



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

**Tesi di Laurea Magistrale in
Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

**REALIZZAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DI BIOSENSORI
ELETTROCHIMICI BASATI SU GRAFENE
PER IL RILEVAMENTO DI INSULINA**

Relatrice: Ing. Monica Giomo

Correlatore: Dott. Francesco Lamberti

Laureanda: CHIARA BALBINOT

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

*A “chi viaggia in direzione
ostinata e contraria”*

De Andrè

Riassunto

In questa Tesi viene presentato lo studio svolto per la realizzazione di un biosensore elettrochimico sensibile all'insulina.

La superficie dell'elettrodo lavorante in oro è stata funzionalizzata e modificata per permettere l'adsorbimento dell'aptamero IBA, utilizzato come elemento per il riconoscimento della molecola target.

Le tecniche usate per la fabbricazione e la caratterizzazione del sensore sono state selezionate in base alle caratteristiche di ciascuno stadio di costruzione, ottimizzando le condizioni di lavoro.

Nello sviluppo del biosensore alcuni stadi di realizzazione hanno richiesto la sintesi chimica di molecole innovative allo scopo di ottimizzare il processo di fabbricazione e le performance del biosensore.

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1 - Materiali e metodi	5
1.1 Materiali	5
1.1.1 Preparazione substrati	6
1.2 Metodi di sintesi	7
1.2.1 Preparazione PirBA-PPD	7
1.2.2 Preparazione dell'aptamero disostituito	8
1.3 Metodi di modifica superficiale dell'elettrodo	10
1.3.1 Grafting	10
1.3.1.1 Grafting PPD	10
1.3.1.2 Grafting PANI	11
1.3.1.3 Grafting 2AB	11
1.3.1.4 Grafting p-ABA	12
1.3.1.5 Grafting PirBA-NHS	12
1.3.1.6 Grafting PirBA-PPD	12
1.3.2 Ricoprimento con GO	12
1.3.3 Riduzione elettrochimica del GO	13
1.4 Rilevamento dell'insulina	13
1.4.1 Adsorbimento dell' aptamero sull'elettrodo lavorante	13
1.4.2 Metodo di rilevamento dell'insulina	13
1.4.3 Calibrazione del biosensore	15
1.4.4 Effetto degli interferenti	16
1.4.5 Rigenerazione del sensore	16
1.5 Metodi di caratterizzazione dell'elettrodo	17
1.5.1 Voltammetria ciclica (CV)	17
1.5.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)	19

1.5.3 Spettroscopia Raman amplificata d superfici (SERS).....	20
1.5.4 Cromatografia su strato sottile (TLC)	21
1.5.5 Spettroscopia di massa ESI-TOF	22
1.6 Strumentazione.....	23
1.6.1 Potenziostato	23
1.6.2 Cella elettrochimica microfluidica	23
Capitolo 2 - Risultati	27
2.1 Grafting su ITO	28
2.1.1 Grafting riduttivo della PPD	28
2.1.2 Grafting ossidativo della PPD: il PANI (polianilina).....	31
2.1.3 Grafting 2AB.....	36
2.1.4 Grafting p-ABA.....	38
2.2 Attacco del pirene.....	41
2.3 Grafting su SPE dorato.....	44
2.3.1 Graftin g ossidativo della PPD: il PANI	44
2.3.2 Grafting 2AB.....	48
2.3.3 Grafting PirBA-PPD	57
2.4 Attacco dell'ossido di grafene (GO) sullo SPE.....	59
2.5 Riduzione elettrochimica dell'ossido di grafene (erGO)	63
2.5.1 Efficienza del ricoprimento di erGO	65
2.6 Rilevamento dell'insulina	68
2.6.1 Adsorbimento dell'aptamero sull'elettrodo lavorante.....	69
2.6.2 Metodo di rilevamento dell'insulina	74
2.6.3 Calibrazione del biosensore	74
2.6.4 Effetto degli interferenti	76
2.6.5 Rigenerazione del sensore	79
Conclusioni.....	83
APPENDICE 1	85
Nomenclatura	87
Bibliografia.....	89

Introduzione

L'insulina è un ormone peptidico prodotto dal pancreas, responsabile del metabolismo dei carboidrati e dei grassi. Essa gioca un ruolo molto importante nel controllo dei livelli di glucosio ematico. La misura della sua concentrazione nel sangue è quindi di fondamentale importanza per la diagnosi e la cura di malattie del sistema metabolico - in particolare del diabete – oltre ad essere tra i principali temi di interesse della ricerca clinica mondiale.

Il metodo attualmente usato per la determinazione dell'insulina è di tipo immunologico; in particolare si utilizza il RIA (*Radio Immuno Assay*), l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e il CLIA (*Chemiluminescence Immuno Assay*). Tra questi, la tecnica più usata è il RIA, un dosaggio di tipo radioimmunologico. Il test impiega un anti-corpo legato a una fase solida a cui si aggiunge l'ormone marcato con radioisotopo. Se è presente, oltre all'ormone marcato, anche quello non marcato contenuto nel campione da analizzare, le due molecole competono con i siti di legame dell'anticorpo e l'ormone non marcato sposta dai siti di legame quello radioattivo. Il grado di legame tra il reagente marcato e il suo recettore dipenderà quindi da quanto ormone non marcato è presente nel campione: un segnale radioattivo più forte indicherà una minor concentrazione dell'insulina endogena. Tale metodologia risulta quindi lunga e complessa e richiede costose e sofisticate apparecchiature. Gli altri metodi, oltre ai limiti sopra evidenziati, non assicurano un'elevata specificità¹.

La disponibilità di un dispositivo di analisi ad elevata sensibilità, semplice da utilizzare, economico e trasportabile, potrebbe rappresentare un valido aiuto in ambito clinico per la definizione di terapie personalizzate ed in ambito diagnostico per lo sviluppo e lo screening di farmaci specifici.

Considerando che i valori di insulina nel sangue sono sempre inferiori a 270 pM^2 , un dispositivo sviluppato per questo scopo deve poter assicurare un limite di rilevabilità dell'ordine di pico-Moli.

In tale contesto i biosensori elettrochimici rappresentano una delle soluzioni tecnologiche più attraenti sia per la molteplicità di applicazioni che offrono, sia per la selettività del sistema di rilevamento biochimico combinata con l'elevata sensibilità della rilevazione elettrochimica. Inoltre, la possibilità di miniaturizzazione e la facilità di integrazione dei biosensori in sistemi di misura, rende tali dispositivi adatti per le applicazioni che richiedono trasportabilità, rapidità nella risposta e ridotti volumi di campione per la misura.

Una notevole attività di ricerca è stata condotta negli ultimi anni nello sviluppo di tecniche analitiche basate su reattivi versatili e selettivi di origine biologica, come enzimi ed anticorpi³.

Il progresso delle nanotecnologie ha offerto ulteriori opportunità di miglioramento per quanto riguarda selettività e sensibilità dei sistemi di rilevazione.

Recentemente un'innovativa classe di componenti sensibili al riconoscimento di molecole biologiche ha attirato l'attenzione della Comunità Scientifica Internazionale, rivelandosi una soluzione molto promettente in alternativa a quelle convenzionali⁴. L'elemento sensibile in questione è l'aptamero, un oligonucleotide artificiale costituito da una sequenza di DNA o RNA a singolo filamento in grado di legarsi alla molecola target con estrema specificità e sensibilità. Gli aptameri presentano il vantaggio che vengono prodotti per sintesi chimica piuttosto facilmente, con costi contenuti, e risultano facilmente modificabili. Sono termicamente più stabili rispetto ai consueti componenti biologici di riconoscimento⁴ e sono riutilizzabili⁵. Possono essere impiegati nella costruzione di biosensori per la rilevazione di proteine. Poiché è possibile apportare modifiche chimiche senza compromettere la loro affinità, specificità e sensibilità verso la proteina target, ben si prestano alla coniugazione con specifiche funzionalità chimiche, al fine di permettere la loro immobilizzazione - diretta sulla superficie dell'elettrodo o mediata da specifici gruppi funzionali - o per amplificare il segnale. In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi che si pone come obiettivo la progettazione e lo sviluppo di un biosensore a funzionamento elettrochimico, che utilizza un aptamero quale elemento sensibile, appositamente selezionato per la rilevazione di insulina nel sangue.

Lo studio si è articolato in due fasi: dapprima sono stati affrontati gli aspetti relativi all'immobilizzazione dell'aptamero sul supporto elettrodico, in seguito è stato realizzato il biosensore. In particolare sono state verificate ed ottimizzate diverse modalità di funzionalizzazione della superficie, utilizzando elettrodi costituiti da uno strato sottile di ossido di indio e stagno (ITO) su supporto di vetro. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato messo a punto un protocollo che è stato impiegato per la realizzazione del sensore. In questa seconda fase sono stati utilizzati degli *Screen-Printed Electrodes* (SPE), celle elettrochimiche commerciali con elettrodo lavorante in oro.

Il sensore è stato costruito seguendo un approccio "*bottom-up*": partendo da un elettrodo, vengono apportate modifiche successive alla superficie elettrodica, al fine di permettere il deposito di una specie che permette il riconoscimento biologico dell'analita di interesse. Nel caso specifico, il primo trattamento che subisce l'elettrodo è un *electro-grafting* che permette di fissare all'elettrodo una molecola mediante attacco elettrochimico. La molecola è selezionata in base ai gruppi funzionali resi disponibili sulla superficie elettrodica. Successivamente viene attaccato chimicamente un *linker*, con la funzione di collegamento tra il livello sottostante e quello sovrastante. A questo punto la superficie modificata dell'elettrodo è adatta all'attacco chimico del grafene ossido, materiale essenziale per la costruzione del sensore. Il grafene ossido infatti funge da piattaforma per l'alloggiamento dell'aptamero, elemento sensibile all'insulina. Al fine di ottimizzare il successivo

adsorbimento dell'oligonucleotide, il grafene ossido viene ridotto per via elettrochimica. L'ultimo livello di costruzione del sensore è costituito dall'attacco dell'aptamero al grafene ossido ridotto. Il biosensore così ottenuto è pronto per il rilevamento dell'insulina.

Il funzionamento del sensore è stato testato utilizzando insulina umana. In particolare sono state condotte prove impiegando una soluzione liquida contenente tale proteina in concentrazioni diverse, nell'ordine di grandezza del pico-molare. Il comportamento dell'elettrodo è stato esaminato anche in presenza di interferenti.

A conclusione del lavoro è stata indagata la possibilità di rigenerare il biosensore sia per via elettrochimica che mediante un processo biochimico.

Tutte le diverse fasi di realizzazione del biosensore sono state indagate e verificate attraverso prove di caratterizzazione utilizzando tecniche elettrochimiche, ottiche o chimiche tra cui: la voltammetria ciclica (CV), la voltammetria ad onda quadra (SWV), la spettroscopia ad impedenza elettrochimica (EIS), la spettroscopia Raman, la microscopia a forza atomica (AFM) e la spettroscopia di massa (ESI-TOF).

Il capitolo 1 descrive in dettaglio i materiali, le tecniche e le tecnologie utilizzate per la costruzione e la caratterizzazione del biosensore elettrochimico. In particolare viene descritto il processo messo a punto per la sintesi di una nuova molecola utilizzata per la funzionalizzazione dell'elettrodo. Vengono inoltre presentate le modalità di preparazione del coniugato sensibile all'insulina, costituito da un oligonucleotide affine alla proteina e da una specie redox attiva, necessaria a rendere rilevabile elettrochimicamente l'aptamero.

Nel capitolo 2 vengono presentati e discussi i risultati ottenuti, con particolare riferimento alle singole fasi di fabbricazione del sensore. Vengono esaminate le prestazioni del sensore con riferimento alla rilevazione di insulina ed esposti i risultati relativi ai test fatti con interferenti. Vengono confrontate due diverse modalità proposte per la rigenerazione del biosensore, considerando le peculiarità di ciascun metodo.

In conclusione vengono evidenziati gli aspetti che, in prospettiva, potranno essere oggetto di indagine per migliorare le prestazioni del biosensore.

Capitolo 1

Materiali e metodi

In questo capitolo vengono esposti i materiali, le tecniche e le tecnologie utilizzate per la costruzione e la caratterizzazione del biosensore elettrochimico sviluppato in questo lavoro di tesi.

Vengono di seguito presentati i vari trattamenti chimici ed elettrochimici necessari per funzionalizzare opportunamente la superficie di un elettrodo d'oro. Il primo step prevede un *grafting* elettrochimico che avviene direttamente sulla superficie dorata. In un secondo step ha luogo la deposizione del grafene ossido per via elettrostatica. La fase successiva permette di ottenere la modifica del grafene ossido attraverso l'elettroreduzione. Infine viene attaccato all'elettrodo così modificato l'aptamero: elemento sensibile all'insulina. Alcuni degli step sono elettrochimici, gli altri sono chimici e vengono qui di seguito enunciati nei particolari.

