaffinità dell'interazione sulla superficie del sensore di polimeri elettricamente conduttivi e può essere utilizzata per investigare un rilevamento degli analiti senza etichetta, a differenza della trasduzione potenziometrica ed amperometrica, ma i suoi limiti di rilevazione sono inferiori se comparati ai metodi tradizionali. [15]

4.5 Trasduttori potenziometrici

La misura potenziometrica si basa sulla determinazione del potenziale tra l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo di lavoro. L'elettrodo ione selettivo fa parte quindi di una cella elettrochimica ed il potenziale tra i due elettrodi (quello di riferimento e quello selettivo) viene misurato con un voltmetro. L'elettrodo di riferimento deve essere quindi stabile e non cambiare potenziale, anche se sono ammesse delle piccole fluttuazioni che devono essere inferiori

rispetto alla risoluzione del sistema. Per questo tipo di trasduzione gli elettrodi di riferimento devono quindi essere completamente affidabili e non subire alterazioni; la tipologia di elettrodi di riferimento più utilizzati, cioè quelli di argento/cloruro di argento o calomelano, non sono adatti alle misure in vivo perché contengono all'interno elettroliti liquidi e sono solitamente sostituiti da giunzioni metallo/ossido di metallo (e.g. platino/ossido di platino). [9]

La misura del potenziale tra i due elettrodi ha una dipendenza diretta dalla concentrazione dell'analita come opposta ad una concentrazione fissata e nota e si basa sull'equazione di Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[RED]}{[OX]}$$

Dove E è il potenziale di cella, E^0 il potenziale standard, R è la costante universale dei gas, T è la temperatura, n è il numero di elettroni della specie chimica, F è la costante di Faraday, [RED] è l'attività della specie ridotta e [OX] è l'attività della specie ossidata.

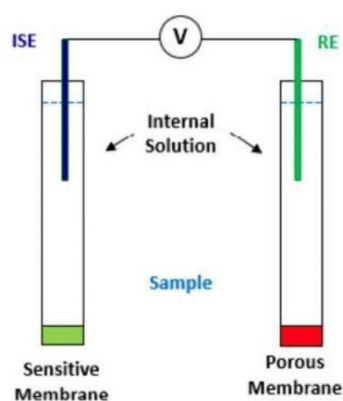


Figura 8 Struttura di un sensore potenziometrico; in particolare l'elettrodo di colore blu è l'elettrodo ISE o ione selettivo mentre quello verde è l'elettrodo di riferimento [16]

La trasduzione potenziometrica viene principalmente utilizzata per il rilevamento di metaboliti come il Na^+ e il K^+ . Un esempio è quello del sensore proposto da Yu et al. che consente l'analisi multiparametrica del sudore sul posto, attraverso un dispositivo meccanicamente flessibile e integrato.

Il dispositivo integra cinque sensori diversi che possono simultaneamente e selettivamente misurare glucosio, lattato, Na^+ e il K^+ e la temperatura corporea: le concentrazioni di sodio e potassio vengono misurate attraverso una trasduzione potenziometrica mentre la misura di temperatura viene eseguita attraverso un termistore. Il sensore è costituito da un materiale flessibile, il PET e il circuito integrato è costituito dall'utilizzo di una FPCB, ovvero una *printed circuit board* flessibile che permette la trasmissione e l'elaborazione del segnale. Il

sistema totale è flessibile e indossabile e può essere utilizzato per l'esercizio fisico prolungato. In aggiunta, la piattaforma può essere impiegata o riconfigurata per il rilevamento di altri biomarcatori. [14]

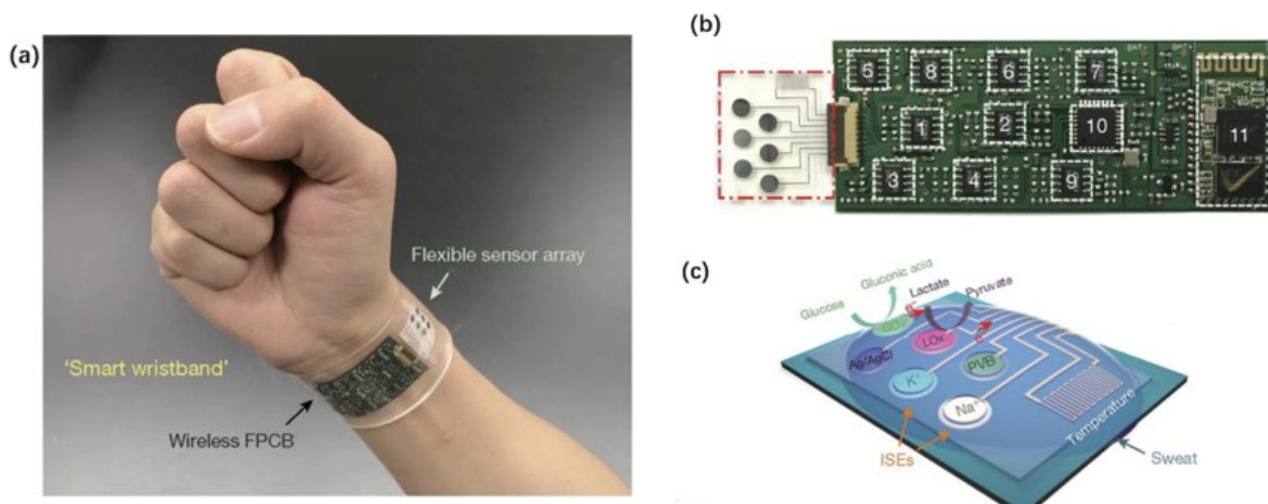


Figura 9 Sensore elettrochimico potenziometrico indossabile per il rilevamento multiparametro dei principali analiti del sudore: (a) sensore integrato in un braccialetto; (b) fotografia del sensore potenziometrico e del circuito integrato flessibile; (c) schematizzazione del sensore per l'analisi multiparametrica del sudore [14]

5 BIOSENSORI OTTICI

I biosensori ottici sono un potente strumento di rilevazione e analisi che ha vaste applicazioni nelle ricerche biomediche, sia in ambito sportivo che nella salute. Nella forma più comune di un biosensore optoelettronico il processo di trasduzione induce un cambiamento nella fase, nell'ampiezza, nella polarizzazione o nella frequenza della luce in ingresso in risposta ad un cambiamento fisico o chimico prodotto dal processo di bioriconoscimento. Alcuni dei vantaggi offerti da un biosensore ottico sono la selettività, l'isolamento da interferenze elettromagnetiche, la velocità, la misura in tempo reale, il rilevamento multicanale o multiparametro, il design compatto, la biocompatibilità e le informazioni chimiche dettagliate sugli analiti. I più importanti componenti di un sensore ottico sono la sorgente di luce, il mezzo di trasmissione ottico, l'elemento biologico di riconoscimento e il sistema ottico di rilevazione. [15]

La chimica analitica utilizza la luce su larga scala per studiare la composizione chimica di diverse tipologie di campioni. In molti casi, il composto di interesse è capace di interagire con la luce senza alcuna modifica chimica preventiva. Tuttavia, molto spesso, l'analita non può essere rilevato direttamente da un metodo ottico. In questi casi, l'analita viene convertito in un composto rilevabile da una reazione chimica che coinvolge un reagente specifico. Questa procedura comporta delle reazioni specifiche all'interno della soluzione dove sia l'analita che il reagente sono liberi di diffondere.

La trasduzione ottica si può ottenere attraverso la misura della potenza della luce assorbita o emessa da un componente dello strato sensibile ad una specifica lunghezza d'onda; poiché la potenza della luce sulla lunghezza d'onda rappresenta uno spettro ottico, questi metodi sono classificati come metodi spettrochimici. Un'alternativa alla trasduzione spettrochimica è rappresentata dal monitoraggio ottico di una proprietà fisica di uno strato sensibile che varia a seconda delle interazioni con l'analita; questa tipologia di trasduzione non necessita di un'etichetta ottica.

Per quanto riguarda il metodo spettrochimico, l'analisi si fonda sull'assorbimento o l'emissione della luce da parte delle molecole del composto campione. Questo processo è connesso con le transizioni tra gli orbitali molecolari e sono possibili solo per determinati valori di energia; pertanto, l'emissione e l'assorbimento di luce avviene soltanto all'interno di particolari bande spettrali centrate sulla lunghezza d'onda nominale.

L'assorbimento della luce si ha solamente quando l'energia del fotone del fascio incidente corrisponde alla differenza di energia tra un orbitale pieno e uno vuoto nella specie molecolare assorbente. Nelle misurazioni dell'assorbimento di luce, la potenza del raggio

trasmesso attraverso il campione (P) è comparato con quello di un raggio di riferimento(P_0) che non contiene l'analita ma è simile al campione stesso sotto tutti gli altri aspetti. Secondo la legge di Lambert-Beer il grado di assorbimento del campione, ovvero l'assorbanza (A), è dato da:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

con a assorbimento molare dell'analita, b spessore dello strato assorbente e c concentrazione dell'analita. Pertanto, l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione e la sensibilità del metodo dipenderà dallo spessore b e dall'assorbimento caratteristico; l'assorbanza è un numero positivo. [17]

I due metodi ottici principalmente utilizzati nel rilevamento degli analiti che compongono il sudore sono la colorimetria e la fluorescenza.

Per ciascun metodo di rilevamento verrà presentato un sensore che sfrutta l'ottica per consentire il rilevamento e l'analisi dei componenti chimici del sudore. In entrambi i casi gli strumenti sono stati testati su persone che svolgevano attività fisica e costituiscono un fondamentale punto di inizio per applicazioni future e più sensibili per queste tipologie di analisi.

5.1 Sensori colorimetrici

La colorimetria è una tipologia di rilevazione ottica che è ampiamente utilizzata nel rilevamento dei componenti chimici del sudore. Questo metodo quantitativo si fonda sulla relazione tra la concentrazione dell'analita e l'intensità del colore risultante dalle reazioni. Quando il materiale di rilevamento reagisce con l'analita target attraverso una specifica reazione chimica il colore cambia; dalla quantificazione di questo cambiamento si ha la rilevazione degli analiti del sudore. L'intensità del colore cambierà in base all'assorbimento della luce dato dalla reazione chimica e la quantificazione di questa intensità sarà possibile grazie a delle specifiche curve di calibrazione.