1.1 Materiali

Di seguito viene riportato l'elenco dei materiali utilizzati in questo lavoro di tesi:

Screen-printed Electrodes (SPE), diametro 1.6mm, elettrodo lavorante in oro, elettrodo di riferimento in argento, controelettrodo in oro, Drop Sense, Spagna;

Indium Tin Oxide (ITO), Sigma-Aldrich, Italia;

Nastro adesivo in Teflon;

isopropanol, Fluka, USA;

alconox, ALCONOX, USA;

sulfuric acid, Carlo Erba, Italy;

p-phenylenediamine (PPD) Sigma –Aldrich;

1,4diaminebutane (2AB) Sigma -Aldrich, Netherlands;

Triethylamine (3EA), Sigma-Aldrich, Germany;

Chloridric acid, Sigma-Aldrich, Germany;

Pyrene-butyrric acid NHS(PyrBA-NHS), Sigma-Aldrich, Germany;

DMSO Sigma-Aldrich, Germany;

Amine benzoic acid (ABA), Sigma-Aldrich, China;

Tetrafluoroborate, Fluka, Switzerland;

Acetonitrile, Sigma-Aldrich, Germany;

Sodium Chloride, Sigma-Aldrich, Germany

Graphene oxide, Graphenea, Spain;
1-Methyl-Pyrrolidinone, Fluka, Switzerland;
Sodium Nitrite, Sigma-Aldrich, USA;
Potassium hexa-cyanoferrate(III) (FeCN), Sigma-Aldrich, USA;
Sodium phosphate Monobasic Sigma-Aldrich, Germany;
Potassium Phosphate dibasic, Sigma-Aldrich, Germany;
Insulin-binding aptamer (IBA), IDT, Belgium;
Antraquinone (AQ), emp BIOTECH, Germany;
PBS dnase free Gibco, UK;
Insulin, Sigma-Aldrich, USA;
PEG-5000, Sigma-Aldrich;
TNBS, Sigma-Aldrich, Germany;
BMP4 R&D systems;
BSA R&D systems;
Controelettrodo in platino (per misure ITO);
Elettrodo di riferimenti in argento (per misure ITO).

1.1.1 Preparazione substrati

Per lo sviluppo del sensore sono stati considerati due diversi substrati: in una prima fase è stato impiegato un elettrodo costituito da ITO (*Indium Tin Oxide*) depositato su una piattaforma di vetro, mentre successivamente è stato utilizzato uno SPE (*screen-printed electrodes*) con elettrodo lavorante in oro (fig. 1.1).

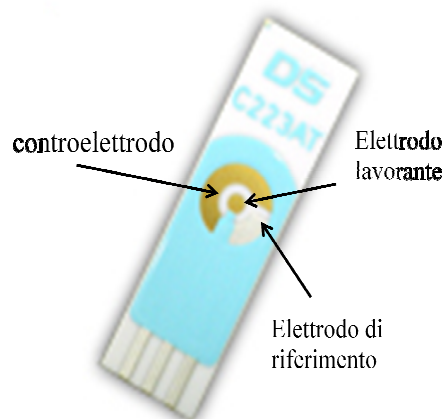


Fig 1.1 Screen-printed electrode in oro

L'elettrodo in ITO è costituito da una base di vetro, di dimensioni pari a 1 cm di larghezza e 2.5 cm di lunghezza, ricoperta da un sottile strato di ITO. L'area effettiva di lavoro è pari ad un cerchio di diametro 8 mm, ricavata isolando la restante superficie conduttiva con un nastro adesivo elettricamente isolante in teflon. Le dimensioni dell'elettrodo in ITO (diametro 8 mm) permettono l'uso di una cella elettrolitica standard per condurre tutti i trattamenti elettrochimici di costruzione e le misure di caratterizzazione e controllo eseguite.

Gli SPE sono unità elettrochimiche, disponibili in commercio. Sono costituiti da una matrice rigida, di 1 cm in larghezza e 3 cm in lunghezza, nella quale trovano collocazione un elettrodo lavorante in oro di diametro 1.6 mm, un elettrodo di riferimento in Ag/AgCl e un contro elettrodo in oro. Al fine di poter realizzare i diversi trattamenti richiesti per la funzionalizzazione della superficie dell'elettrodo lavorante, senza compromettere la funzionalità degli altri elettrodi, è stato necessario costruire una micro cella elettrochimica ad hoc (cfr. paragrafo 1.4.2).

I substrati, prima dell'uso, vengono innanzitutto trattati per rimuovere eventuali sostanze adsorbite in superficie al fine di rendere ottimale l'attacco degli strati successivi.

L'elettrodo in ITO viene posto in sonicatore immerso in Alconox 0.1 M per quindici minuti al 50% di potenza, risciacquato con Alconox, sonicato immerso in isopropanolo per due minuti al 50% di potenza, risciacquato con isopropanolo e acqua, asciugato con un flusso di azoto e infine trattato con UV-Ozono *cleaner* per 20 min.

Lo SPE dorato viene risciacquato con isopropanolo e acqua milli-Q, asciugato con un flusso di azoto e sottoposto a 20 scansioni di voltammetria ciclica (CV) in acido solforico 0.1 M da -0.2 V a 1 V alla velocità di 50 mV/s in micro cella elettrochimica.

1.2 Metodi di sintesi

Il paragrafo è dedicato alla descrizione tecnica dei metodi adoperati per sintetizzare alcune molecole necessarie alla modifica degli elettrodi al fine di ottenere un biosensore elettrochimico sensibile all'insulina.

1.2.1 Preparazione PirBA-PPD

È stata sintetizzata una nuova molecola per attuare un *grafting* elettrochimico (cfr. par. 1.3) sull'elettrodo lavorante.

Per la sintesi sono stati adoperati i seguenti reagenti:

1-Pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester (PirBA-NHS),
p-phenyldiamine (PPD).

I due reagenti vengono uniti in rapporto molare 1:1.5=PPD:PirBA-NHS al solvente organico diclorometano (DCM) anidro in proporzione pari a 1mL/10mg PirBA-NHS. Infine viene aggiunta trietilammina in rapporto equimolare alla PPD.

È stato usato un eccesso di PPD per assicurare l'ottenimento del coniugato evitando di avere PPD libera in soluzione e quindi nel prodotto finale.

La reazione desiderata è la seguente:

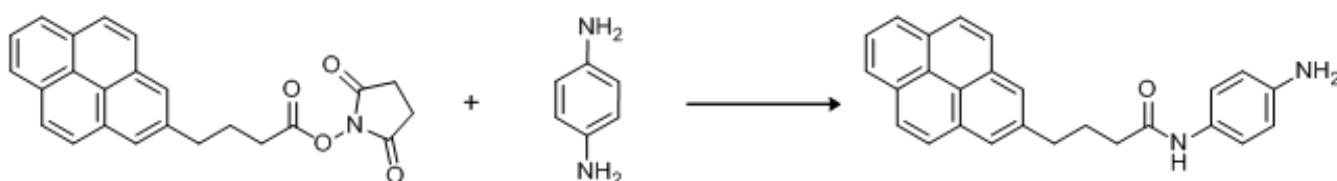


Fig 1.2 Schema di reazione chimica per la sintesi della PirBA-PPD.

I reagenti sono stati lasciati reagire al buio, in mescolamento per 72 h, a temperatura ambiente.

Si osserva che il prodotto precipita sotto forma di granuli irregolari di colore bianco- giallo.

Il prodotto ottenuto è stato quindi purificato rimuovendo il solvente di reazione per evaporazione e poi sciolto in THF e gocciolato in etere dietilico (ED).

Il prodotto di sintesi risulta poco solubile in etere dietilico e precipita sul fondo mentre i due reagenti restano in soluzione.

Per ottenere una migliore separazione dall'ED il prodotto è stato centrifugato più volte a 14000 rpm per 6 min ad ogni ciclo di purificazione.

Il surnatante è stato via via rimosso e il prodotto è stato infine essiccato in liofilizzatore per 12 ore.

Il prodotto è stato caratterizzato attraverso spettroscopia di massa ESI-TOF che ha confermato il peso atomico atteso della molecola di sintesi, pari a 378.47 Da.

In appendice 1 si riporta lo spettro ottenuto dalla spettroscopia di massa ESI-TOF.

1.2.2 Preparazione dell'aptamero disostituito

È stato preparato il coniugato sensibile all'insulina, costituito da un oligonucleotide, l'IBA (*insulin-binding aptamer*) affine alla proteina e da una specie redox attiva, l'antrachinone, ottenendo un composto di sostituito: l'IBA-AQ.

Seguendo le procedure di seguito indicate sono state preparate le due soluzioni madre :

soluzione madre di aptamero IBA:

sciogliere 2.87 mg di aptamero IBA ($=2.9 \cdot 10^{-7}$ moli) in 540 μ L di H₂O DNase free.

Risulta una concentrazione finale pari a $c=5.37 \cdot 10^{-4}$ M (5.3 mg/mL);

soluzione madre di antrachinone:

sciogliere 5mg di antrachinone-NHS ($=1.08 \cdot 10^{-5}$ moli) in 270 μ L di DMSO anidro.

Risulta una concentrazione $c=0.04$ M (18.5 mg/mL).

Preparare il tampone carbonato-bicarbonato di sodio 0.5 M a pH=9 in cui sciogliere l'aptamero per la reazione.

La reazione è stata indotta facendo sciogliere 50 μ L di aptamero in 15 μ L di tampone carbonato bicarbonato di sodio e aggiungendo 13 μ L di antrachinone soluzione madre. Infine sono stati aggiunti 120 μ L di DMSO anidro. Il volume finale risulta quindi di 198 μ L. La soluzione è stata lasciata reagire al buio, in condizioni di agitazione ed a temperatura ambiente per 12 ore.

Il prodotto è stato quindi purificato con una dialisi contro acqua deionizzata in membrana di tipo MWCO = 3500Da per 24 ore.

Infine la soluzione è stata liofilizzata per 12 ore recuperando 190 μ g di aptamero coniugato.

È stata quindi preparata una soluzione di stock dell'aptamero coniugato 100 μ M in PBS DNase free 1X a pH 7.3. Infine la soluzione madre è stata divisa in aliquote da 20 μ L che sono state conservate a -20°C.

Si ottiene la molecola IBA-AQ con la struttura chimica riportata in figura 1.3

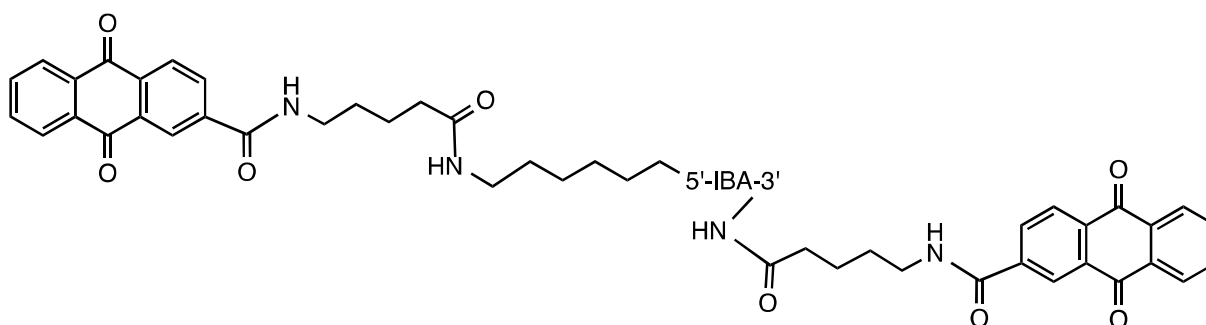


Fig. 1.3 Struttura chimica dell'aptamero IBA di-sostituito con l'antrachinone: IBA-AQ.

1.3 Metodi di modifica superficiale dell'elettrodo

La realizzazione del sensore elettrochimico ha richiesto l'impiego di tecniche chimiche ed elettrochimiche per sviluppare strati di diverso tipo atti a conferire specifiche caratteristiche chimico-fisiche all'elettrodo, con lo scopo di migliorarne le prestazioni di superficie.

1.3.1 Grafting

Il *grafting* è una tecnica elettrochimica che permette di realizzare legami chimici covalenti tra l'elettrodo lavorante e la soluzione elettrolitica di *grafting* applicando un potenziale crescente o decrescente a seconda che il *grafting* sia di tipo ossidativo o riduttivo. Il *grafting* è avvenuto mediante scansioni di voltammetria ciclica (cfr. par.1.5.1) utilizzando un potenziostato (cfr 1.6.1).

Di seguito vengono descritti i vari protocollo seguiti per attuare i vari *grafting*.

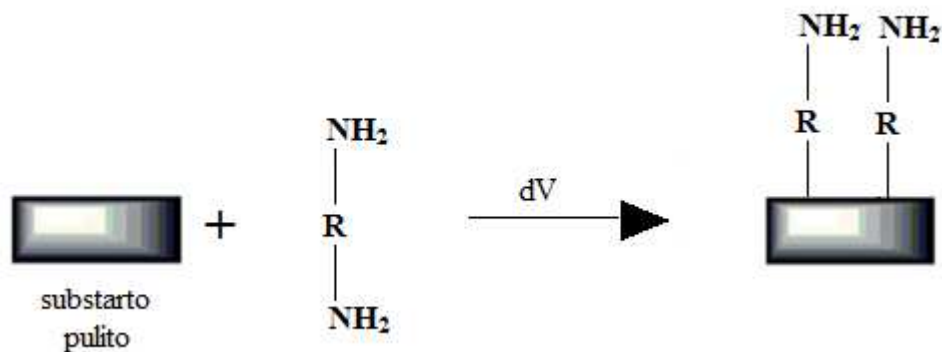


Fig 1.4 Schema generale di reazione chimica per il grafting riduttivo.

Sia gli elettrodi in ITO che quelli in l'oro (nello SPE) sono stati sottoposti al trattamento elettrochimico per ottenere il primo strato di funzionalizzazione dell'elettrodo modificato.

1.3.1.1 Grafting PPD

La soluzione di *grafting* é:

NaNO₂ 5 mM,

PPD 1 mM,

HCl 0.5 M concentrato,

Solvente: H₂O milli-Q.