Comparato alla complessa manifattura dei sensori elettrochimici il metodo colorimetrico è più semplice e non richiede alcun tipo di circuito. La visualizzazione dei risultati è di facile comprensione e può addirittura essere osservata ad occhio nudo attraverso le variazioni di colore. Nonostante ciò, i cerotti colorimetrici sono principalmente monouso e quindi questo metodo non permette un rilevamento continuo dei componenti del sudore. Inoltre, i sensori colorimetrici hanno una sensibilità più bassa se comparata a quella dei sensori elettrochimici

e sono più adatti per misure di soglia e indicatori di avvertimento come la rilevazione del lattato durante l'esercizio fisico. [14]

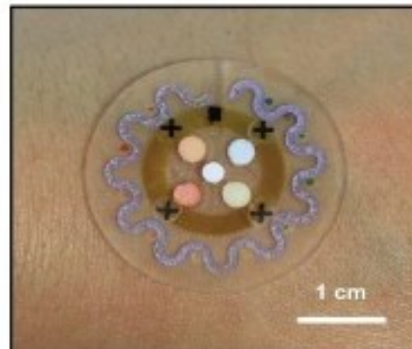


Figura 10 Sensore colorimetrico [18]

Il dispositivo che verrà ora presentato si avvale del metodo colorimetrico e può essere montato in qualsiasi punto del corpo umano senza provocare alcuna irritazione chimica o fisica attraverso l'utilizzo di adesivi biocompatibili e una meccanica leggera. Il dispositivo epidermico microfluidico aderisce e si conforma alla superficie cutanea in maniera tale da permettere di catturare e inviare il sudore attraverso una rete di microcanali e serbatoi, usando una combinazione di capillari e agendo ad una pressione naturale associata alla perspirazione, per la valutazione volumetrica e l'analisi chimica direttamente sul sito. Il design specifico permette di immagazzinare all'incirca 50 μl di sudore corrispondenti ad un effettivo tempo di esercizio compreso tra le uno e le sei ore, dipendente dalla quantità di sudore perso e dall'applicazione del dispositivo su una specifica zona del corpo. L'elettronica flessibile permette una diretta elaborazione degli analiti e la capacità di trasferimento dei dati.

Il dispositivo è composto da un impilamento multistrato di tre sottosistemi: uno strato adesivo compatibile con la pelle con aperture microlavorate che definisce l'area di raccolta del sudore, una collezione sigillata di canali microfluidici e serbatoi riempiti con materiali sensibili al colore per l'analisi quantitativa del volume e della chimica del sudore e un'antenna ad anello magnetico per la comunicazione a corto raggio e per l'interfaccia con i dispositivi esterni.

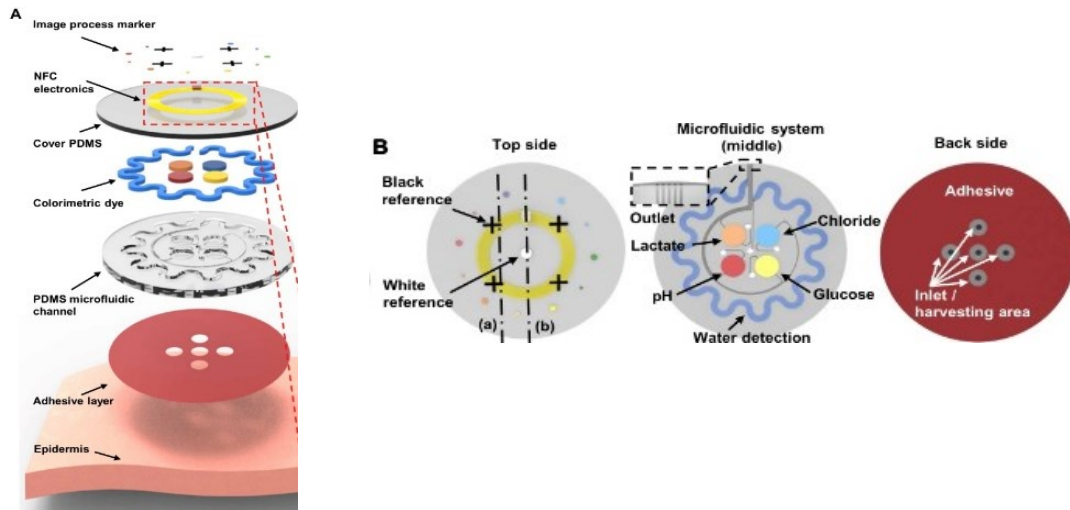


Figura 11 (A)Struttura del sensore colorimetrico; (B) illustrazione della parte superiore, centrale e inferiore del dispositivo; si notano in maniera particolare i riferimenti, dati dalle quattro croci nere e dal punto bianco sulla parte superiore [18]

Un film adesivo acrilico assicura un'adesione stabile, forte e senza interruzioni del dispositivo sulla pelle, altamente compatibile con la cute in modo da non creare alcun tipo di irritazione e fortemente impermeabile all'acqua in modo da non causare alcun distacco e impedire l'entrata di sostanze inquinanti. La piccola geometria di questo strato ($25\ \mu\text{m}$) e il basso modulo elastico (circa 17kPa) permette il rilascio della tensione durante la deformazione della pelle, facilitando il comfort e l'indossabilità a lungo termine.

Le aperture definiscono le aree per la raccolta del sudore ($3\ \text{mm}$ di diametro, corrispondenti all'incirca a 10 ghiandole sudoripare) attraverso le quali il fluido può passare nelle regioni di entrata del sistema microfluidico. La pressione che guida il flusso del fluido emerge dall'azione delle ghiandole sudoripare stesse, aiutate dall'effetto capillare nei microcanali. Il contatto conforme dello strato adesivo inibisce il flusso laterale del sudore, assicurando che il fluido fuoriuscito dalla cute si diriga nella direzione prestabilita.

Il sistema microfluidico consiste di uno strato inferiore di polidimetilsilossano (PDMS) di spessore di $500\ \mu\text{m}$ scolpito con un'appropriata geometria e riempito di reagenti per l'analisi colorimetrica. La struttura comprende quattro camere circolari di diametro $4\ \text{mm}$ come serbatoi indipendenti per l'analisi, che prevengono qualsiasi scambio indesiderato, circondati da un canale serpentino; questo canale e ciascuno dei serbatoi sono connessi da canali di guida separati. Tutti i canali e tutti i serbatoi si interfacciano con un canale microfluidico di uscita, che termina sulla sommità laterale del dispositivo, per evitare la contropressione che può impedire il flusso del fluido.

I reagenti per l'analisi quantitativa colorimetrica presenti nei serbatoi permettono la valutazione del pH e la concentrazione di analiti selezionati essenziali, incluso il glucosio, il lattato e il cloruro attraverso reazioni sia enzimatiche che cromogeniche. Lo schema colorimetrico incorporato nel dispositivo attuale non permette però di tracciare i cambiamenti in tempo reale delle concentrazioni degli analiti.

Varianti formulate appositamente dei PDMS offrono caratteristiche fisiche che sono allettanti per questa applicazione, inclusa la trasparenza ottica, la facilità di inserimento nei sistemi microfluidici, la biocompatibilità e la meccanica vantaggiosa, con un basso modulo elastico (circa 145 kPa) ed un'elevata elasticità. Inoltre, la meccanica leggera e la geometria sottile permettono un contatto intimo e non irritante con la pelle. L'elettronica integrata permette un'interfaccia wireless per l'elaborazione e l'analisi esterna dei dati utilizzando piattaforme comuni come il cellulare. Questa tecnologia si fonda sulla comunicazione di prossimità per avviare l'acquisizione dell'immagine e su software di analisi presenti su dispositivi esterni. Il design complessivo permette a questo sistema estensibile elettronico di lavorare sotto deformazioni fisiche senza alterare in maniera significativa le proprietà meccaniche del sistema microfluidico o di tutto il dispositivo.

Sulla sommità del dispositivo sono presenti dei segni di riferimento che includono un punto bianco e quattro croci nere che permettono di estrarre in maniera accurata il colore anche sotto condizioni di illuminazione arbitrarie; le croci, inoltre, aiutano a determinare la posizione e l'orientazione dalle immagini.

Quattro differenti saggi chimici colorimetrici su carta sono contenuti nei serbatoi centrali. La matrice di cellulosa in ciascun serbatoio può essere riempita con un campione di sudore dai 5 ai 10 μL che comporta il cambiamento di colore in un tempo inferiore al minuto. Per quanto riguarda il lattato, la reazione con il cofattore NAD^+ catalizzata dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH) induce un cambiamento nel colore del reagente cromogenico, il colorante formazano.

La registrazione dei cambiamenti di colore e la conversione in informazioni quantitative sono consentiti grazie alle immagini digitali catturate e alla loro analisi. Un cellulare posizionato in prossimità dello strumento, grazie alla comunicazione di prossimità, avvia la rilevazione automatica dell'immagine e l'analisi software. L'utilizzatore aggiusta quindi la posizione di visualizzazione sul punto mirato in modo da determinare il colore esatto RGB (rosso, verde e blu) sul sito. L'applicazione digitalizza le informazioni del colore sullo schermo, permettendo all'utilizzatore di leggere la concentrazione del marcatore. Il circuito integrato sulla sommità del dispositivo per la comunicazione di prossimità permette di comunicare i dati a dispositivi esterni.

Dopo aver collezionato le immagini si ha l'elaborazione delle stesse per l'assestamento del colore. Gli indicatori di colore di riferimento (vero bianco e nero) permettono il bilanciamento del bianco, eliminando la dipendenza dalle condizioni di illuminazione (e.g. luce diurna, ombra e sorgenti luminose). In particolare, i segni di riferimento, cioè il punto bianco al centro del dispositivo e le quattro croci nere stabiliscono i valori di 100% e 0% in coordinate percentuali di RGB, rispettivamente. Le croci inoltre consentono la rotazione e la traslazione dell'immagine per facilitare un'analisi accurata del tasso di sudorazione e del volume nei canali serpentina. Dopo la correzione dell'immagine le informazioni di colore digitali, in formato %RGB, vengono convertite nella concentrazione dell'analita attraverso delle curve di calibrazione. È possibile misurare cambiamenti affidabili di 0.5 unità di pH e 0.2, 0.3 e 0.1 mM di concentrazione di cloruro, lattato e glucosio rispettivamente che corrispondono ad un cambiamento dell'1% nel canale R dell'immagine RGB. La microstruttura descritta può tenere il sudore prelevato per circa 125 ore dopo la rimozione dalla pelle e la sigillatura dei canali aperti; se i canali non vengono sigillati, la tenuta si riduce a 75 ore, con una trascurabile deteriorazione dell'analisi colorimetrica. [18]

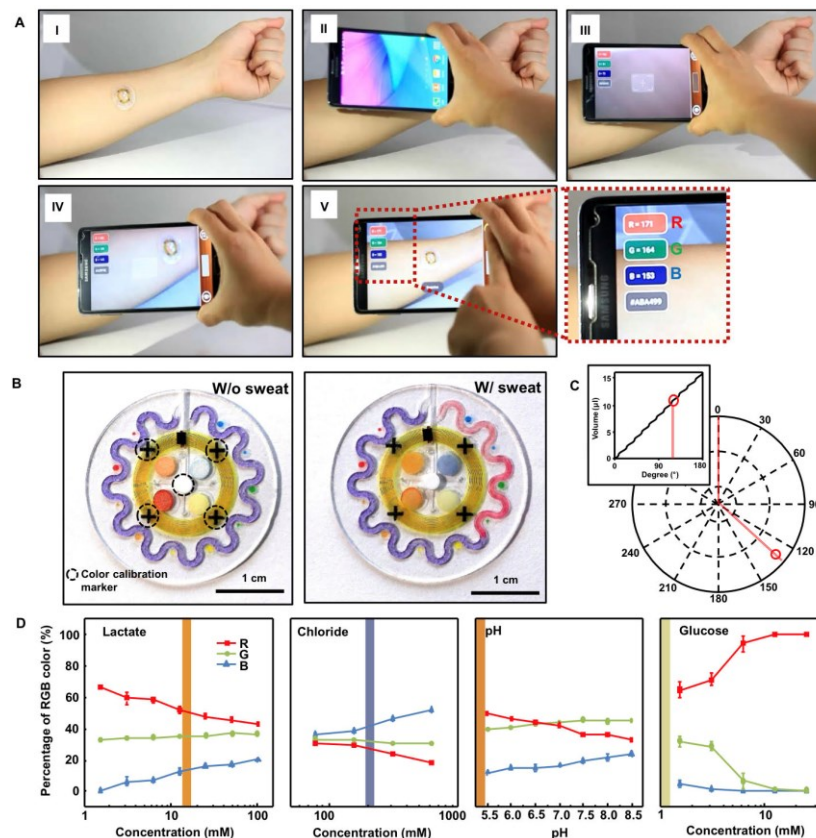


Figura 12 (A) Dimostrazione dell'utilizzo della comunicazione di prossimità e apertura dell'interfaccia per l'analisi; (B) immagine del dispositivo prima (sinistra) e dopo (destra) l'iniezione di sudore artificiale; (C) coordinate polari che tracciano l'accumulo di sudore e loro relazione con il volume totale di sudore catturato; (D) curve di calibrazione standard tra la percentuale di RGB normalizzata e la concentrazione degli analiti (la linea colorata verticale rappresenta la concentrazione dell'analita) [18]

5.2 Sensori a fluorescenza

Un approccio complementare a quello colorimetrico per l'analisi dei componenti del sudore può essere rappresentato dal metodo che utilizza la fluorescenza.

Il metodo a fluorescenza è una tipologia di sensore ottico che si basa sulla relazione tra la concentrazione dell'analita e l'intensità della fluorescenza. Quando il materiale fluorescente è esposto ad una specifica luce di eccitazione si genera fluorescenza; quando il materiale fluorescente subisce una specifica reazione chimica con l'analita target il segnale fluorescente cambia. Il vantaggio di questa tipologia di sensing è l'alta sensibilità, l'elevata selettività e la facilità di utilizzo. La fluorescenza permette di rilevare metaboliti come il lattato e l'urea ed elettroliti come il cloro e il sodio nel sudore. Nonostante ciò, questa tipologia di sensore ottico viene prevalentemente utilizzata per l'analisi del cloruro e per la conseguente diagnosi della fibrosi cistica. [14]

La luminescenza è una forma di emissione di radiazioni da corpo freddo di una sostanza. È connesso alla transizione di elettroni e quindi alla variazione di energia tra gli orbitali di una molecola e coinvolge due passaggi principali: l'eccitazione che porta alla produzione di uno stato labile ed il rilassamento che induce la particella a riportarsi allo stato fondamentale attraverso l'emissione di luce. A seconda del tipo di meccanismo di eccitazione si possono distinguere diversi tipi di luminescenza. La luminescenza prodotta dall'eccitazione della luce è chiamata fotoluminescenza e può essere di due tipi, la fluorescenza o la fosforescenza, in base al tipo di percorso di rilassamento. Le molecole eccitate possono essere prodotte da alcune reazioni chimiche che danno origine in questo modo alla chemiluminescenza. In altri casi alcuni organismi viventi, come ad esempio le lucciole, producono luce da reazioni chimiche catalizzate da enzimi; questo tipo particolare di chemiluminescenza è chiamata bioluminescenza.

La fluorescenza consiste nell'emissione di luce da parte di molecole precedentemente eccitate attraverso una sorgente luminosa; la fluorescenza fornisce un metodo di trasduzione estremamente sensibile ed è ampiamente utilizzato nei sensori ottici.

L'eccitazione delle molecole è data dall'assorbimento della luce ad una lunghezza d'onda che promuove la transizione delle molecole dal livello fondamentale S_0 ad un livello S_1 più alto e libero. Questo meccanismo è poi seguito dal rilassamento molecolare fino allo stato fondamentale, quando l'energia di eccitamento è rilasciata sottoforma di luce con una determinata frequenza. Questo tipo di fluorescenza, chiamata fluorescenza di risonanza, si incontra raramente nei composti molecolari. L'eccitazione, infatti, può promuovere l'elettrone ad un livello superiore, S_2 . Dallo scambio di energia cinetica con i dintorni, lo

stato di energia delle molecole torna poi al livello S_1 attraverso una transizione non irradiante che altera lo stato di vibrazione delle molecole. Questo è seguito da una transizione che permette di tornare allo stato fondamentale accompagnato da emissione luminosa. Tuttavia, siccome una frazione del fotone è stata persa nella transizione senza irradiazione, la luce emessa ha una frequenza minore rispetto alla fluorescenza di risonanza. La differenza in frequenza tra la luce incidente e la luce emessa è chiamata variazione di Stokes.

La fosforescenza, invece, coinvolge una transizione non radiativa dal livello S_2 al livello metastabile T_1 , che può avere una lunghezza di vita dai millisecondi alle ore in base al composto coinvolto. Quindi, la differenza principale tra fluorescenza e fosforescenza è che quest'ultima ha un processo di rilassamento più lento.

Una caratteristica fondamentale richiesta in questa tipologia di sensori è il mostrare la proprietà di fluorescenza, qualità che presentano alcuni composti come l'amminoacido triptofano e il NAD^+ . Nel caso in cui l'analita non fosse fluorescente, è possibile trattarlo con un fluoroforo che può essere un colorante organico, un complesso metallico o una nanoparticella luminescente. [17]

In maniera analoga per quanto fatto con i sensori colorimetrici, verrà ora descritto un dispositivo che si fonda sul metodo a fluorescenza per l'analisi dei componenti chimici del sudore. In questo caso, le quantità dei soluti target e metaboliti vengono determinate dalla misura di luce fluorescente emessa dalle sonde chimiche, attraverso una sorgente luminosa utilizzata per l'eccitazione della sonda e un fotodetettore per quantificare l'emissione della luce. L'approccio fluorimetrico viene quindi utilizzato per l'analisi del sudore; questo viene catturato attraverso dispositivi indossabili microfluidici e viene analizzato attraverso moduli basati sull'utilizzo del cellulare per lo studio della fluorescenza dell'immagine. La reazione delle sonde nei microserbatoi con ioni specifici (e.g. sodio, cloro, zinco) porta ad un cambiamento dell'intensità della fluorescenza che viene rilevata attraverso l'utilizzo di un cellulare adattato con un modulo ottico.

Il design del dispositivo è molto simile a quello analizzato per i sensori colorimetrici; la pila multistrato include tre componenti: uno strato adesivo ultra sottile e compatibile con la cute con aperture in zone localizzate della pelle, una piattaforma di canali microfluidici e strutture di valvole che guidano il sudore secreto da queste regioni ai microserbatoi contenenti reagenti fluorimetrici e, infine, uno strato staccabile di schermatura per prevenire l'esposizione dei reagenti alla luce prima del processo di lettura.

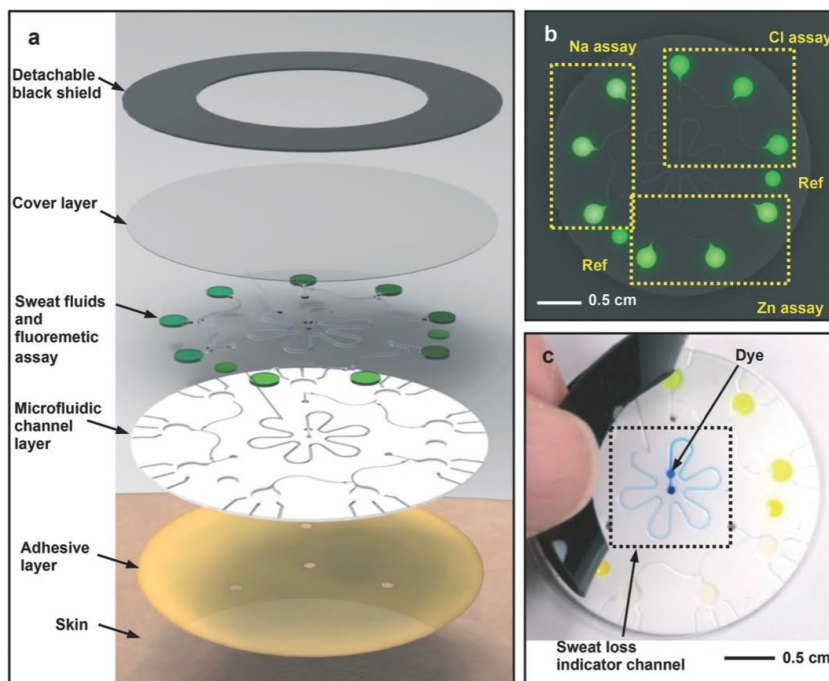


Figura 13 (a) Rappresentazione schematica del dispositivo; (b) illustrazione dei segnali di fluorescenza associate a sonde chimiche progettate per risponde agli analiti di interesse nel sudore (e.g. sodio, cloruro e zinco); (c) strato di schermatura staccabile [11]

Le aperture nell'adesivo definiscono le zone di collezione del sudore, di 3 mm di diametro, corrispondenti approssimativamente a 110 cm^2 di ghiandole sudoripare; queste zone si interfacciano con piccole aperture alla base dello strato microfluidico e attraverso un percorso convogliano il sudore dalla pelle ai microcanali e, infine, ai microserbatoi. La pressione positiva generata dal naturale meccanismo di secrezione del sudore guida il flusso di sudore attraverso le entrate del sistema microfluidico. Le geometrie e le dimensioni dei canali microfluidici, delle valvole e dei microserbatoi sono sufficientemente grandi da supportare un flusso abbondante e senza ostacoli di sudore. I canali microfluidici portano a regioni di microserbatoi che contengono saggi fluorimetrici adattati per cloro, sodio e zinco. Nel dispositivo analizzato ci sono tre microserbatoi collegati attraverso canali ricurvi con valvole che permettono al fluido di passare solo ad una pressione sufficientemente alta; queste valvole consentono una raccolta dei campioni del sudore sequenziale di circa $2 \mu\text{L}$

per ogni serbatoio per un volume totale di 8.1 μL . I due serbatoi circolari collocati tra i sistemi di analisi servono come marcatori di riferimento della fluorescenza e contengono al loro interno un liquido ionico di concentrazione conosciuta mescolato con una tintura fluorescente.