Lasciare reagire mantenendo in agitazione la soluzione per cinque minuti al buio per assicurare la formazione dei prodotti di reazione¹¹.

Eseguire due scansioni in CV alla velocità di 200 mV/s da 0.5 V a -0.8 V su substrato di ITO pulito.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.1.2 Grafting PANI

La soluzione di *grafting* è:

H₂SO₄ 0.5 M,

PPD 20 mM.

Sciogliere la PPD in acqua sonicando per 2 min quindi aggiungere la soluzione di H₂SO₄ 0.5M. Eseguire venti scansioni in CV alla velocità di 50 mV/s da -0.2 V a 1 V su substrato ITO/SPE pulito.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.1.3 Grafting 2AB

La soluzione di *grafting* è :

2-AB 1 mM

TBATFB 0.1 M

in ACN.

Aggiungere il sale TBATFB al solvente ACN, sciogliere la 2-AB e unirla alla soluzione. Porre la soluzione in cella ed eseguire due scansioni in CV da 0 V a 2 V (il valore di potenziale massimo è 1.7 V nel caso il substrato utilizzato sia SPE dorato) alla velocità di 200 mV/s.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

Sciogliere pirene-NHS 1 mM in pirrolidinone (quando il substrato usato è ITO) o PBS 0.1 M a pH 7.4 (quando il substrato usato è lo SPE dorato) e aggiungere 3EA 14 mM.

Porre una goccia di soluzione sopra l'elettrodo lavorante e lasciare al buio, a 4°C per 12h.

Nel caso di utilizzo di SPE dorato come substrato eseguire tutto il procedimento al buio e in elettrolita deossigenato mediante flussaggio di azoto per 1 min/mL di elettrolita.

1.3.1.4 Grafting p-ABA

La soluzione di *grafting* è:

ABA 50 mM

H₂SO₄ 0.1 M.

Sciogliere l'ABA in soluzione di H₂SO₄ 0.1M, quindi trasferire la soluzione in cella elettrochimica ed eseguire quattro scansioni in CV alla velocità di 40 mV/s da 0 V a 1 V su substrato ITO.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.1.5 Grafting PirBA-NHS

La soluzione di *grafting* è:

PirBA-NHS 1 mM

H₂SO₄ 3.6M.

Sciogliere il PirBA-NHS in H₂SO₄ quindi trasferire in cella elettrochimica la soluzione ed eseguire due scansioni in CV alla velocità di 40 mV/s da 0 V a 1 V su substrato SPE dorato.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.1.6 Grafting PirBA-PPD

La soluzione di *grafting* è:

PirBA-PPD 1mM,

HCl 1M,

NaNO₂ 5mM in H₂O milli-Q.

Lasciare reagire mantenendo in agitazione la soluzione per sette minuti al buio a temperatura ambiente.

Trasferire in cella elettrochimica la soluzione ed eseguire due scansioni in CV alla velocità di 200mV/s da -0.8V a 0.5V su substrato di SPE dorato.

Risciacquare con isopropanolo, H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.2 *Ricoprimento con GO*

Dopo *grafting*, sulla superficie dell'elettrodo viene depositato grafene ossido, secondo la procedura di seguito indicata.

Porre una goccia di soluzione di GO pH 1 sopra l'elettrodo lavorante asciutto e lasciare a 4 °C per 12 ore al buio.

Risciacquare con H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.3.3 Riduzione elettrochimica del GO

La riduzione elettrochimica del GO depositato sull'elettrodo segue la procedura qui riportata: eseguire due scansioni in CV alla velocità di 50 mV/s da 0 V a -1.5V in soluzione di NaCl 0.5 M in acqua milli-Q.

Risciacquare con H₂O milli-Q e asciugare con un flusso di azoto.

1.4 Rilevamento dell'insulina

Vengono di seguito riportati i metodi utilizzati per il deposito dell'elemento sensibile all'insulina sulla superficie modificata dell'elettrodo, la calibrazione del biosensore, la sua rigenerazione elettrochimica e biochimica, i protocolli usati per le prove in presenza di interferenti.

1.4.1 Adsorbimento dell' aptamero sull'elettrodo lavorante

Lo SPE è stato preparato all'attacco dell'aptamero lavandolo con acqua milli-Q e asciugandolo con un flusso di azoto. E' stato inoltre ricoperto l'elettrodo di riferimento con una guaina impermeabile in modo analogo a quanto fatto per la calibrazione del sensore.

L'oligonucleotide IBA coniugato con antrachinone è stato diluito dalla soluzione di stock ad una soluzione 10 µM con PBS 1X, DNase free a pH 7.4 e quindi posto in goccia sopra la superficie dell'elettrodo lavorante e coperto da un copri vetrino per 30 minuti in ambiente umido a temperatura ambiente. Quindi l'elettrodo è stato risciacquato con acqua milli-Q, asciugato con un flusso di azoto e posto in cella elettrochimica microfluidica. Le misure sono state condotte in PBS 0.1M a pH 5.1 .

1.4.2 Metodo di rilevamento dell'insulina

La tecnica d'indagine scelta per rilevare la presenza di aptamero adsorbito sulla superficie elettrodica e quindi di insulina è la *square wave voltammetry* (SWV). La voltammetria ad onda quadra è una tecnica analitica che consiste in una scansione di potenziale crescente alla quale viene sovrapposta una variazione ad onda quadra in modo da ottenere nel tempo un andamento per il potenziale come quello riportato in figura 1.5:

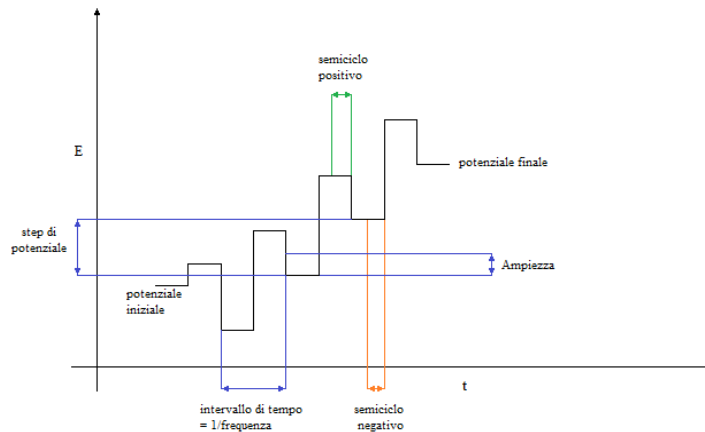


Fig. 1.5 Schema dei parametri usati in una SWV.

Il voltammogramma registrato è la differenza tra il valore di corrente medio del semiciclo positivo e di quello negativo successivo misurati appena prima del cambio di verso.

La velocità di scansione, v , è definita dallo step di potenziale (E_{pot}) e dalla frequenza (w_{SWV}) secondo la legge:

$$v = E_{pot} \cdot w_{SWV} \quad (0)$$

Questa tecnica offre due vantaggi: un'alta velocità di scanning del potenziale che restituisce andamenti del potenziale più risolti e la minimizzazione delle correnti non faradiche.

L'intervallo di tempo di misura è implicitamente determinato dal reciproco della frequenza impostata. La misura risulta quindi più precisa, adatta a rilevare specie redox-attive presenti anche solo in tracce.

L'adsorbimento dell'aptamero viene registrato da un picco centrato a -0.47 V (fig. 1.6), tipico dell'antrachinone al quale l'oligonucleotide è coniugato. Aggiungendo insulina il picco si abbassa perché l'aptamero si desorbe dalla superficie elettrodica.

Nel sangue la concentrazione di insulina è nell'ordine del picomolare, pertanto per il suo rilevamento nel campione è stata scelta la SWV. Questa metodica infatti ha una sensibilità tale da permettere di rilevare concentrazioni estremamente basse.

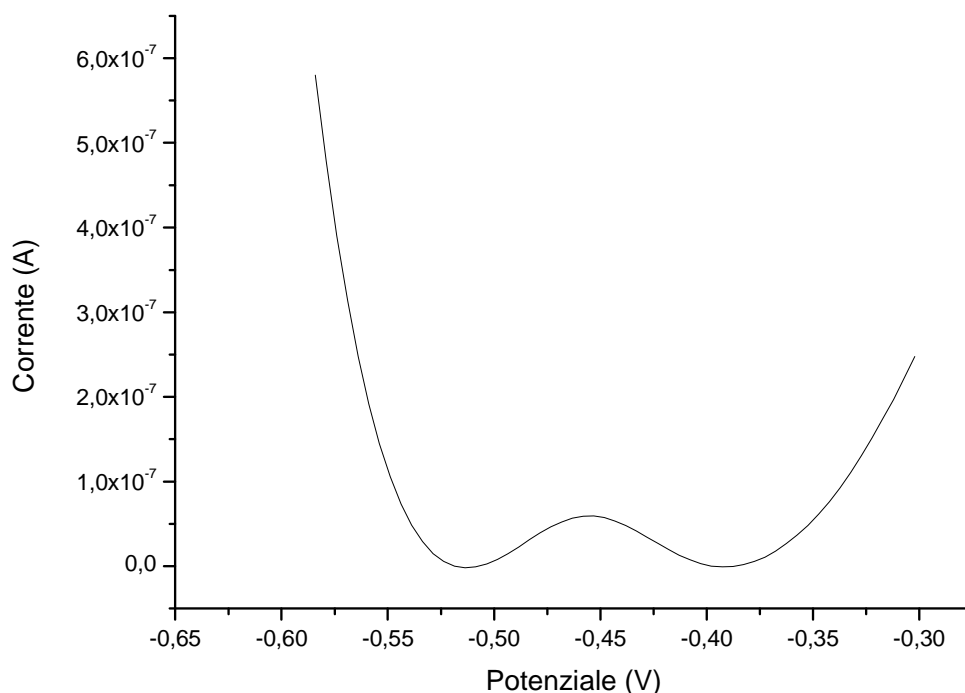


Fig 1.6 Voltammogramma ottenuto da una SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1. A -0.47 V si verifica il picco tipico dell'antrachinone.

1.4.3 Calibrazione del biosensore

Per calibrare il biosensore di insulina sono state preparate aliquote a concentrazioni differenti di insulina umana in soluzione di PBS 0.1 M a pH 7.4. Ad ogni frazione è stato aggiunto lo 0.1% w/v di PEG con la funzione di mantenere in soluzione l'insulina che altrimenti tenderebbe ad aderire alle superfici del contenitore di stoccaggio. Le aliquote sono state realizzate a partire da una soluzione madre di concentrazione 100 μ M di insulina sciolta in PBS DNase free 1X e 0.1% w/v di PEG.

È stato indagato il range di concentrazione di ormone compreso tra 0 e 1 pM.

La calibrazione procede a partire dall'analisi dell'effetto della concentrazione più blanda di insulina sino ad arrivare a quella più concentrata nei confronti dell'aptamero.

Dopo aver asciugato lo SPE e coperto l'elettrodo di riferimento con del silicone è stata depositata una goccia di aliquota sopra la superficie elettrodica e infine è stata coperta con un copri vetrino.

La goccia è stata lasciata per 10 minuti sopra lo SPE per permettere all'insulina di legarsi all'aptamero e passare in soluzione.

In seguito il sensore è stato risciacquato con acqua milli-Q e asciugato con un flusso di azoto. Infine l'elettrodo è stato posizionato in cella microelettrochimica e sottoposto a SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1. La diminuzione del picco tipico dell'aptamero viene registrato dopo l'applicazione di ogni aliquota per costruire la retta di taratura.

Questi passaggi sono stati ripetuti per tutte le aliquote di soluzione di insulina.

1.4.4 Effetto degli interferenti

Il biosensore è stato messo a contatto con molecole simili all'insulina per osservare la competitività del legame possibile tra l'aptamero coniugato e queste specie interferenti così da valutare la specificità del sensore. Sono stati scelti i seguenti interferenti:

- albumina (BSA);
- proteina morfogenetica dell'osso (BMP4).

Il biosensore è stato sottoposto alle prove con gli interferenti applicando una goccia di soluzione contenente 10 ng/mL (pari a circa 1 nM) di interferente per 10 minuti avendo avuto cura di ricoprire l'elettrodo di riferimento dello SPE con del silicone. Successivamente la superficie elettrodica è stata risciacquata con acqua milli-Q e asciugata con azoto. Infine è stata condotta una SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 per verificare la presenza e la quantità di aptamero coniugato misurando l'altezza del picco relativo all'aptamero-antrachinone, analogamente al protocollo utilizzato per la calibrazione dell'insulina.

Gli interferenti scelti sono molecole biologicamente simili all'insulina e/o di peso atomico paragonabile, comunemente presenti nel sangue.

1.4.5 Rigenerazione del sensore

Lo studio del biosensore riguarda anche la possibilità di rigenerazione dello strato di aptamero sensibile all'insulina. Sono state trovate due diverse tecniche di rigenerazione del biosensore: una elettrochimica e una biochimica.

La rigenerazione elettrochimica prevede una SWV ripetuta quattro volte tra i potenziali -0.7 V e -0.2 V alla frequenza di 10Hz in PBS 0.1M a pH 5.1.

La rigenerazione biochimica invece prevede l'applicazione di una soluzione di insulina concentrata in goccia e successivamente la deposizione di aptamero. Anche se l'insulina non stacca tutto l'aptamero, il successivo deposito di aptamero ritorna al livello iniziale, cioè non si creano strati sovrapposti di oligonucleotide. Questa tecnica risulta sicura per la conservazione dell'elettrodo ma richiede un tempo maggiore, di almeno 10 minuti, per permettere all'insulina di attaccarsi all'oligonucleotide.