Un sottile anello di silicone nero è attaccato sulla superficie superiore del dispositivo per prevenire la foto decolorazione delle sonde fluorimetriche. Il basso modulo elastico e la superficie naturalmente aderente del materiale siliconico permettono a questo strato di poter essere staccato e riattaccato in maniera facile e reversibile.

In aggiunta all'analisi fluorescente dei biomarcatori del sudore, i microcanali con forma a fiore al centro del dispositivo permettono la misurazione del tasso di sudorazione; il volume di sudore perso localmente può poi essere correlato a quello perso totalmente attraverso un fattore di calibrazione.

Il modulo ottico con filtri integrati si collega all'obiettivo e al registratore di immagini del cellulare per facilitare le misurazioni ripetitive e rapide sul campo. La scatola schermata scura con filtri di eccitazione ed emissione cattura le immagini fluorescenti attraverso le funzioni standard della fotocamera del cellulare. I filtri permettono l'utilizzo del bagliore dei LED come fonte di luce di eccitazione e il registratore di immagini come un rilevatore della fluorescenza risultante.

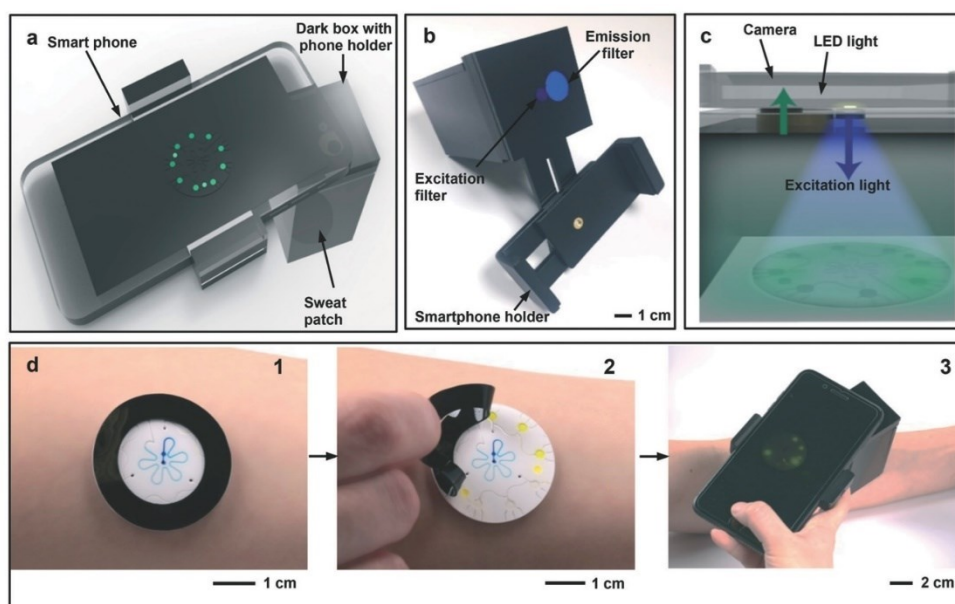


Figura 14 (a)Dispositivo composto dal cellulare e dal modulo ottico per rilevare l'immagine; (b) modulo ottico composto di una scatola scura con filtri di emissione ed eccitamento; (c) immagine del sistema di rilevamento; (d) procedura per l'analisi del sudore: 1. Raccolta di sudore attraverso il dispositivo 2. Rimozione del film protettore 3. Acquisizione dell'immagine attraverso il cellulare e il modulo ottico [11]

In particolare, uno strato blu trasparente attraversa una gamma stretta di lunghezze d'onda (451 ± 35 nm) dal LED per eccitare le sonde fluorescenti (lunghezza d'onda di eccitazione di 400-530 nm). Un pezzo colorato di vetro blocca le lunghezze d'onda sotto i 513 nm, per consentire la misura di segnali fluorescenti eccitati senza interferenze dalla luce di eccitazione.

La progressione del sudore attraverso il dispositivo può essere descritta come segue: il sudore secreto dalla pelle entra nel dispositivo e si diffonde all'interno della struttura a forma di fiore fino a giungere all'interno dei serbatoi. A questo punto, l'utilizzatore può rimuovere la pellicola nera sopra i serbatoi fluorescenti per catturare l'immagine dei microserbatoi attraverso l'utilizzo dello smartphone e del modulo ottico. Il segnale fluorescente emesso da ciascun microserbatoio è correlato in maniera quantitativa alla concentrazione dell'analita target (e.g. sodio, cloro e zinco); per ottenere il valore di concentrazione dell'analita si utilizza la calibrazione. La calibrazione coinvolge innanzitutto l'analisi dell'intensità dalle immagini di ciascun serbatoio, normalizzando questi risultati attraverso l'intensità della regione di riferimento. Il riferimento consiste in un colorante fluorescente stabile (cloruro di rodamina 110) dissolto in un liquido ionico per prevenire l'evaporazione. Il cloruro di rodamina ha una lunghezza d'onda di eccitazione comparabile con quelli delle sonde fluoridriche.

Le differenti sonde fluorescenti individuate in ciascun serbatoio reagiscono con il cloruro, con il sodio o con lo zinco con un'alta selettività. Per il cloruro, l'intensità della fluorescenza decresce esponenzialmente con l'aumento della concentrazione di cloruro nel range da 5 mM a 100 mM, che copre il normale range per il sudore (circa 20-60 mM). In questo caso, la sonda fluorescente utilizzata (lucigenin, composto aromatico utilizzato nella chemiluminescenza con $\lambda_{ex}=428$ nm, $\lambda_{em}=511$ nm) reagisce con il cloruro provocando una diminuzione della sua fluorescenza attraverso un meccanismo di collisione.

Per quanto riguarda il sodio, l'intensità della fluorescenza dalla sonda del sodio (un derivato dell'etere corona con $\lambda_{ex}=493$ nm, $\lambda_{em}=515$ nm) aumenta linearmente con la concentrazione di sodio. Nonostante il segnale fluorescente sia estremamente fioco per concentrazioni al di sotto di 20mM, l'intensità può essere facilmente misurata e mostra una dipendenza lineare della concentrazione attorno al normale range del sudore.

Per lo zinco l'intensità della fluorescenza aumenta linearmente con la concentrazione nell'intervallo da 1 a 20 μ M al momento del legame tra la sonda dello zinco ($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=519$ nm) e Zn^{2+} , che si allinea con il range fisiologico (1.4-27 μ M).

Questi risultanti indicano che l'intensità della fluorescenza è fortemente correlata con la concentrazione di ciascun analita target con un'alta riproducibilità e accuratezza.

Lo studio condotto sul dispositivo ha coinvolto dei volontari in buona salute, ciascuno con il sensore posto sulla parte superiore del braccio e sottoposti ad attività fisica. I risultati del sensore sono più che ottimali e il dispositivo, che necessita di qualche miglioramento, giocherà un ruolo fondamentale negli studi futuri sulla composizione chimica del sudore, essendo a basso costo ed avendo un design più semplice se confrontato con i sensori elettrochimici. [11]

6 LIMITAZIONI E CRITICITÀ

L'utilizzo del sudore come biofluido di interesse per l'analisi della sua composizione è un campo di recente sviluppo che presenta ancora alcune difficoltà da superare. Infatti, sia il trattamento del biofluido stesso che le tecniche di rilevazione e le componenti dei biosensori necessitano di miglioramenti per ovviare agli ancora numerosi problemi presenti nel metodo.

6.1 Problemi legati al biofluido

I primi problemi che verranno analizzati riguardano il sudore e i campioni che da esso vengono prelevati.

La prima difficoltà nasce dalla possibile evaporazione dei campioni; sebbene limitare l'analisi a specifiche zone del corpo, nel punto dove viene secreto il sudore, permetta di migliorare in parte questo problema, l'evaporazione può ancora compromettere il campione in quanto agisce rapidamente su piccoli volumi di sudore esposto, modificando la concentrazione dei biomarcatori costituenti. È quindi necessario un rilevamento rapido per garantire che la lettura del sensore non sia corrotta da artefatti di evaporazione. [19] Per ovviare a questo problema è preferibile utilizzare sensori *on-skin* che raccolgano e analizzino il campione di sudore nello stesso punto, minimizzando l'evaporazione. [6]

Un altro problema consiste nella contaminazione dei campioni dovuta alle sostanze presenti sulla superficie della pelle. Le sostanze chimiche assorbite dalla pelle, come i prodotti cosmetici oppure gli agenti inquinanti presenti nell'ambiente, possono insinuarsi all'interno del sudore secreto e compromettere l'analisi. Incorporare strumenti che permettano di isolare il sudore dalla superficie della pelle o che consentano di separare il campione dagli agenti inquinanti è cruciale per prevenire l'interferenza di queste sostanze chimiche sulla lettura dei sensori.

Inoltre, un'altra difficoltà riguarda in maniera stretta il sudore stesso; se da un lato, infatti, nelle applicazioni cliniche di questa tipologia di sensori si ha il problema della produzione del sudore, in campo sportivo questa difficoltà non si pone ma ne subentra un'altra: la continua termoregolazione fa sì che il sudore appena prodotto si mescoli con quello secreto in precedenza. Senza tecniche per controllare il flusso del biofluido che permetta il rilevamento del solo sudore appena prodotto, la lettura del sensore può al massimo dare una media dei profili analitici più che una misurazione del valore in tempo reale.