1.5 Metodi di caratterizzazione dell'elettrodo

Tutte le fasi di modifica dell'elettrodo sono state registrate attraverso prove di caratterizzazione diverse, adeguate al singolo step. Questo paragrafo contempla le varie tecniche di analisi utilizzate descrivendone in breve il funzionamento.

1.5.1 Voltammetria ciclica (CV)

La voltammetria ciclica è una tecnica elettrochimica potenziodinamica che permette di acquisire informazioni qualitative sull'andamento delle reazioni redox e viene espressa mediante un grafico che esprime l'andamento del potenziale contro la corrente, noto come voltammogramma (Fig. 1.7).

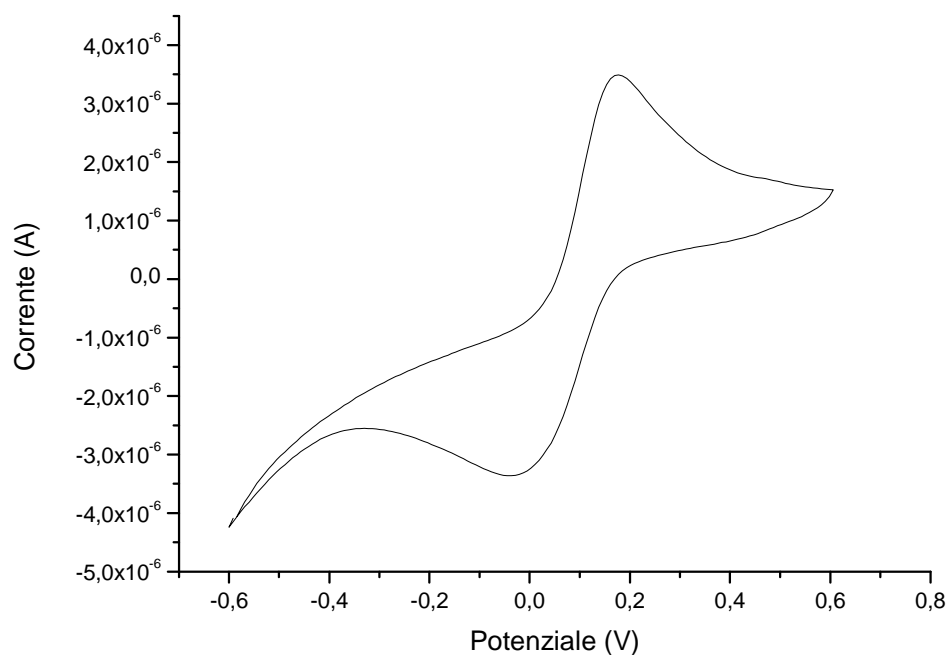


Fig.1.7 Voltammogramma ottenuto da una voltammetria ciclica in FeCN 2 mM in PBS 0.1 M a pH 7.4.

Il grafico ottenuto descrive come viene scambiata la corrente elettrica all'interfaccia della superficie elettrodica facendo variare in modo lineare il potenziale.

La misura solitamente avviene impiegando tre elettrodi:

- elettrodo di lavoro (W);
- Elettrodo di riferimento (R);
- Contro elettrodo (C).

Tutti gli elettrodi sono immersi nella medesima soluzione elettrolitica e collegati ad un potenziostato. Viene applicata una differenza di potenziale crescente (decrescente) tra W e R finché non avviene l'ossidazione (la riduzione) che si registra come un picco positivo (negativo) della specie elettrochimicamente attiva presente in soluzione. Il picco ottenuto rappresenta la corrente anodica (catodica) e il suo massimo valore assoluto rappresenta il potenziale al quale tutte le specie elettroattive sono ossidate (ridotte) alla superficie dell'elettrodo. Quando il potenziale raggiunge il valore di limite massimo (minimo) cambia andamento fino a raggiungere il valore limite opposto: si è dunque compiuto un ciclo di scansione voltammetrica.

La reazione redox genera un gradiente di concentrazione all'interfaccia elettrodo-elettrolita noto come strato di diffusione. La legge di Cottrell lega l'area attiva con la corrente elettrica totale scambiata e lo strato diffusivo:

$$i = nFAD_0 \frac{c_{0,b}}{\sqrt{\pi D_0 t}} \quad (1)$$

L'equazione risulta valida per un elettrodo planare, dove n è il numero degli elettroni scambiati nella reazione redox, F è la costante di Faraday, A è l'area elettrochimica, D_0 è il coefficiente di diffusione della specie redox attiva, $c_{0,b}$ è la concentrazione di elettrolita nel bulk, t il tempo di reazione.

L'altezza del picco redox ottenuto dalla voltammetria ciclica (di cui viene proposto un esempio in figura 1.7) è correlato all'area elettrochimica mediante la relazione di Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot c \quad (2)$$

dove:

n è il numero di elettroni scambiati;

A è l'area elettrochimica;

D è il coefficiente di diffusività ottenuto con i dati relativi all'elettrodo pulito (che ha area elettrochimica nota: l'area geometrica pari a 0.02 cm^2);

ν è la velocità di scansione della voltammetria ciclica;

c è la concentrazione di elettrolita in soluzione.

1.5.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)

La spettroscopia di impedenza elettrochimica è una tecnica elettrochimica che permette di analizzare il comportamento elettrochimico dell'interfaccia esistente tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrolita. Vengono identificati i vari fenomeni elettrochimici presenti nel sistema mediante l'osservazione dell'impedenza, cioè la resistenza che pone un sistema complesso non ohmico al flusso di corrente elettrica. La EIS fornisce una misura indiretta dei processi elettrochimici: a tal fine è necessario costruire un *circuito elettrico equivalente* assimilabile alla risposta elettrica del sistema in esame. In questo caso il circuito equivalente che descrive l'interfaccia elettrodo-elettrolita durante un processo elettrochimico è composto da un resistore che rende conto della resistenza della soluzione. A valle di questo c'è un capacitore associato al doppio strato elettronico, in parallelo con un resistore (R_{ct}) che tiene conto della resistenza al trasferimento elettronico. Si deve infine inserire un elemento di Warburg in serie alla resistenza che rappresenta i fenomeni diffusivi da e verso l'elettrodo. In figura 1.8 viene riportato un esempio di circuito elettrico equivalente.

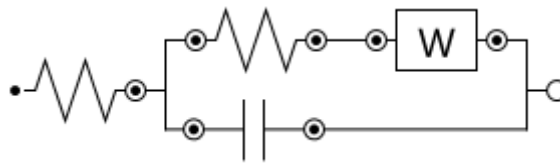


Fig. 1.8 Circuito elettrico equivalente costruito per il sistema elettrodo- elettrolita.

I valori delle varie resistenze vengono calcolati con il fitting dei dati sperimentali. Un'applicazione utile di questi dati si riscontra nel calcolo della velocità di trasferimento di carica apparente:

$$k_{app} = \frac{RT}{n^2 F^2 A R_{ct} c} \quad (3)$$

dove:

n è il numero di elettroni trasferiti, F è la costante di Faraday, R è la costante ideale dei gas, T è la temperatura assoluta, A è l'area elettrochimica sperimentalmente determinata, R_{ct} è il valore ottenuto dal fitting del grafico di Nyquist e c è la concentrazione dell'elettrolita.

Questo circuito sviluppa un'impedenza composta per definizione da una parte reale e da una immaginaria che vengono rappresentate nel diagramma di Nyquist.

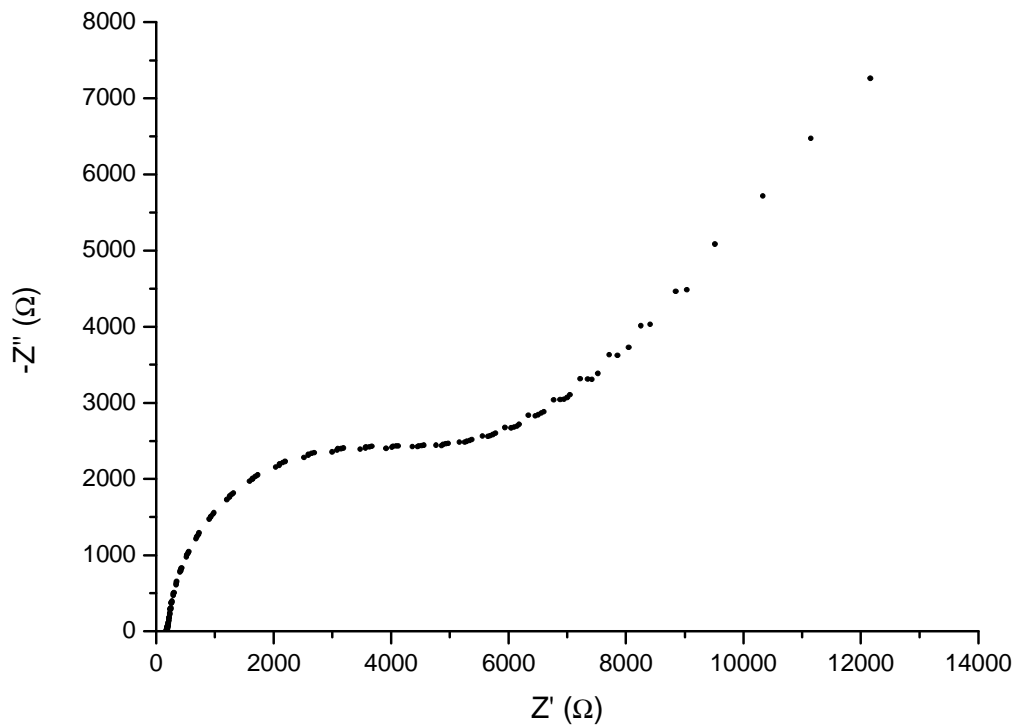


Fig. 1.9 Grafico ottenuto da una misura EIS.

In ascissa si trova la parte reale dell'impedenza, in ordinata la parte immaginaria. Un andamento caratteristico prevede la presenza di una semicirconferenza o parte di essa ad alte frequenze e un andamento lineare a basse frequenze. Il diametro del cerchio risultante rappresenta la resistenza al trasferimento di carica.

1.5.3 Spettroscopia Raman amplificata d superfici (SERS)

La spettroscopia Raman sfrutta l'effetto Raman che si basa sull'eccitazione degli elettroni per mezzo di una luce monocromatica laser di intensità e frequenza note.

La radiazione viene poi riemessa appena il legame torna allo stato standard. Le righe Raman possono essere intensificate se il campione viene adsorbito o depositato elettrochimicamente su una superficie metallica tipo oro, argento⁹. Si ottiene uno spettro come in figura 1.10: in ascissa c'è la differenza di frequenza della radiazione incidente e quella diffusa, mentre in ordinata l'intensità di emissione normalizzata al picco più intenso.

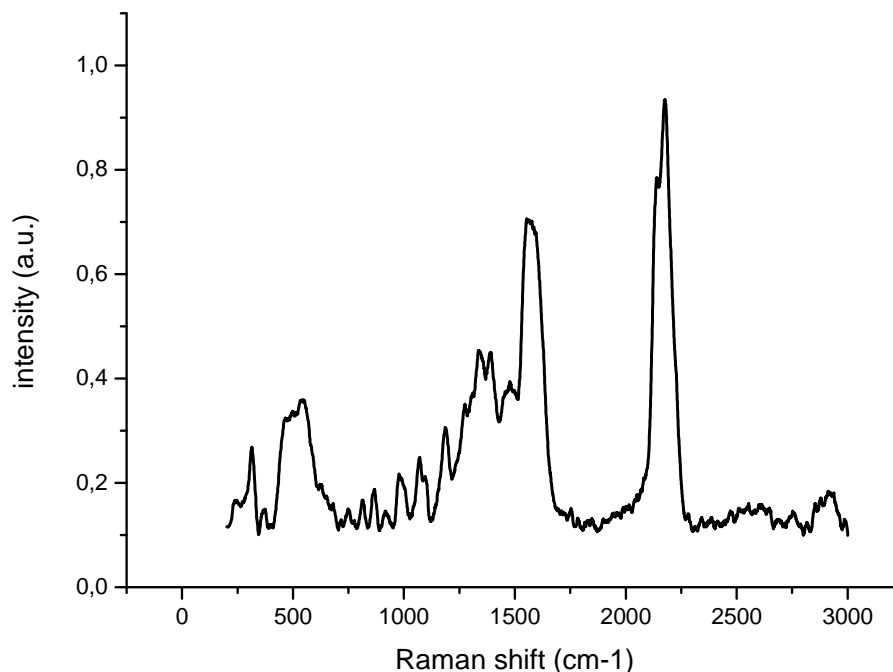


Fig. 1.10 Esempio di spettro Raman.

1.5.4 Cromatografia su strato sottile (TLC)

La cromatografia su strato sottile è sfruttata per l'identificazione qualitativa dei composti sciolti in una soluzione. Questa tecnica si serve di una fase stazionaria, di solito costituita da particelle impaccate di silice, autosupportanti o stese in una superficie di vetro, plastica o metallo. Il campione in esame viene applicato in goccia ad 1 cm dal margine della lastra e questa viene poi immersa nell'eluente, detto fase mobile. I composti in soluzione da analizzare vengono trascinati dalla fase mobile attraverso la fase stazionaria per azione capillare con velocità diversa a seconda dell'affinità di ciascun componente con la fase stazionaria. Dopo che sono stati percorsi i due terzi della lunghezza totale la lastra viene estratta e asciugata. Si possono quindi determinare gli "spot" appartenenti ai vari componenti sfruttando le loro proprietà ottiche. Ogni sostanza ha un caratteristico fattore di rallentamento definito come:

$$R_F = \frac{d_r}{d_m} \quad (4)$$

Dove d_r e d_m sono rispettivamente le distanze lineari misurate dal punto di arrivo del composto in analisi e della fase mobile¹⁰.



(a)



(b)

Fig. 1.11 (a) camera di misura. (b) lastrina in silice usata per una misura di TLC.

1.5.5 Spettroscopia di massa ESI-TOF

La spettroscopia di massa a tempo di volo è una tecnica che misura il tempo occorrente agli ioni di un campione per attraversare una distanza nota. Il campione in esame viene bombardato con elettroni o fotoni o ioni per produrre ioni delle molecole che costituiscono il campione. Questi ioni vengono accelerati attraverso un campo elettrico e inviati ad un tubo di deriva. Tutti gli ioni hanno la stessa energia cinetica e la loro velocità è inversamente proporzionale alla massa: le particelle più leggere giungono prima al detector posto ad una distanza nota.

Nota questa relazione e il tempo di volo è possibile calcolare il rapporto massa/carica di ciascuno ione. I tempi di volo sono dell'ordine dei microsecondi per un tubo di volo lungo un metro quindi la presentazione dello spettro di massa sullo schermo di un oscilloscopio è quindi istantanea¹⁰.

1.6 Strumentazione

Verranno di seguito brevemente illustrati gli strumenti utilizzati per ottenere le misure necessarie alla realizzazione e caratterizzazione del biosensore.

1.6.1 Potenziostato

Tutte le misure elettrochimiche di questo lavoro di tesi sono state ottenute con un potenziostato-galvanostato (Autolab PGSTAT 128N Ecochemic, NL) gestito da un apposito software (Nova 1.10) che permette la memorizzazione, la visualizzazione e la gestione dei dati.



Fig. 1.12 *Potenziostato Autolab PGSTAT 128N.*

Il potenziostato controlla la differenza di potenziale instaurata tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo e può applicare una differenza di potenziale tra l'elettrodo lavorante e il riferimento seguendo le istruzioni imposte. Per effettuare le misure in cella elettrochimica sono stati collegati i terminali del potenziostato agli elettrodi immersi in cella. Per le misure eseguite sullo SPE dorato la micro cella elettrochimica è collegata al potenziostato attraverso un cavo usb. Lo strumento misura la corrente che si genera all'interno del circuito costituito dall'elettrodo di lavoro e il riferimento.

1.6.2 Cella elettrochimica microfluidica

Il sistema che ospita gli elettrodi di lavoro, di riferimento e il contro elettrodo e la soluzione elettrolitica prende il nome di cella elettrochimica. Durante questo lavoro di tesi sono state utilizzate due diverse configurazioni di cella elettrolitica, una cella di volume sufficiente da contenere 10 mL di soluzione, adatta a lavorare con l'elettrodo in ITO ed una seconda adeguata ad ospitare lo SPE. Quest'ultima cella ha una configurazione particolare, studiata ad

hoc per permettere un facile alloggiamento dello SPE e garantire un adeguato ambiente di lavoro.

In figura si può vedere la struttura della cella:

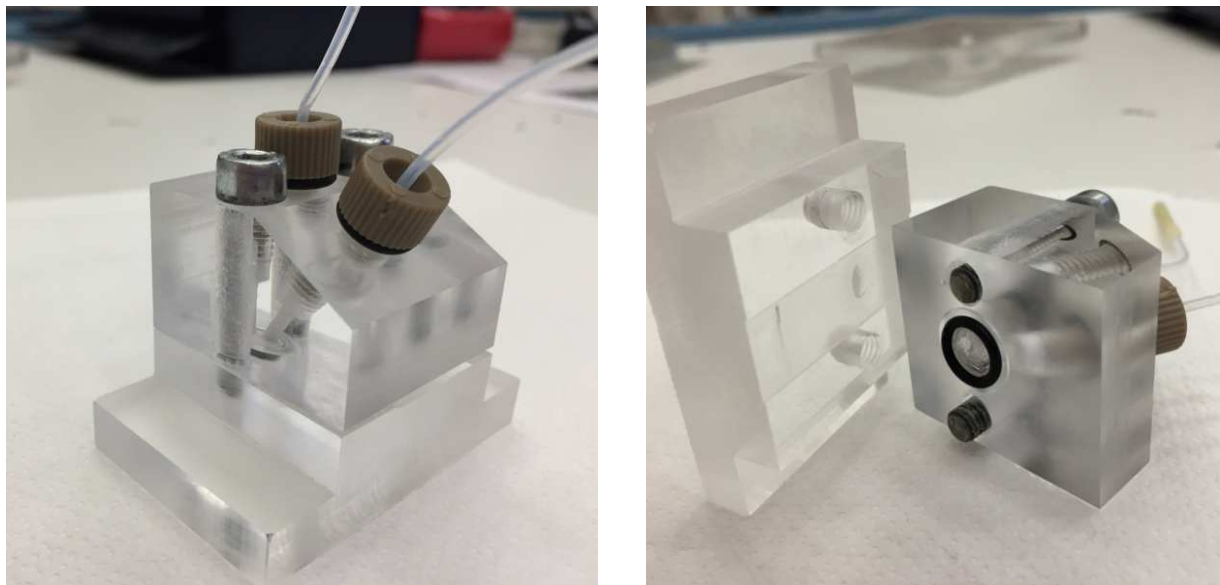


Fig. 1.13 *Cella elettrochimica microfluidica per lavorare con gli elettrodi SPE.*

La cella è composta da due parti: una base inferiore sulla quale viene adagiato lo SPE e una parte superiore nella quale sono state alloggiare delle cavità per consentire l'inserimento di soluzione elettrolitica attraverso due tubi in teflon. Un o-ring assicura la tenuta della camera di misura sopra gli elettrodi. Le due parti della cella vengono unite attraverso l'avvitamento di viti. Lo SPE viene inserito per tre quarti in cella e vengono lasciati fuoriuscire i contatti elettrici.



Fig. 1.14 *Cavo di connessione dello SPE ai contatti del potenziostato*

Quando la cella è chiusa può essere iniettata la soluzione elettrolitica evitando così di bagnare il contatto elettrico esterno. Per riempire la cella sono sufficienti 30-50 μL di elettrolita.

Per permettere il contatto elettrico tra PSE e il potenziostato viene usato un apposito cavo di connessione a quattro uscite: una per ogni elettrodo (lavorante, riferimento e contro elettrodo) e la messa a terra (fig 1.14).

Capitolo 2

Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti durante il lavoro di tesi secondo l'ordine seguito per la modifica della superficie elettrodica necessaria ad ottenere il biosensore elettrochimico. La messa a punto del biosensore si divide in due stadi:

- Uno studio preparatorio sui processi di funzionalizzazione della superficie elettrodica condotto utilizzando l'elettrodo di ITO,
- Realizzazione del biosensore su SPE, impiegando i protocolli ottimizzati nella fase precedente.

Sono stati apportati diversi tipi di modifiche in situ alla superficie di un elettrodo in ITO (*Indium Tin Oxide*) al fine di migliorare le proprietà necessarie all'attacco chimico del grafene ossido, materiale essenziale per la realizzazione del biosensore in quanto costituisce la piattaforma di alloggiamento dell'aptamero, elemento sensibile all'insulina. Tecnicamente la superficie elettrodica dell'ITO è stata sottoposta a trattamenti elettrochimici (*electrochemical grafting*) diversi per modificare le caratteristiche dell'elettrodo allo scopo di ottimizzarne la risposta. Attraverso il confronto tra i dati ottenuti dall'indagine sperimentale è stato quindi possibile individuare il trattamento più adatto che, nella fase di fabbricazione del biosensore, è stato applicato all'elettrodo lavorante in oro dello SPE (*screen-printed electrode*).

Il percorso svolto è sinteticamente illustrato dal seguente schema:

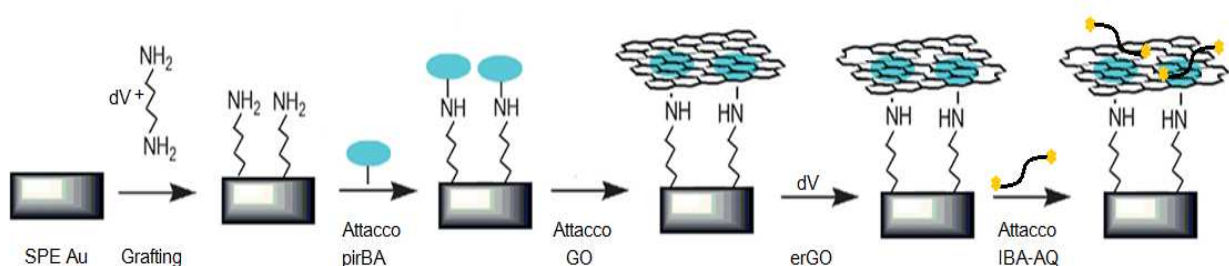


Fig 2.1 Schema del processo di modifica della superficie elettrodica.

L'elettrodo viene innanzitutto pulito e quindi sottoposto ad un *grafting* elettrochimico. Sono stati testati diversi tipi di *grafting* per analizzarne le performance e poter scegliere i più adatti e funzionali. Successivamente avviene la fase di attacco chimico del GO e la sua riduzione elettrochimica. Infine viene chimicamente attaccato l'aptamero, elemento sensibile all'insulina.

Di seguito vengono presentati i risultati raccolti durante il lavoro in scala macro sull'elettrodo di ITO e dunque in scala micro sullo SPE dorato.

L'osservazione dei fenomeni chimici ed elettrochimici è avvenuta analizzando il comportamento dell'elettrodo modificato, selezionando di volta in volta le tecniche di indagine.

2.1 Grafting su ITO

Il *grafting* permette la funzionalizzazione dell'area elettrodica attraverso l'attacco di una specie sulla superficie. Durante il processo avviene la formazione di un legame covalente tra la superficie dell'elettrodo lavorante (ITO) e la molecola di innesto, con la produzione di uno strato mono molecolare o di un multistrato che ricopre l'elettrodo. Questo step è caratterizzato da due variabili: la differenza di potenziale chimico di lavoro e le molecole adoperate per l'attacco. In tal modo, pur impiegando la stessa molecola di partenza si possono ottenere diverse strutture di ricoprimento dell'elettrodo applicando potenziali diversi, come di seguito evidenziato dai dati ottenuti in questo studio. Le molecole solitamente usate sono ammine aromatiche quali la PPD e l'ABA o alifatiche come la 2-AB. Nel presente lavoro sono state usate ammine diverse per valutare quale superficie modificata con *electrochemical grafting* sarebbe stata migliore per l'attacco successivo di GO e quindi per alloggiare l'aptamero.

2.1.1 Grafting riduttivo della PPD

L'elettrodo pulito viene sottoposto a *grafting* riduttivo elettrochimico per effettuare l'attacco della PPD allo scopo di rendere la superficie attiva chimicamente per le successive modifiche. Per attuare questo *grafting* è necessario prima attivare la reazione della produzione del sale di diazonio relativo alla PPD. La PPD viene sciolta in soluzione acida, viene ossidata dall'acido cloridrico e si forma lo ione diazonio (Fig 2.2 a)). Si ottiene così la soluzione di *grafting*, che viene posta in cella e applicando un potenziale in riduzione avviene la riduzione elettrochimica della PPD che comporta la perdita del gruppo diazonio (figura 2.2b))¹¹. Si forma un radicale instabile che si attacca alla superficie dell'ITO formando un legame covalente (fig. 2.2c)).

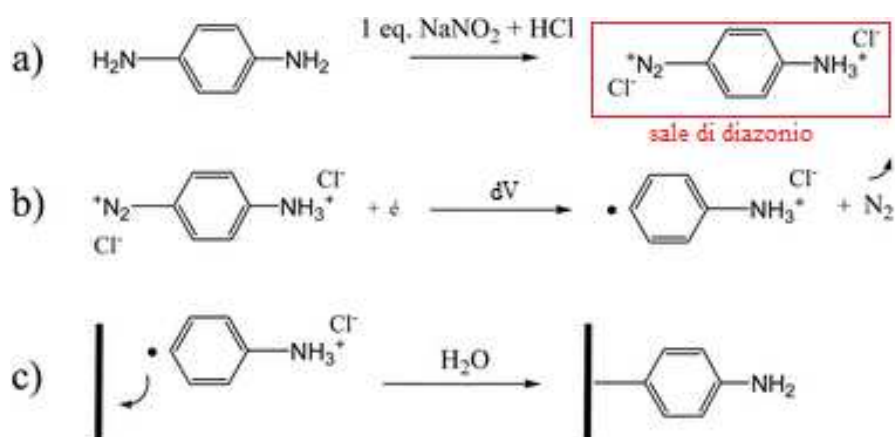


Fig. 2.2 a) Meccanismo di formazione del sale di diazonio.
b) e c) Schema di reazione di electrochemical grafting della PPD.

Come si può vedere dallo schema, la reazione di ossidazione della PPD procede per via radicalica: l'ammina riceve un protone dall'acido cloridrico e si forma uno ione carico positivamente.

Il *grafting* elettrochimico è stato realizzato mediante voltammetria ciclica ripetuta per due volte di cui si riporta in figura 2.3 un esempio.