Un altro problema riguardante il biofluido concerne gli effetti del tasso di sudorazione sulle concentrazioni degli analiti. Ad esempio, il sodio e il cloruro aiutano nella produzione del sudore e sono in genere più concentrati in tassi di sudorazione elevati. Per molecole grandi,

è possibile che tassi di sudorazione più elevati abbiano bisogno di un tempo minore per l'equilibrio delle concentrazioni attraverso le ghiandole sudoripare e il sangue circostante. Questo implica che mentre la lettura dei sensori del sudore può essere accurata, questi sono altamente dipendenti dal tasso al quale gli analiti vengono estratti dalla superficie della pelle invece di essere puramente descrittivi del livello di analiti nel sangue. L'identificazione e la compensazione degli effetti del tasso di sudorazione sono quindi necessarie per avere una stima più veritiera della composizione del sudore. [19]

Inoltre, bisogna considerare il fatto che il tasso di sudorazione delle ghiandole sudoripare e il volume del sudore può variare nelle diverse regioni del corpo anche da individuo a individuo, oltre che dipendere dalla natura e dalla durata degli esercizi fisici e cambiare all'interno dell'arco della giornata, rendendo difficile una reale correlazione con la salute e l'esercizio fisico. Un volume sufficiente di sudore appena secreto (10-20 μ L) e l'eliminazione del sudore vecchio sono dei parametri importanti per la realizzazione del dispositivo per una rilevazione ottimale del sudore.

Inoltre, anche la dieta e i cibi consumati possono alterare la composizione chimica del sudore. Per esempio, alcuni cibi e bevande sono conosciuti per contenere livelli alti di sodio (e.g. noci salate, prosciutto crudo, bevande gasate), potassio (e.g. banane, verdure a foglia, arance) e calcio (e.g. latte, formaggio, yogurt). È inoltre ragionevole pensare che il sudore cambi in composizione in seguito ai pasti in maniera diversa in individui con diversi gradi metabolici e quindi sarebbe più adatto un processo di customizzazione del sensore, per permettere una rilevazione delle componenti del sudore il più vicino possibile alla realtà. Per quanto riguarda tutti questi aspetti fisiologici, non è ancora completamente chiaro come varino e come il sudore risenta di questi cambiamenti; ecco perché è fondamentale approfondire la fisiologia della secrezione e della composizione del sudore. [6]

Come appena esaminato, la contaminazione dalla pelle e l'evaporazione del sudore possono corrompere la concentrazione degli analiti che riflettono i cambiamenti post secrezione nella composizione del biofluido. In maniera simile, gli effetti del tasso di sudorazione possono impattare la concentrazione finale degli analiti. Esistono quindi due approcci chiave per affrontare il problema dell'integrità dei dati: l'utilizzo della microfluidica e la rilevazione multiparametro.

L'integrazione della microfluidica all'interno di sensori per il sudore indossabili supera molti dei problemi che diminuiscono l'integrità dei dati. Una volta che il sudore entra all'interno dei canali microfluidici è isolato dalla cute, in maniera da evitare la continua entrata di sostanze chimiche dalla pelle nel sudore. I canali possono essere disegnati per

direzionare il sudore vecchio lontano dal sensore e permettere al sudore appena prodotto di interagire con la parte sensibile. Questo consente una lettura il più possibile vicina ad una valutazione in tempo reale, invece di procedere con un'analisi off-line che fornisca delle medie della concentrazione di analiti a determinati time point. Inoltre, i canali microfluidici, racchiudono il sudore mentre viaggia all'interno del dispositivo, minimizzando l'evaporazione.

La misurazione multiparametro, ovvero di molti analiti simultaneamente, può aiutare a chiarire quali cambiamenti nel segnale provengono da variazioni vere degli analiti oppure da effetti del tasso di sudorazione. Per esempio, un aumento nel livello di sodio può indicare sia cambiamenti fisiologici nel corpo sia un incremento nel tasso di sudorazione. Parallelamente, il rilevamento di un analita come il potassio, che non dipende fortemente dal tasso di sudorazione, o il monitoraggio diretto del tasso di sudorazione può aiutare a distinguere le potenziali cause del cambiamento dello ione. Altre variazioni potrebbero derivare dalla dipendenza dei sensori stessi da determinati parametri invece che dagli analiti. Per esempio, l'attività degli enzimi ancorati allo strato rilevatore può cambiare con il pH. In conseguenza, cambiamenti di alcuni analiti come il glucosio potrebbero dipendere da cambiamenti nel pH del sudore invece che da fluttuazioni della composizione del sudore. Anche la temperatura corporea può alterare il segnale e dovrebbe essere monitorata simultaneamente all'acquisizione di sudore per permettere una calibrazione accurata.

Altre problematiche sull'integrità dei dati emergono quando i sensori dimostrano una reattività con più di un analita invece che essere perfettamente selettivi. Per esempio, anche dopo aver utilizzato la ionoforesi, i sensori per il calcio e per il potassio rispondono ancora ai cambiamenti del contenuto di sodio. Il rilevamento multiparametro consente di superare questo problema; la risposta di un gruppo semiselettivo di sensori può essere valutata collettivamente per generare uno schema che è indicativo di un certo analita e della sua concentrazione, anche se ciascun sensore separatamente non può trasdurre in maniera univoca questa informazione. Generalmente, il rilevamento multiparametro può aiutare a isolare l'interdipendenza tra i fattori derivati dagli analiti, dai sensori e dall'ambiente per far sì che le misure di concentrazione siano il più possibili indicative della fisiologia. [19]

Un esempio di rilevamento multianalita è mostrato nel sensore elettrochimico nella figura sottostante (**Figura 15**); il sistema di rilevamento utilizza vari elettrodi microfabbricati che si basano su enzimi e ioni selettivi depositati su un foglio flessibile in PET. Questo sistema combina vari metodi di trasduzione elettrochimica, in quanto supporta il rilevamento amperometrico del glucosio e del lattato e il rilevamento potenziometrico del cloruro, del

sodio e del potassio. Inoltre, poiché la temperatura può alterare la rilevazione, un sensore resistivo di temperatura compensa le fluttuazioni date dalla stessa.

Altri due esempi di sensore che sfruttano il rilevamento multiparametro sono quello colorimetrico e quello fluorimetrico, che consentono il rilevamento di più analiti diversi su un unico dispositivo, come presentato nel capitolo precedente. [10]

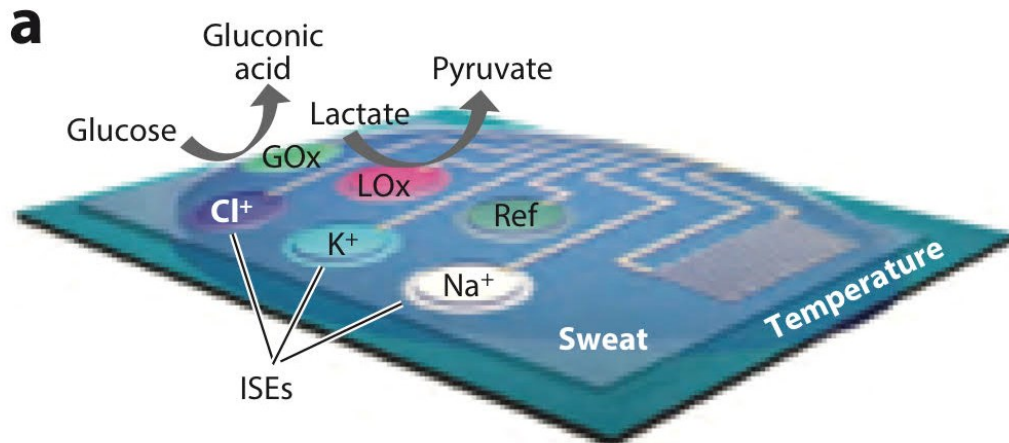


Figura 15 Piattaforma elettrochimica multiparametrica per il rilevamento del lattato, del glucosio, del sodio, del potassio e del cloruro [10]

6.2 Problemi relativi al design e ai biosensori

Due delle caratteristiche più importanti per qualsiasi tipologia di sensore sono la sensibilità e la selettività, che permettono una quantificazione accurata degli analiti in analisi, ma sono fondamentali anche la stabilità, i limiti di rilevamento e la risposta nel tempo di un sensore. La selettività è l'abilità di un sensore di rilevare preferenzialmente gli analiti target in presenza di altre specie potenzialmente interferenti. Per ottenere questo risultato, per esempio, nei sensori elettrochimici amperometrici, si utilizzano enzimi che proprio per le loro proprietà rendono i dispositivi altamente specifici. Come però è stato già evidenziato nei capitoli precedenti, gli enzimi hanno delle limitazioni intrinseche, come bassa resistenza agli agenti chimici e facilità di degradazione soprattutto sopra determinate temperature. Inoltre, in sensori che, come quelli amperometrici, si fondano su reazioni redox, l'alta selettività è difficilmente raggiunta poiché gli enzimi incorporati nei sensori potrebbero richiedere delle tensioni alte per far scattare la reazione di interesse; le alte tensioni possono quindi sollecitare anche altri componenti elettrochimici attivi presenti nel sudore che, andando incontro a reazioni redox, diventano un segnale indesiderato.

Un altro fattore chiave che influenza la selettività è il *biofouling* ovvero l'accumulo di specie chimiche sulla superficie di sensing che gradualmente degrada le prestazioni dei sensori.

Questo effetto può essere ridotto incorporando delle membrane semipermeabili come il Nafion, un fluoropolimero-copolimero, o l'acetato di cellulosa, per escludere le cariche indesiderate oppure aggiungendo strati pre-ossidanti alla fine dell'interfaccia di rilevazione per inattivare interferenze elettroattive.

La sensibilità, definita quantitativamente come la pendenza della retta di calibrazione, è la misura di quanto il segnale in uscita muta in risposta ai cambiamenti dell'ingresso quindi, in questo caso, alle variazioni di concentrazione dell'analita. Poiché molti analiti del sudore sono normalmente ben regolati per rimanere all'interno di un range stretto, sensori altamente sensibili sono richiesti per catturare piccole ma fisiologicamente rilevanti fluttuazioni nella loro concentrazione. Questo è particolarmente importante quando è necessario un continuo monitoraggio dell'evoluzione del profilo dei biomarker, come ad esempio il rilevamento del livello degli elettroliti durante l'esercizio fisico. Nonostante ciò, i sensori per il rilevamento della composizione del sudore devono ancora migliorare sotto questo aspetto, soprattutto per quanto riguarda il metodo elettrochimico.