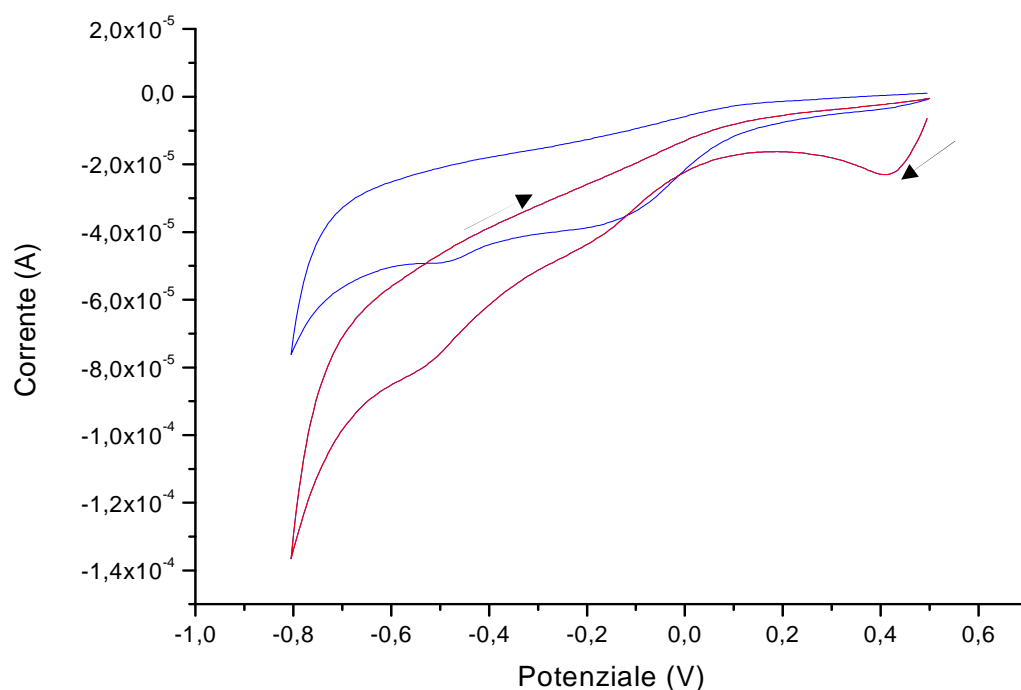


Fig. 2.3 Voltammogramma relativo al grafting riduttivo della PPD. In rosso viene evidenziata la prima scansione di potenziale.

La prima scansione di voltammetria di *grafting* in figura, evidenziata in rosso, inizia a 0.5 V e procede verso potenziali più negativi arrestandosi a -0.8 V, come indicato dalle frecce, allo scopo di effettuare il secondo step del processo di reazione (fig. 2.2). La risposta voltammetrica presenta un picco a 0.3 V che indica la riduzione del gruppo diazonio permettendo l'attacco della PPD alla superficie di ITO¹¹. Si noti che il picco non si ripresenta nella curva relativa alla seconda scansione e questo indica che non avviene ulteriore attacco di PPD alla superficie. Ciò che verosimilmente si ottiene è un mono-strato di PPD.

Il fenomeno è stato inoltre studiato caratterizzando elettrochimicamente la superficie elettrodica con voltammetrie cicliche eseguite prima e dopo il *grafting*, in PBS 0.1 M a pH 7.4 per analizzare l'eventuale effetto barriera al trasferimento di carica dovuto alla presenza dello strato di ammine superficiali usando un tracciante redox carico negativamente, il FeCN, alla concentrazione di 1 mM (figura 2.4). Per eseguire l'ossido-riduzione del FeCN risulta necessario operare in un range di potenziale molto ampio, compreso tra -0.4 V e 0.8. Questo dato prova che l'elettrodo non permette una facile scarica del tracciante ovvero dimostra che la reversibilità dell'ossido-riduzione è limitata. In accordo con la Legge di Nernst la distanza dei potenziali di picco in condizioni standard è:

$$\Delta E_p = \frac{0.059}{n} V \quad (5)$$

con n numero di elettroni scambiati durante la reazione redox. Nel caso della scarica del FeCN viene scambiato un solo elettrone, quindi il ΔE teorico è 0.059 V mentre il valore reale è nettamente maggiore. Si noti che i picchi in ossidazione e in riduzione del FeCN sono chiaramente visibili prima del *grafting* (curva blu) mentre non sono più presenti nel voltammogramma dopo l'attacco della PPD (curva rossa).

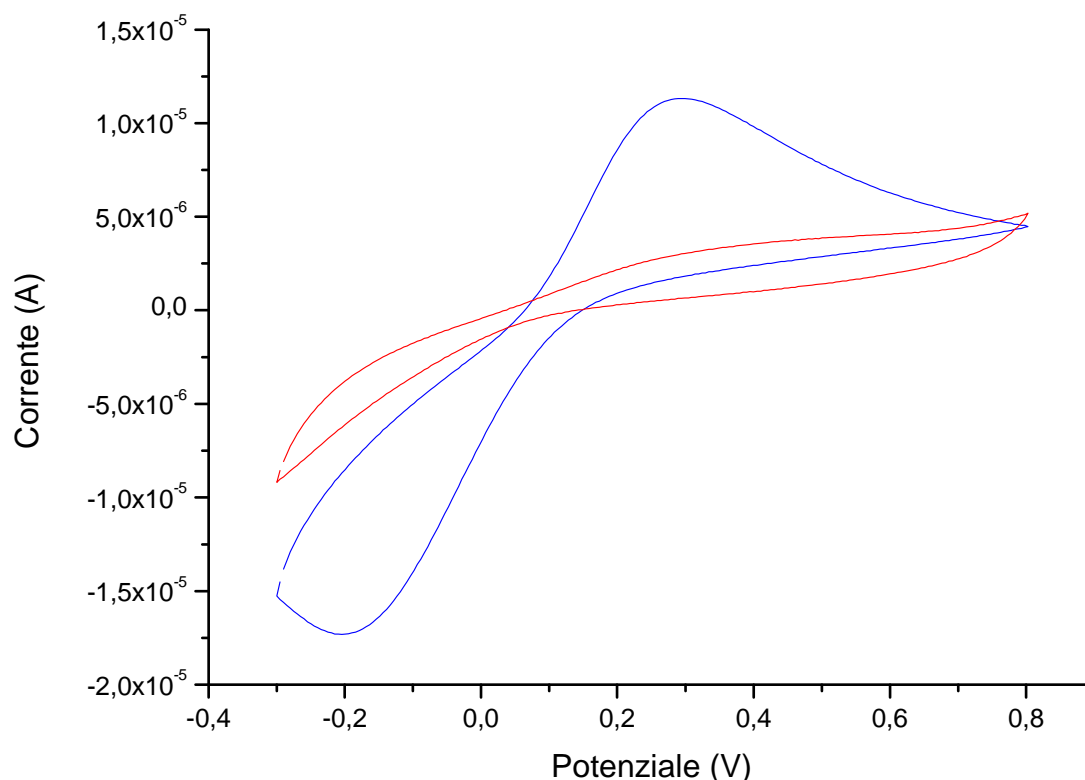


Fig. 2.4 Voltammogramma di caratterizzazione ottenuto da CV svolta in PBS 0.1M a pH 7.4 in tracciante FeCN 1 mM della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con PPD (curva rossa).

Tale fenomeno indica che il *grafting* modifica l'elettrodo in modo da non permettere la scarica del tracciante redox, rendendo quindi isolante elettricamente la superficie. Al pH di lavoro l'ammina all'interfaccia elettrodo-elettrolita è protonata in quanto la pKa della PPD è pari a 4¹². Questo comportamento risulta coerente con le caratteristiche elettriche della PPD: la molecola costituisce uno strato isolante che impedisce la scarica del tracciante all'elettrodo con conseguente assenza di picchi¹¹.

Si vedrà in seguito che il pH gioca un ruolo essenziale nella risposta elettrochimica di questo elettrodo.

2.1.2 Grafting ossidativo della PPD: il PANI (polianilina)

Il *grafting* della PPD può avvenire anche per via ossidativa e si ottiene una struttura con caratteristiche chimiche e fisiche molto diverse da quelle tipiche del *grafting* riduttivo precedentemente citato. La differenza sostanziale sta nell'attacco chimico: nel caso ossidativo infatti l'ammina viene direttamente ossidata applicando un potenziale crescente (curva rossa in fig. 2.5) e si crea il legame tra l'azoto di uno dei due gruppi amminici e l'ITO¹³ (fig. 2.6).

Nei cicli successivi (curve blu in fig.2.5), il processo di grafting provoca la formazione di più strati di PPD. Il prodotto che si forma sulla superficie è quindi la polianilina^{13,14}.

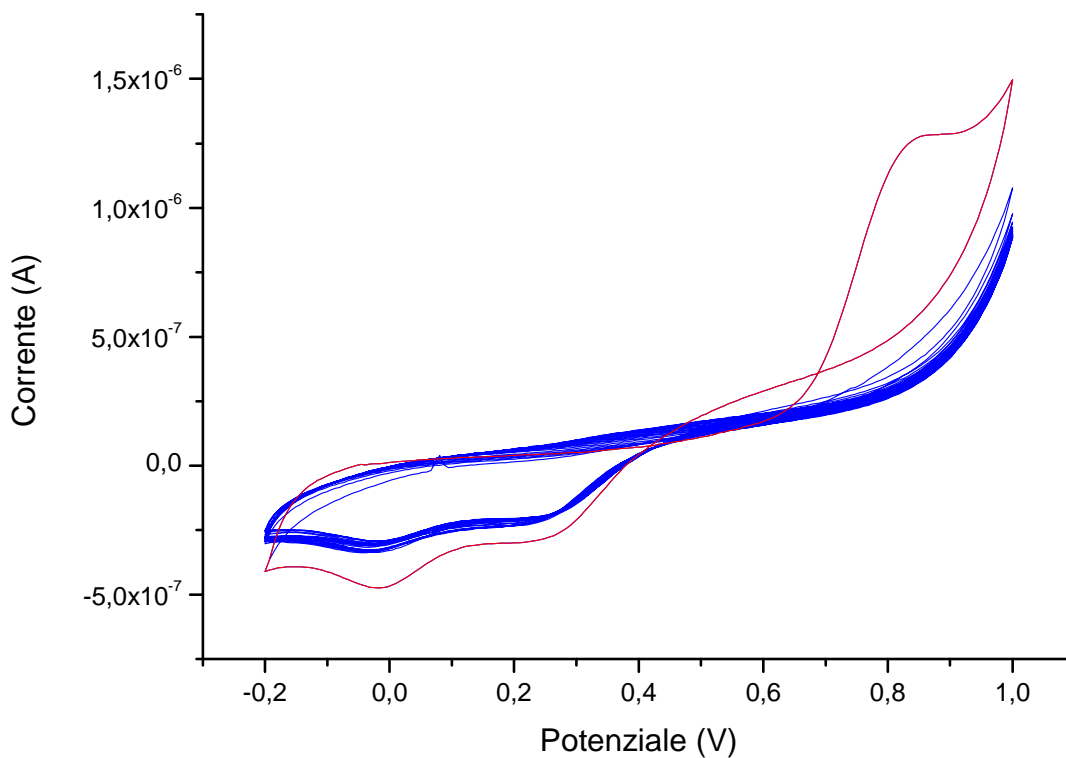


Fig 2.5 Voltammogramma di grafting PANI. La prima scansione di potenziale è evidenziata in rosso.

La formazione di più strati di anilina posti uno sopra l'altro trova giustificazione dal fatto che i cicli non sono sovrapposti ma gradualmente il potenziale di picco si sposta perché la superficie viene modificata ad ogni ciclo rispetto al ciclo precedente. Questo risultato è in accordo con la letteratura¹³.

La reazione complessiva viene descritta nello schema¹¹ di figura 2.6 :

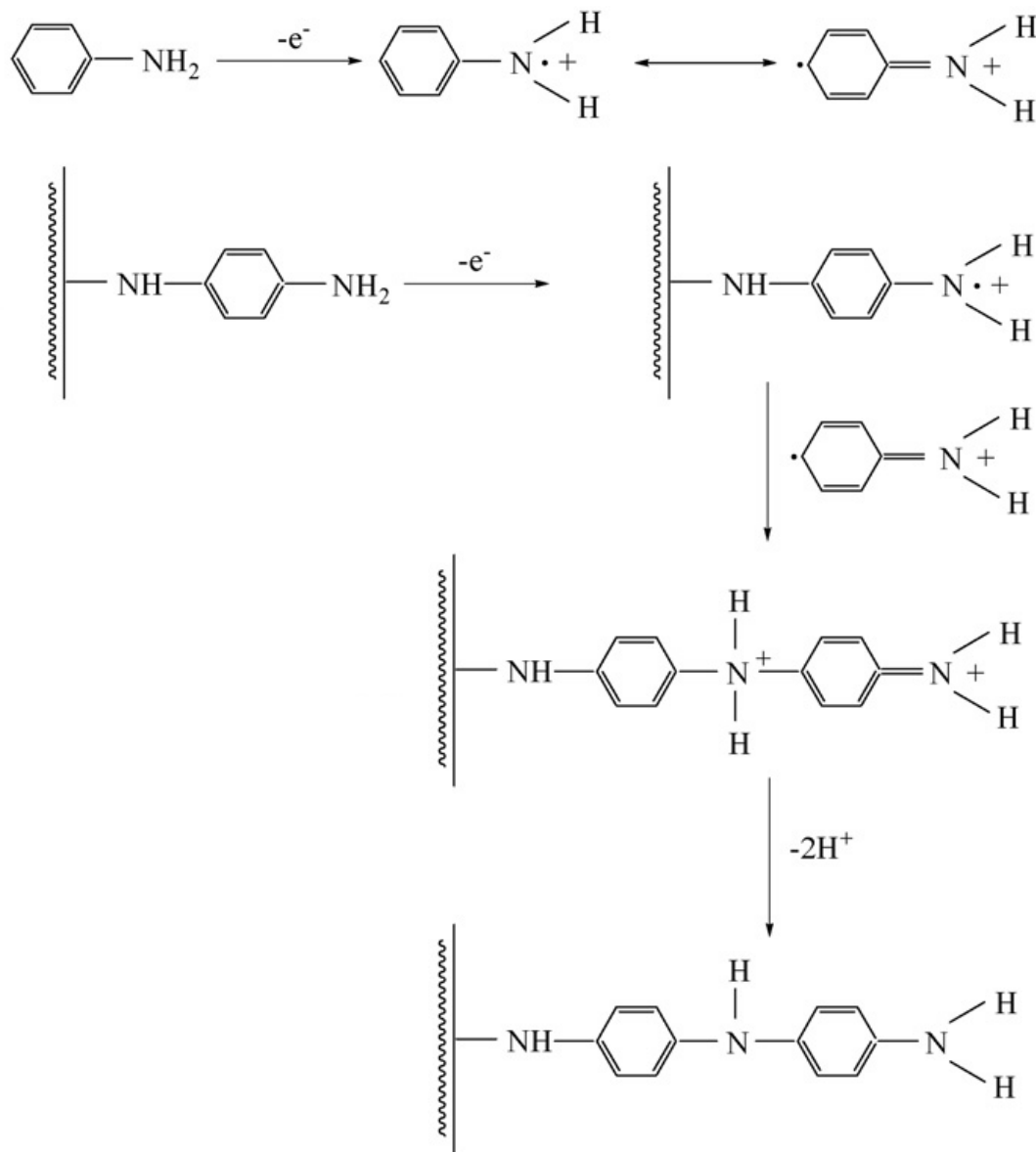


Fig. 2.6 Schema di reazione della PPD durante il grafting ossidativo per la formazione del PANI¹².

Dopo diverse scansioni di potenziale si ottiene una struttura polimerica di questo tipo:

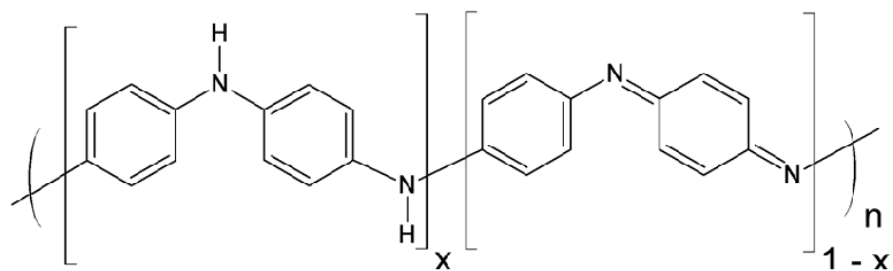


Fig. 2.7 Struttura chimica generica della polianilina ottenuta per via elettrochimica¹¹.

La presenza di picchi ossido-riduttivi diversi è legata ai diversi legami presenti nella struttura della polianilina: i picchi in ossidazione a 0.4 V e a 0.8 V identificano rispettivamente l'ossidazione di uno e due atomi di idrogeno dell'ammina. Il gruppo amminico perde uno dei due atomi di idrogeno se sottoposto ad un potenziale di circa 0.4 V, aumentando il potenziale si ottiene una seconda ossidazione a 0.8 V con la conseguente perdita del secondo idrogeno legato all'azoto, analogamente accade in riduzione¹¹. La modifica avvenuta sulla superficie è stata verificata mediante una prova di caratterizzazione di CV in PBS (fig 2.8).

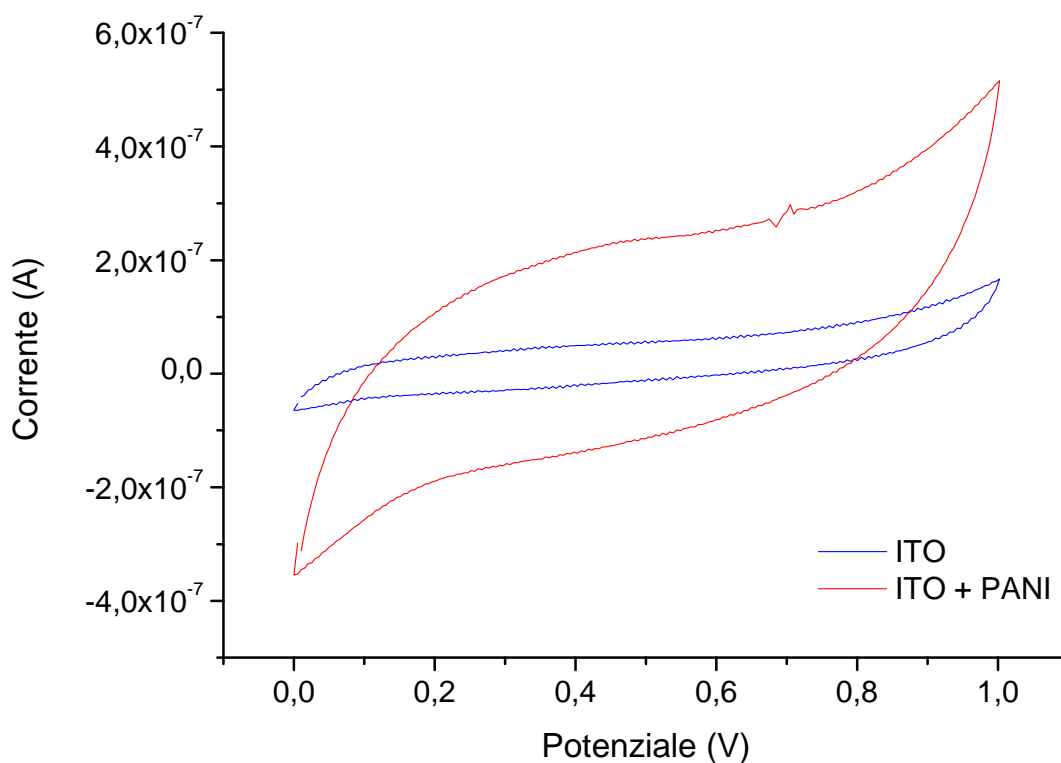


Fig. 2.8 Voltammogramma di caratterizzazione della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con grafting PANI (curva rossa) ottenuto da CV svolta in PBS 0.1 a pH 7.4.

Si nota che, dopo il *grafting*, la voltammetria registra correnti considerevolmente più alte. Vista la conformazione del PANI tale aumento è presumibilmente legato all'accrescimento di area elettrochimica¹³, secondo la legge di Randles-Sevcik (2).

In figura 2.9 è riportato il voltammogramma di caratterizzazione di questo step ottenuto dalla CV in PBS e FeCN: dalle voltammetrie cicliche eseguite prima (curva blu) e dopo (curva rossa) il *grafting* PANI si nota che i picchi redox sono più accentuati dopo l'attacco della polianilina. Questo indica che lo strato depositato non fa diminuire la conduttività dell'elettrodo come invece avviene per il *grafting* PPD (cfr. 2.1.1). La presenza di gruppi amminici coniugati e/o di doppietti liberi sull'atomo di azoto in catena polimerica permettono il trasferimento elettronico dall'interfaccia alla superficie dell'ITO⁸. È noto infatti che la polianilina sia un polimero elettricamente conduttivo¹³.

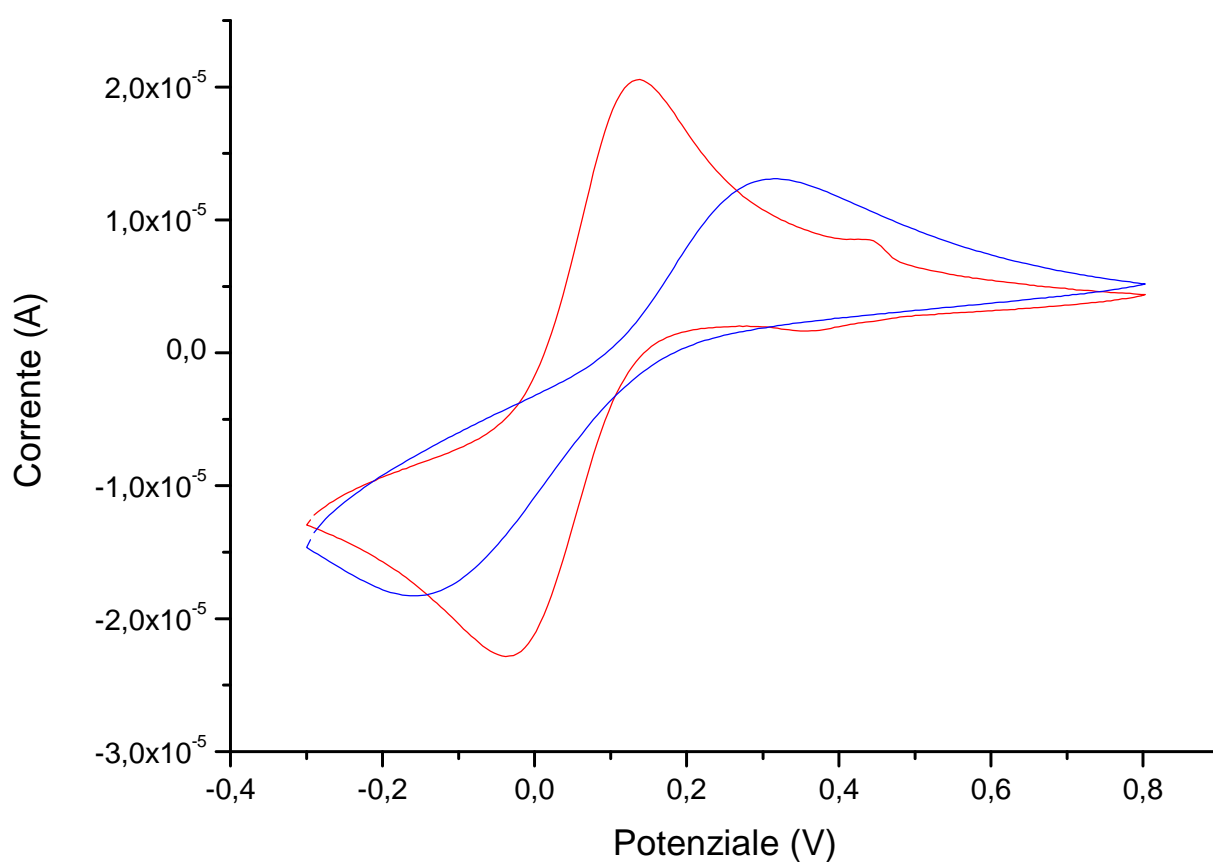


Fig.2.9 Voltammogramma di caratterizzazione della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con *grafting* PANI (curva rossa) ottenuto da CV svolta in PBS 0.1M a pH 7.4 e tracciante FeCN 1 mM.

2.1.3 Grafting 2AB

Un altro tipo di *grafting* prevede l'attacco elettrochimico dell'1,4-diamminobutano (2AB) alla superficie dell'elettrodo di ITO. Questo tipo di *grafting*, come il precedente, è di tipo ossidativo. Di seguito è riportato lo schema di attacco dell'ammina alla superficie di ITO (fig. 2.10)

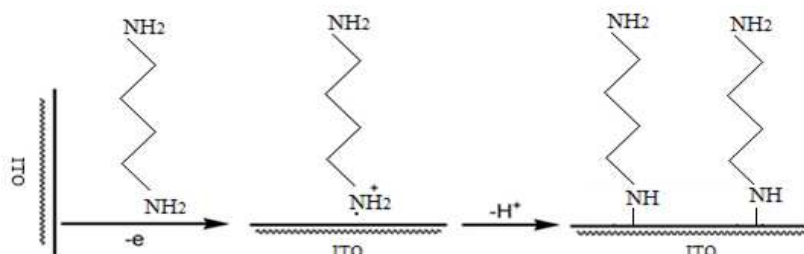


Fig. 2.10 Schema di reazione di *grafting* 2AB.

Una dei due gruppi amminici del 2AB viene deprotonato a causa dell'aumento di potenziale e si attacca alla superficie dell'ITO¹⁴.

Il *grafting* viene ottenuto attraverso una serie di voltammetrie cicliche come si può vedere in figura 2.11.