Il limite di rilevamento indica la più bassa concentrazione di elettroliti che un sensore può distinguere e deriva dal rapporto segnale-rumore. Il rumore può derivare dagli analiti interferenti, dalla deriva di un sensore, o da variazioni locali di concentrazione. Migliorare i limiti di rilevamento richiede l'amplificazione del segnale di interesse oppure la soppressione del rumore di fondo; entrambi gli accorgimenti possono essere ottenuti con i giusti materiali e schemi di rilevamento. I sensori dovrebbero essere progettati per avere i loro limiti di rilevamento al di sotto del range di concentrazioni fisiologicamente rilevanti degli analiti di interesse. È possibile abbassare i limiti di rilevamento per specie chimiche con una bassa concentrazione attraverso elettrodi ioni selettivi; i limiti inferiori vengono ottenuti attraverso la deposizione elettrochimica di polimeri conduttivi. I limiti di rilevamento di sensori voltammetrici possono essere abbassati attraverso l'uso di nanoparticelle o nanostrutture per migliorare l'affinità o aumentare il numero dei siti di reazione.

La stabilità di un sensore è l'abilità di mantenere costante il suo segnale senza attenuazioni. Tutti i sensori elettrochimici soffrono della deriva del segnale, che può accumulare errori con il tempo estremamente dannosi per le misure eseguite in continuazione, limitando il tempo di vita del sensore per operazioni a lungo termine. Le sorgenti di deriva del segnale variano in base al metodo di rilevamento utilizzato. Nel caso della trasduzione

potenziometrica si ha il rischio di formazione di uno strato sottile acquoso tra la membrana di rilevamento e l'elettrodo conduttivo che può causare cambiamenti nell'effettiva composizione del sensore stesso nel tempo, producendo potenziali variazioni. L'aggiunta di specie chimiche idrofobiche può minimizzare questo effetto, mentre depositare polimeri conduttivi (e.g. polistirene, polipirrolo) migliora la stabilità. Le variazioni possono affliggere anche i sensori enzimatici in quanto gli enzimi si possono inattivare chimicamente a causa di prodotti secondari di reazioni redox e possono anche distaccarsi dalla membrana di rilevamento con il tempo, causando attenuazioni del segnale e perdita di sensibilità e selettività. Questi effetti possono essere minimizzati attraverso il bloccaggio degli enzimi su matrici di supporto, attraverso la creazione di legami incrociati con polimeri e la formazione di complessi poli-ionici per il mantenimento degli enzimi. Tuttavia, modificare chimicamente gli enzimi può portare degli svantaggi in quanto può comprometterne l'attività enzimatica; è necessario quindi trovare un equilibrio per ottimizzare sia la stabilità che la sensibilità.

La risposta nel tempo governa il tempo necessario alla risposta del sensore per stabilizzarsi ad un valore affidabile quando la concentrazione degli analiti cambia. Per il monitoraggio continuo, avere un tempo di risposta veloce è critico per assicurare che i cambiamenti dinamici nella concentrazione del sudore vengano rilevati in tempo reale. Il trasporto e la cinetica della reazione possono essere ottimizzati attraverso il miglioramento dello spessore e della permeabilità della membrana rilevatrice. Tipicamente, l'aggiunta di strati anti-impronta ritarda il tempo di risposta attraverso l'utilizzo di ostacoli alla diffusione. Tempi di risposta più brevi vengono solitamente ottenuti quando l'attività di riconoscimento della specie sono alte e lo spessore dello strato di rilevamento è più bassa. [19]

Infine, una questione di fondamentale importanza per qualsiasi tipologia di sensore indossabile, ma in generale per qualsiasi strumento di utilizzo biomedico è la biocompatibilità. È infatti necessario valutare se il dispositivo provoca irritazioni o altre tipologie di reazioni avverse, come potrebbe accadere con l'utilizzo di cerotti e tatuaggi o comunque di dispositivi a stretto contatto con la cute, come nel caso dei sensori *on-skin*. [6]

6.3 Problemi legati all'elettronica

Il consumo di energia è uno dei parametri da tenere maggiormente in considerazione per quanto riguarda i sensori indossabili in generale. La riduzione del consumo dell'alimentazione è una richiesta fondamentale per queste tipologie di sensori in quanto

necessitano di operare costantemente per periodi di tempo prolungati. L'efficienza dell'alimentazione diventerà sempre più critica in base al numero di sensori presenti sul dispositivo indossabile. [6]

L'elettronica necessaria per condizionare i sensori è fondamentale per schemi di rilevamento appropriati, per processare i segnali, per filtrare il rumore e per trasmettere i risultati calibrati consentendo una facile leggibilità e visualizzazione. Alcune delle piattaforme per il rilevamento del sudore di maggior successo utilizzano un'elettronica ibrida, combinando substrati flessibili per il rilevamento che si conformano con il corpo con tradizionali circuiti integrati in silicene per l'elaborazione e la trasmissione del segnale. Varie topologie e substrati sono disponibili per i componenti elettronici, inclusi polimeri con stampati elementi conduttivi o PCB, *printed circuit board*, flessibili. In particolare, le PCB flessibili hanno dimostrato di essere particolarmente promettenti, in quanto possono essere prodotte su larga scala e a basso costo utilizzando processi industriali di comune utilizzo.

Minimizzare la perdita di alimentazione è un fattore chiave ed è quindi molto importante capire dove la perdita di energia è maggiore in un tipico sensore indossabile e come può essere ridotta. Un esempio per il miglioramento di questo parametro è dato da una piattaforma che permette il continuo e molteplice rilevamento di ioni e metaboliti. Lo scheletro elettronico di questo dispositivo è costituito da una parte anteriore analogica per condizionare il segnale, un convertitore analogico digitale (ADC), un microcontrollore pre-programmato che calibra il segnale in valori di concentrazione e una componente Bluetooth per la trasmissione a un dispositivo esterno come un cellulare per una più facile lettura. Il consumo di energia nel circuito anteriore analogico deriva dai componenti attivi come ad esempio gli amplificatori operazionali, e ammonta a qualche mW in base all'esatto circuito; una potenza simile viene estratta dall'ADC e dal microcontrollore. La componente per la trasmissione Bluetooth utilizza intorno ai 30 mW e domina il consumo di energia in questa tipologia di dispositivo ma può essere migliorata attraverso l'impiego di nuove tecnologie come, ad esempio, il *Bluetooth Low Energy* (BLE). Inoltre, in base all'applicazione, è possibile eseguire una trasmissione periodica dei dati attraverso la quale il dispositivo alterna fasi di trasferimento e stati di bassa energia; questo metodo è sufficiente solo in caso in cui sia necessaria una lettura semicontinua di analiti, consentendo un'ulteriore riduzione delle spese generali di energia. Oltre al Bluetooth, anche la comunicazione di prossimità (NFC) può permettere il trasferimento dei dati senza il bisogno di alimentare a batteria le componenti di trasmissione all'interno del sensore stesso, consentendo invece l'utilizzo del dispositivo ricevente per attivare la misurazione del sensore e la raccolta di dati. Tuttavia,

questo metodo consente un'interazione a più corto raggio tra il sensore e lo strumento di ricezione, impedendo la rilevazione continua e autonoma senza il coinvolgimento dell'utilizzatore nel portare il cellulare vicino al sensore. Una terza opzione è quella di mostrare direttamente i risultati su un display. Tuttavia, senza capacità aggiuntive per l'immagazzinamento e lo scaricamento delle informazioni, questo metodo impedisce l'accumulo di dati o la diffusione agli allenatori ed è quindi meno attrattiva per le applicazioni di monitoraggio.

Complessivamente, la scelta di protocolli di comunicazione wireless dipende da molti criteri, incluso il consumo di energia, velocità di generazione di dati, richieste di larghezza di banda e compatibilità con il resto della circuiteria. [19]

Il filtraggio dei segnali grezzi per eliminare il rumore è un ruolo fondamentale per qualsiasi componente elettronica implementata all'interno di un sensore. Il movimento, parte fondamentale di qualsiasi attività fisica ma dovuto anche alla flessibilità dei materiali con cui sono composti i circuiti, può contribuire al rumore, in particolare alterando la connettività e l'impedenza all'interfaccia tra la componente di rilevazione e la PCB. Inoltre, nel caso di dispositivi multiparametro, il rumore può essere dato da interferenze tra le varie modalità di rilevamento. I filtri passa basso possono essere inclusi nella parte analogica iniziale per eliminare il rumore ad alta frequenza dato dal movimento o fluttuazioni nello strato di rilevazione. Diverse modalità di analisi saranno necessarie per conservare componenti del segnale DC, transitorie o AC in base a che metodo di trasduzione utilizza il sensore; i percorsi per isolare i componenti del segnale desiderato devono essere sviluppati di conseguenza. Gli ordini dei filtri e le frequenze di taglio possono anche essere adattati in base allo schema di rilevamento e alla frequenza di campionamento dei dati. Altri esempi di rumore e artefatti da segnali indesiderati emergono durante la misurazione multicomponente. Quando misurazioni passive di correnti o tensioni vengono combinate con misurazioni attive che richiedono l'applicazione e la scansione delle tensioni, i campi applicati possono interferire con la lettura degli elettrodi passivi. Interruttori possono essere incorporati per alternare i percorsi di rilevamento e quindi prevenire scambi e interferenze elettromagnetiche. [19]

7 SFIDE FUTURE

Nonostante ci siano stati dei miglioramenti sostanziali nei biosensori per l'analisi della composizione del sudore, ci sono ancora numerosi passi da fare su molti aspetti come la stabilità, la sensibilità, la selettività e l'alimentazione. Per esempio, i sensori potenziometrici richiedono procedure di calibrazione, la conservazione in soluzioni di condizionamento e altre operazioni che sono difficilmente eseguibili nei dispositivi indossabili. Inoltre, l'utilizzo di questi dispositivi sotto diverse condizioni richiede risposte stabili sotto un grande range di temperature, composizione di sudore, livelli di esposizione alla luce del sole e altri fattori che potrebbero far variare la risposta del segnale. Queste variazioni sono particolarmente significative perché le concentrazioni di determinati analiti nel sudore sono spesso molto basse. In questi casi, le performance potrebbero essere degradate dal rumore e dall'interferenza di altre specie chimiche. I biosensori tradizionali aggirano questi problemi attraverso l'utilizzo di meccanismi di rilevazione a più stadi per l'analisi di livelli di analiti molto bassi e il pretrattamento dei campioni per migliorare la selettività. Queste tecniche, tuttavia, sono incompatibili con i dispositivi indossabili che necessitano di campionare il sudore direttamente dalla cute e un'analisi sul sito in tempo reale. Quindi, la ricerca di nuove tecnologie elettrochimiche e ottiche è un'area molto promettente per il miglioramento di queste tipologie di dispositivi per una sensibilità e selettività maggiore dei componenti del sudore. [10]

7.1 Progressi futuri legati al biofluido

Innanzitutto, è importante puntare sul miglioramento e la conoscenza più profonda del sudore come biofluido, in particolar modo sugli analiti di bassa concentrazione e meno comuni. Molti degli analiti del sudore, infatti, sono facilmente rilevabili in quanto sono presenti in quantità sufficienti, dell'ordine dei micro e delle milli moli e possono essere registrati con metodi semplici e selettivi. Tuttavia, il sudore contiene tracce di molti altri elementi più difficili da registrare come gli ormoni, le proteine e i peptidi. Queste molecole complesse hanno funzioni regolatorie o di segnale all'interno del corpo e studi hanno suggerito che la loro concentrazione nel sudore potrebbe essere correlata direttamente con il sangue. Il rilevamento di queste molecole nel sudore può quindi dare uno sguardo fisiologico maggiore all'interno dei meccanismi omeostatici e della salute del corpo. L'obiettivo degli scienziati si sta infatti concentrando sul capire la correlazione tra sangue e sudore, in modo da aprire nuove possibilità di indagine grazie a quest'ultimo.

Poiché le capacità di rilevamento migliorano e si espandono verso nuovi biomarcatori, è importante investigare la rilevanza fisiologica del sudore per il monitoraggio della salute.

Capire i meccanismi attraverso i quali si ripartiscono gli analiti all'interno del sudore può far luce su come la loro concentrazione rifletta lo stato complessivo del corpo, in quanto questi processi sono ancora poco chiari se non per gli ioni più semplici e i metaboliti. [19]

Ecco perché è di notevole importanza, per questa tipologia di sensori, approfondire gli studi sul comportamento delle ghiandole sudoripare e sulla composizione del sudore in generale. Per esempio, non è ancora del tutto noto come la macchina cellulare operi esattamente per cambiare la fuoriuscita di sudore in risposta al calore o all'esercizio. Inoltre, è ancora poco chiaro come il sudore cambi in composizione a seguito dei pasti negli individui con diversi gradi metabolici ed è difficile predire la relazione tra gli analiti e i segni vitali e come le loro concentrazioni cambino nel tempo nel corso della disidratazione. [6]

Molte di queste sfide possono essere affrontate attraverso innovazioni tecnologiche a livello di dispositivo, ma è altrettanto importante esaminare a livello fisiologico la produzione degli analiti del sudore e comprendere maggiormente i meccanismi di partizione dei biomarker e la loro dipendenza sul tasso di sudorazione.

7.2 Progressi futuri legati ai biosensori

Il continuo progresso nel campo dei sensori indossabili richiede ulteriori miglioramenti nei processi di produzione, nello sviluppo dei biosensori, nella valutazione, nella miniaturizzazione dei sensori e dell'impaccamento fluidico per rivolgersi alle più importanti sfide tecniche che possono essere classificate secondo le seguenti categorie:

- 1) Rapido rilevamento, campionamento e immagazzinamento del sudore (**manipolazione del fluido**)
- 2) Alta sensibilità del sensore anche in condizioni ambientali sfavorevoli (**prestazioni analitiche**)
- 3) Adeguata capacità di memoria e di alimentazione per operazioni continue (**richieste energetiche**)

Per quanto riguarda il primo punto, la **manipolazione del fluido**, i sensori indossabili per il sudore sfruttano la naturale attività di pressione dalle ghiandole eccrine per guidare passivamente il sudore ai sensori biochimici attraverso i canali microfluidici. Questi dispositivi devono supportare le operazioni sotto un vasto numero di condizioni, incluse variazioni anatomiche nella densità delle ghiandole sudoripare, cambiamenti fisiologici (e.g. stress, dieta) e diverse condizioni ambientali (e.g. umidità, temperatura). Come già visto nei capitoli precedenti, questi fattori esterni possono influenzare in maniera significativa il tasso di produzione di sudore e la sua biocomposizione. Il continuo monitoraggio del sudore attraverso

L'utilizzo di sensori elettrochimici richiede un flusso continuo di sudore appena secreto per permettere un costante processo di reazione/analisi sulla superficie del sensore. Al contrario, i sensori che usufruiscono del metodo colorimetrico e a fluorescenza richiedono un rilevamento di volumi di sudore definiti per assicurare una completa reazione ed evoluzione del segnale ottico. Queste esigenze contrastanti, insieme agli obblighi aggiuntivi come condizioni di operamento e locazioni sull'interfaccia del corpo, richiedono sofisticate strategie per il design del dispositivo.

Lo sforzo dei ricercatori si concentra sull'adattare tecnologie microfluidiche ben stabilizzate, rigide e dure in dispositivi elastici e leggeri per adattarsi all'interfaccia cutanea. Inizialmente i dispositivi sfruttavano delle semplici reti di microcanali e serbatoi per catturare il sudore direttamente dall'epidermide. Recentemente la struttura è diventata più complessa, incorporando valvole e strategie per il mescolamento dei fluidi; le prime consentono il trasporto del sudore in specifiche zone per l'analisi mentre le seconde consentono una più facile rilevazione degli analiti a basse concentrazioni.

Le valvole passive utilizzano variazioni di pressione definite dalla geometria, la funzionalizzazione della superficie (e.g. superficie idrofilica e superficie idrofobica) oppure un'unica reazione chimica per direzionare il sudore ad una isolata specifica regione di rilevamento. Nonostante le valvole passive siano di facile implementazione, possiedono due importanti svantaggi: una volta attivate sono irreversibili e sono inclini al fallimento per applicazioni ad alta intensità. Le valvole attive rappresentano un potenziale strumento per queste limitazioni attraverso la possibilità di controllo dinamico del trasporto del fluido. Uno dei metodi più recenti utilizza idrogel termoreattivi ed elementi riscaldanti wireless per il controllo dinamico del fluido.

Un altro meccanismo di controllo del sudore è la miscelazione attiva all'interno dei costrutti microfluidici a contatto con l'epidermide per facilitare il complesso trattamento dei campioni e la loro analisi, soprattutto per quanto riguarda gli analiti presenti in basse concentrazioni. Siccome i dispositivi per il sudore operano in un regime con un basso numero di Reynolds, quindi in regime laminare, questo preclude strategie di miscelazione passiva non diffusiva. Inoltre, la maggior parte dei dispositivi cerca di evitare interazioni diffusive dei campioni per far sì che questi non si contaminino. I dispositivi microfluidici tradizionali offrono un approccio alternativo attraverso il quale l'applicazione di un campo esterno (e.g. elettroforesi, acustoforesi, magnetoforesi) o di una struttura fisica (e.g. lembi, valvole) mescolano il fluido. Questi metodi spesso usufruiscono di meccanismi che precludono il loro utilizzo in forme indossabili; nonostante ciò, una recente dimostrazione utilizza locali gradienti di temperatura indotti dall'applicazione di un campo elettrico oscillatorio non uniforme per facilitare il

mescolamento in base alle necessità. Un altro approccio combina camere di aria e valvole permettendo il mescolamento attraverso pompaggio manuale. Il continuo sviluppo degli approcci per il mescolamento del fluido combinato con il controllo programmato del suo flusso permetterà ulteriori miglioramenti nelle analisi ad alta precisione per analiti a bassa concentrazione. [20]

Per quanto riguarda il secondo punto sulle **prestazioni analitiche**, la natura intrinseca dinamica del sudore fa sì che i sensori indossabili operino in un ambiente in rapida evoluzione dove la performance dei sensori e/o i cambiamenti nella biochimica pongono sfide significative per ottenere misurazioni accurate e di alta qualità. Soprattutto gli analiti presenti in basse concentrazioni richiedono una considerazione attenta delle metodologie di stimolazione del sudore, correlate con le condizioni fisiologiche e la contaminazione dei campioni.

In particolar modo è fondamentale la minimizzazione della contaminazione dei campioni durante la collezione del sudore. Le tipiche strategie includono l'ottimizzazione del dispositivo e dell'interfaccia epidermica e assicurano un consistente flusso attraverso la superficie del sensore per ridurre gli effetti delle specie interferenti.

Stabilire un'equivalenza operativa per i sensori del sudore indossabili con i metodi biochimici tradizionali richiede l'impiego di strategie che consentano un funzionamento stabile e prevedibile del sensore invariante delle condizioni ambientali esterne. I sistemi indossabili non devono solo affrontare le sfide poste dalla variabilità fisiologica e dalla possibile contaminazione, ma anche i progressi legati ai sensori, sia elettrochimici che ottici, per permettere di trasdurre segnali rilevanti da concentrazioni molto basse degli analiti di interesse sotto condizioni ambientali non controllate. Questi analiti possono necessitare l'integrazione di sensori complementari (e.g. pH, temperatura) o complessi pretrattamenti, calibrazioni o stati di reazione per un accurato rilevamento. Inoltre, lo sviluppo di piattaforme indossabili e sistemi di rilevamento biomedico che riescano a separare il segnale di interesse da fonti esterne di rumore, mentre proteggono i campioni dalla degradazione e dalla contaminazione, rappresentano un'importante direzione per ricerche future. [20]

L'ultimo punto considera le **richieste energetiche**, ambito di essenziale rilevanza per quanto riguarda i dispositivi indossabili, soprattutto per quanto concerne la richiesta di miniaturizzazione della forma, delle dimensioni e del peso in modo da permettere una corretta interazione con la pelle. Altre considerazioni derivano dalle necessità specifiche del sensore in termini di frequenze di campionamento, larghezza di banda di comunicazione, distanza di operazione e ciclo di vita del dispositivo. Per la maggior parte dei dispositivi indossabili le

batterie rappresentano l'opzione più versatile per supportare il continuo rilevamento, con limitazioni chiave imposte dall'ingombro e dal peso dato dalla batteria. Inoltre, le strategie di comunicazione wireless, compatibili con questi fattori, hanno particolari richieste energetiche, specialmente per operazioni a corto/lungo raggio. [20]

Molti dispositivi impiegano batterie a bottone commerciali, nonostante il loro peso e le loro proprietà meccaniche rigide. Le batterie flessibili hanno quindi potenziale in questo contesto ma hanno un costo significativo oltre che caratteristiche di performance inferiori rispetto a quelle rigide. Le strategie senza batteria, come la comunicazione di prossimità, sono molto promettenti ma richiedono una vicinanza (fino all'incirca a 1 m) all'antenna di trasmissione per una continua acquisizione dei dati. In definitiva, la cointegrazione semplificata dei vari sottosistemi necessari in un sensore indossabile rimane un ostacolo tecnologico generale. Le difficoltà solitamente derivano dai processi di fabbricazione, dai materiali e dagli incapsulamenti necessari per i vari componenti attivi e passivi. Per esempio, i sensori chimici devono rimanere in contatto diretto con il sudore, mentre l'elettronica deve essere completamente isolata dall'esposizione a qualsiasi biofluido o umidità. Da un punto di vista pratico, l'interferenza tra diversi componenti del sensore spesso sperimentano un fallimento dal punto di vista meccanico. Quindi, strategie di impilamento sofisticate per una robusta integrazione di sottosistemi eterogeni rappresentano un'importante area per lavori futuri. [10]

Nonostante i miglioramenti nell'immagazzinamento dell'energia e nelle chimiche alternative siano importanti per il progresso continuo, diverse recenti dimostrazioni che sfruttano la raccolta di energia suggeriscono nuove direzioni convincenti per aggirare questi problemi nella gestione energetica. Molti esempi incorporano batterie che si attivano con il sudore o supercapacitori per fornire energia sia alle componenti per il rilevamento che per le componenti per la trasmissione dei dati. Queste piattaforme utilizzano una combinazione di materiali e un'architettura del dispositivo per ottenere la generazione di alimentazione altamente indipendente dalla composizione del sudore.

Il mantenimento e lo sfruttamento dell'energia rimane un'area chiave per continue ricerche in modo da ottenere un'equivalenza tra metodi di misura attiva e passiva e allo stesso tempo preservare la semplicità dell'utilizzo e la struttura miniaturizzata. [20] Le ricerche attive per minimizzare la perdita di energia in dispositivi indossabili si concentreranno quindi su trovare metodi per ricavare alimentazione dal calore, dal movimento e dall'ambiente oltre che a integrare componenti di trasmissione a bassa energia e lo sviluppo di opzioni di accumulo di energia indossabili come la miniaturizzazione di super condensatori. [19]

7.3 Algoritmi per la raccolta dei dati e commercializzazione dei dispositivi

I sensori indossabili e in particolare quelli che rilevano le componenti del sudore sono una classe di dispositivi in continua espansione; per questo motivo saranno necessari continui progressi sul campo, anche per quanto riguarda gli algoritmi per la raccolta dei dati.

L'ampia adozione di piattaforme capaci di un monitoraggio continuo a lungo termine espanderà il volume di dati raccolti; questo aumento di dati necessiterà di nuovi algoritmi, nuovi approcci e strumenti per permettere la comprensione dei vari analiti del sudore, in combinazione con marker biofisici e la loro corrispettiva rilevanza fisiologica. [20]

Un elemento fondamentale collegato agli algoritmi di raccolta dei dati è la loro visualizzazione in maniera chiara da parte dell'utilizzatore, compito svolto dalle applicazioni sui cellulari che mostrano i risultati ottenuti. Sarà veramente importante costruire applicazioni che riescano a interpretare e schematizzare i dati rilevati dal sensore in parametri per la salute o per il fitness, come ad esempio il livello di idratazione. Questo potrà essere svolto attraverso analisi rigorose sul campo su diverse fasce di popolazione per generare tabelle, curve di calibrazione e algoritmi di controllo per trasformare i dati rilevati dal sensore in informazioni utili. [6] Rimarrà però sempre presente il problema della customizzazione, elemento critico in qualsiasi dispositivo commerciale, che si accentuerà sempre di più quando la produzione dei sensori per il rilevamento della composizione del sudore si sposterà su larga scala.

Nel complesso, mentre i dispositivi che si interfacciano alla pelle qui evidenziati rappresentano recenti miglioramenti tecnologici nell'utilità della piattaforma, molti importanti e interessanti sfide rimangono nel trasportare questi dispositivi in prodotti commerciali. Gli sforzi per la commercializzazione richiedono strategie regolate, cliniche e di qualità per supportarne l'adozione in combinazione con catene di produzione adeguate a scalare la produzione oltre ai laboratori di fabbricazione universitari. Recenti studi nelle metodologie di produzione hanno infatti dimostrato che i sensori elettrochimici e i sensori ottici, così come i costrutti microfluidici sono compatibili con la produzione a basso costo e su ampia scala. Queste offerte dimostrano la continua convergenza dell'elettronica flessibile ibrida e stabiliscono processi di manifattura su larga scala per supportare lo sviluppo commerciale dei sensori microfluidici indossabili per il monitoraggio della biochimica del sudore. Questi dispositivi rappresentano una classe di tecnologie con un grandissimo potenziale per l'ampia diffusione nello sport, per il benessere del consumatore e nell'industria medica. I sensori sono capaci di fornire un'analisi clinica non invasiva all'interno delle performance sportive ma anche in campo medico combattendo la disidratazione, controllando lo stato di salute, lo stress e la salute metabolica nella vita quotidiana. [20]

8 CONCLUSIONE

I sensori per l'analisi della composizione del sudore sono una classe di dispositivi in forte espansione che necessitano ancora di molti miglioramenti e risoluzioni di problematiche che, una volta superate, consentiranno un ampio sviluppo di queste tipologie di strumenti in ambito sportivo ma non solo. Questi dispositivi, infatti, potrebbero aprire nuovi orizzonti nella medicina clinica, per quanto riguarda la diagnostica di malattie, come è già successo per la fibrosi cistica, ma anche per il monitoraggio dello stato di salute in maniera più semplice.

Il sudore è un biofluido di estrema importanza, facilmente accessibile e la cui raccolta dei campioni non è per niente invasiva come lo è invece il prelievo del sangue. Sarà inoltre di fondamentale importanza trovare una correlazione tra questi due biofluidi, che potrebbe portare ad una parziale sostituzione dell'analisi del sangue per la diagnosi di determinate malattie.

Per quanto riguarda l'ambito sportivo sarà necessario rendere i sensori il meno ingombranti possibile, per consentire un utilizzo senza restrizioni e facilitare qualsiasi movimento per ogni tipologia di pratica sportiva.

Tenendo in considerazione tutte queste sfide, i sensori indossabili per il rilevamento del sudore potrebbero diventare uno strumento utilissimo per gli atleti agonistici, facilitando notevolmente il recupero dopo gli allenamenti, combattendo la disidratazione e consentendo quindi il miglioramento delle performance sportive in maniera assolutamente non invasiva.

9 BIBLIOGRAFIA

- [1] D. R. Seshadri, R. T. Li, J. E. Voos, J. R. Rowbottom, C. M. Alfes, C. A. Zorman e C. K. Drummond, «Wearable sensors for monitoring the internal and external workload of the athlete,» 29 07 2019. [Online]. Available: <http://www.nature.com>.
- [2] «Treccani,» [Online]. Available: <https://www.treccani.it>.
- [3] G. Anastasi, S. Capitano, M. L. Carnazza, S. Cinti, R. De Caro, R. F. Donato, F. V. Ferrario, L. Fonzi, A. T. Franzi, E. Gaudio, R. Geremia, G. Giordano Lanza, C. E. Grossi, M. Gulisano, F. A. Manzoli, G. Mazzotti, F. Michetti, S. Miscia, V. Mitolo, A. Montella, G. Orlandini, A. Paparelli, T. Renda, D. Ribatti, A. Ruggeri, P. Sirigu, A. Soscia, G. Tredici, M. Vitale, D. Zaccheo, G. Zauli e S. Zecchi, Trattato di anatomia umana, Edi. Ermes, 2010.
- [4] G. Arienti e A. Fiorilli, Biochimica dell'attività motoria, Piccin, 2006.
- [5] H. C. Lukaski, «Magnesium, Zinc and Chromium Nutrition and Athletic Performance,» 02 2001. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [6] C. Legner, U. Kalwa, V. Patel, A. Chesmore e S. Pandey, «Sweat sensing in the smart wearables era: Towards integrative, multifunctional and body-compliant perspiration analysis,» 13 07 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com>.
- [7] L. B. Baker, «Sweating Rate and Sweat Sodium Concentration in Athletes: A Review of Methodology and Intra/Interindividual Variability,» 22 03 2017. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [8] W. D. McArdle, F. I. Katch e V. L. Katch, Fisiologia dell'esercizio. L'essenziale, Piccin, 2019.
- [9] D. De Rossi, A. Ahluwalia, A. Mazzoldi, D. Pede e E. P. Scilingo, Sensori per misure biomediche, Pàtron, 2010.
- [10] A. J. Bandodkar, W. J. Jeang, R. Ghaffari e J. A. Rogers, «Wearable Sensors for Biochemical Sweat Analysis,» 12 06 2019. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [11] Y. Sekine, S. B. Kim, Y. Zhang, A. J. Bandodkar, S. Xu, J. Choi, M. Irie, T. R. Ray, P. Kohli, N. Kozai, T. Sugita, Y. Wu, K. Lee, K.-T. Lee, R. Ghaffari e J. A. Rogers, «A fluorometric skin-interfaced microfluidic device and smartphone imaging module for in-situ quantitative analysis of sweat chemistry,» 24 07 2018. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

- [12] M. Chung, G. Frotunato e N. Radacsi, «Wearable flexible sweat sensors for healthcare monitoring: a review,» 09 10 2019. [Online]. Available: <https://royalsocietypublishing.org>.
- [13] E. Sardini, M. Serpelloni e S. Tonello, «Printed Electrochemical Biosensors: Opportunities and Metrological Challenges,» 4 11 2020. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com>.
- [14] H. Yu e J. Sun, «Sweat detection theory and fluid driven methods: a Review,» 09 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/>.
- [15] C. Karunakaran, K. Bhargava e R. Benjamin, Biosensors and bioelectronics, Elsevier, 2015.
- [16] M. F. M. Shakhiah, A. S. Rosslan, A. M. Noor, S. Ramanathan, A. M. Lazim e A. A. Wahab, «Review-Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Sensor for Lactate Detection in Human Biofluids,» 01 06 2021. [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org>.
- [17] F. G. Banica, Chemical sensors and biosensors: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons Inc, 2012.
- [18] A. Koh, D. Kang, Y. Xue, S. Lee, R. M. Pielak, J. Kim, T. Hwang, S. Min, A. Banks, P. Bastien, M. C. Manco, L. Wang, K. R. Ammann, K.-I. Jang, P. Won, S. Han, R. Ghaffari, U. Paik, M. J. Slepian, G. Balooch, Y. Huang e J. A. Rogers, «A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage and colorimetric sensing of sweat,» 23 11 2016. [Online]. Available: <https://www.science.org/>.
- [19] M. Bariya, H. Y. Y. Nyein e A. Javey, «Wearable sweat sensors,» 09 03 2018. [Online]. Available: <https://www.nature.com>.
- [20] R. Ghaffari, J. A. Rogers e T. R. Raye, «Recent progress, challenges, and opportunities for wearable biochemical sensors for sweat analysis,» 01 04 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com>.