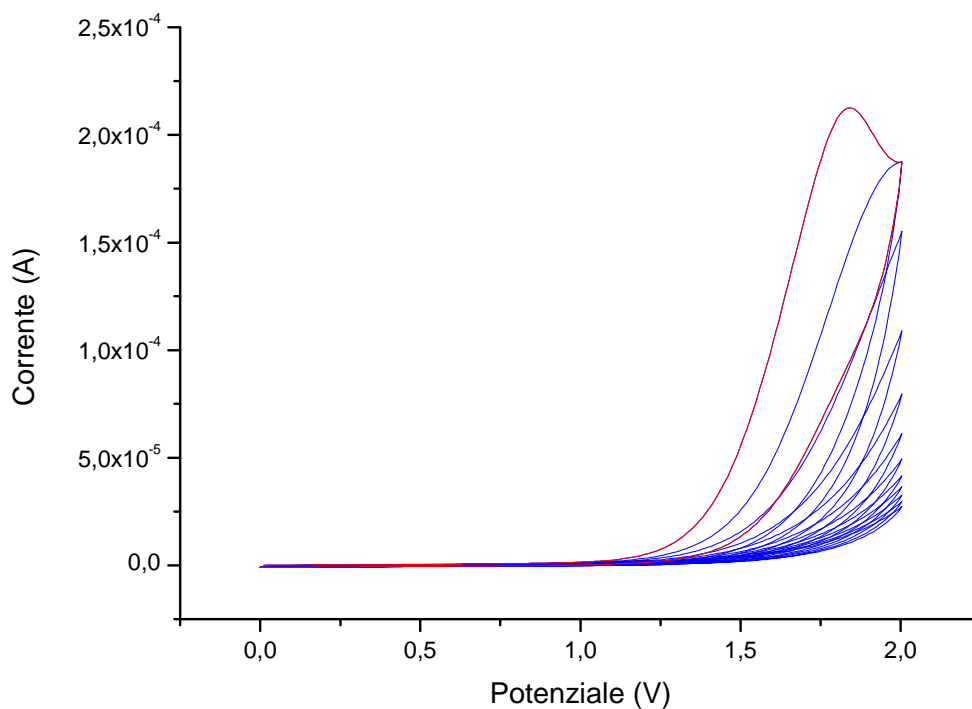


Fig. 2.11 Voltammogramma di *grafting* 2AB. In rosso viene evidenziata la prima scansione di *grafting*.

In rosso è evidenziata la prima scansione che presenta il picco più alto perché durante il primo ciclo di voltammetria la superficie disponibile per il *grafting* è massima, poi si riduce via via in quanto l'area elettrochimica libera disponibile diminuisce a causa del ricoprimento.

Un'altra evidenza sperimentale della modifica superficiale apportata dal *grafting* si può riscontrare osservando le voltammetrie cicliche eseguite in PBS riportate in figura 2.12 prima e dopo l'attacco elettrochimico. Le correnti sviluppate dall'elettrodo modificato (curva rossa) sono maggiori rispetto a quelle relative all'ITO pulito (curva blu): tali risultati rendono conto dell'avvenuta modifica sulla superficie elettrodica.

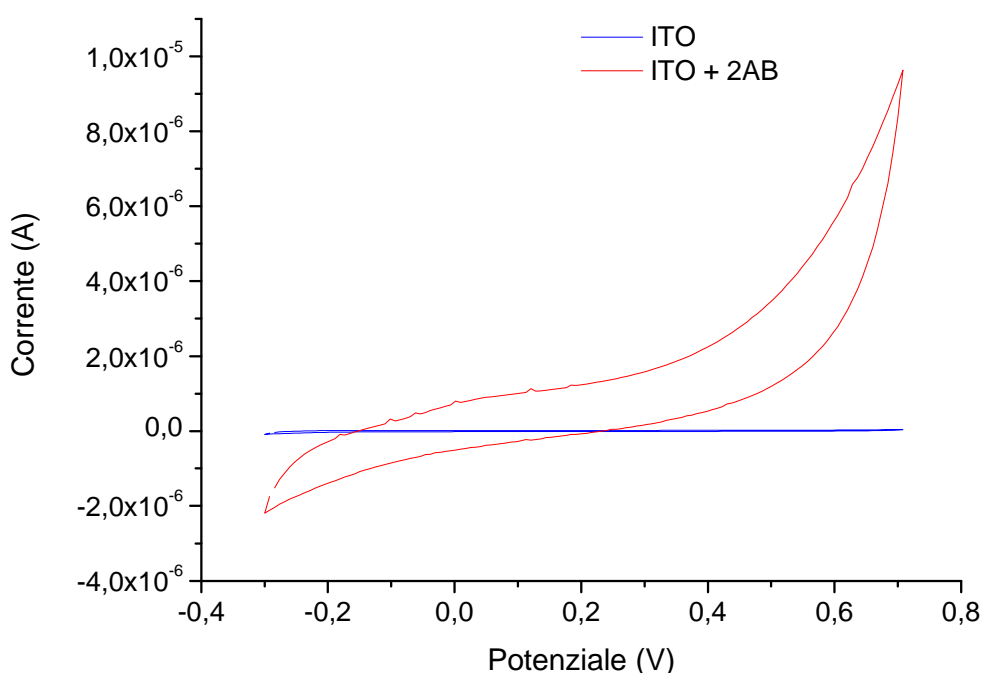


Fig. 2.12 Voltammogramma di caratterizzazione della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con grafting 2AB (curva rossa) ottenuto da CV svolta in PBS 0.1 a pH 7.4 .

L'elettrodo così modificato è stato inoltre caratterizzato mediante CV usando una soluzione elettrolitica con l'aggiunta del tracciante FeCN che ha carica negativa. Dal voltammogramma riportato in figura 2.13 si vede che dopo il *grafting* il picco di scarica del FeCN è più marcato rispetto a prima della modifica. Questo risultato è consistente con la letteratura: a pH 7.4 il 2AB è protonato perché la pKa di quest'ammina è pari a $10,8^{15}$, quindi il 2AB è carico positivamente. La presenza di cariche positive in superficie facilita la scarica del tracciante che è negativo e viene quindi attratto verso l'area elettrodica.

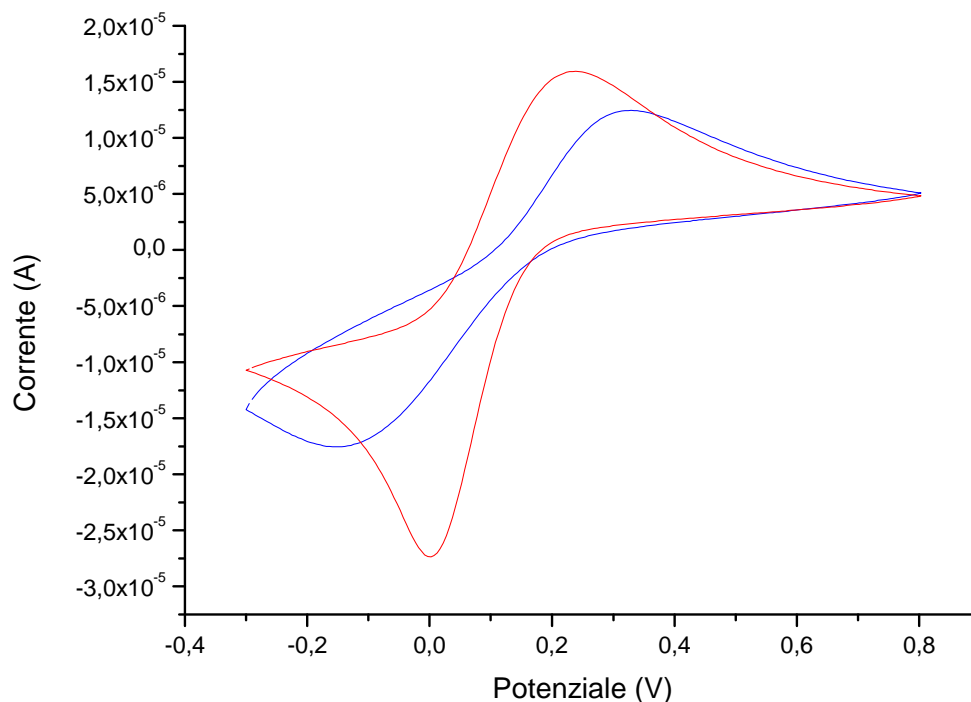


Fig. 2.13 Voltammogramma di caratterizzazione della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con grafting 2AB (curva rossa) ottenuto da CV svolta in PBS 0.1 a pH 7.4 e FeCN 1mM.

2.1.4 Grafting p-ABA

La superficie di ITO è stata nanostrutturata mediante l'ossidazione di gruppi amminici del p-ABA. Tecnicamente l'ammina viene ossidata applicando un potenziale positivo, perde cioè un atomo di idrogeno e si attacca sulla superficie elettrodica. Si ottiene così uno strato superficiale di gruppi COOH (figure 2.14).

La voltammetria che è stata eseguita per ottenere questo *grafting* restituisce il voltammogramma in figura 2.15. Come si può vedere dal grafico, il picco di ossidazione del p-ABA si colloca a oltre il potenziale di 1 V. I picchi di ossidazione calano drasticamente con il procedere dei cicli e questo dimostra che l'efficienza del *grafting* diminuisce bruscamente¹¹. Tale calo è legato all'aumento del ricoprimento della superficie ad ogni ciclo di scansione di potenziale e quindi alla diminuzione di area elettrochimica disponibile. Grazie al *grafting* vengono stabiliti legami covalenti tra la superficie dell'elettrodo e l'ammina primaria dell'acido amminobenzoico (ABA)¹⁶.

Il meccanismo di reazione di *grafting* del p-ABA è qui riportato schematicamente:

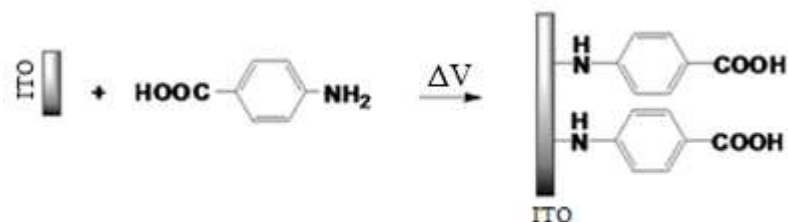


Fig. 2.14 Schema di reazione¹⁶ di grafting p-ABA.

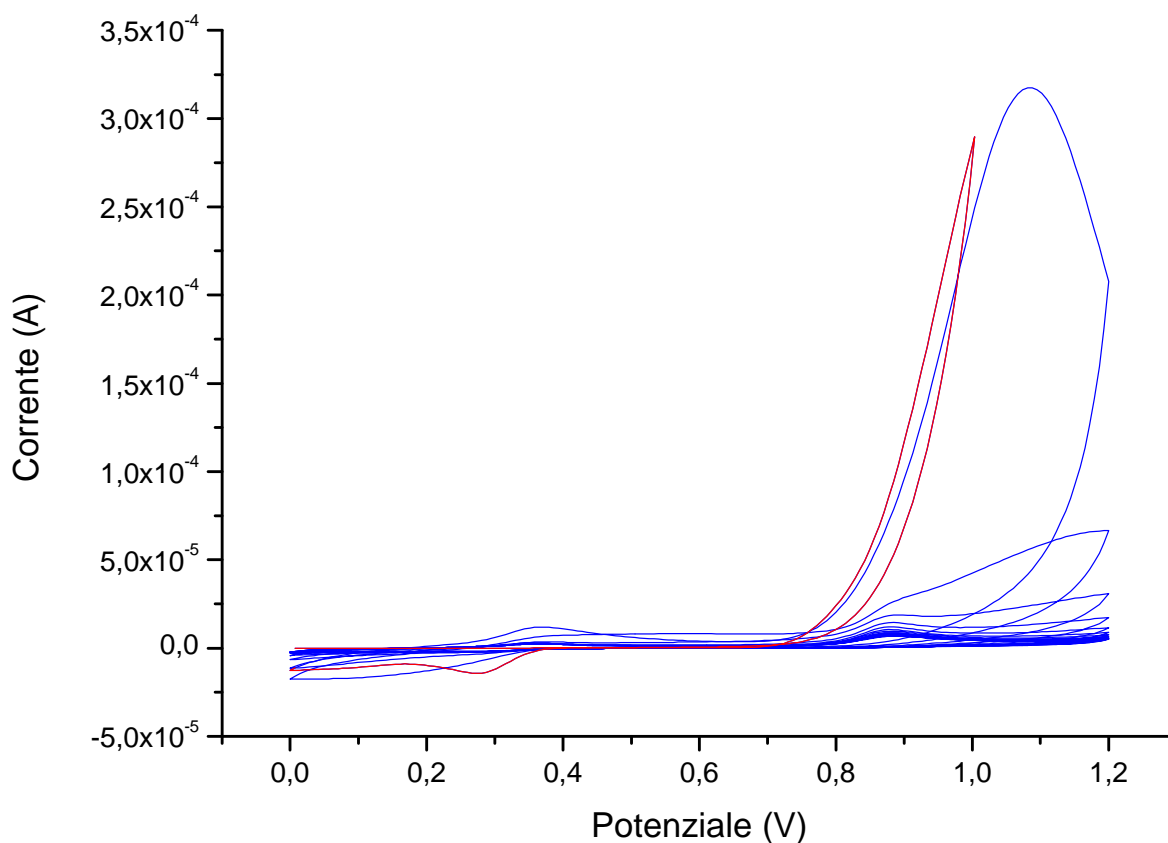


Fig. 2.15 Voltammogramma di grafting p-ABA su substrato di ITO. in rosso viene riportata la prima scansione di grafting.

Il *grafting* è stato caratterizzato mediante voltammetrie cicliche in PBS come si vede nel grafico in figura 2.16. Si nota uno spostamento della rampa discendente in riduzione della voltammetria eseguita dopo il *grafting* (in rosso) rispetto a quella relativa all'elettrodo ITO pulito (in blu). Questo comportamento dimostra che l'elettrolita si scarica con più fatica dopo il *grafting*: è necessario fornire un potenziale maggiore (in valore assoluto) per ottenere la reazione redox poiché lo strato di p-ABA attaccato alla superficie genera una resistenza che limita la scarica dell'elettrolita.

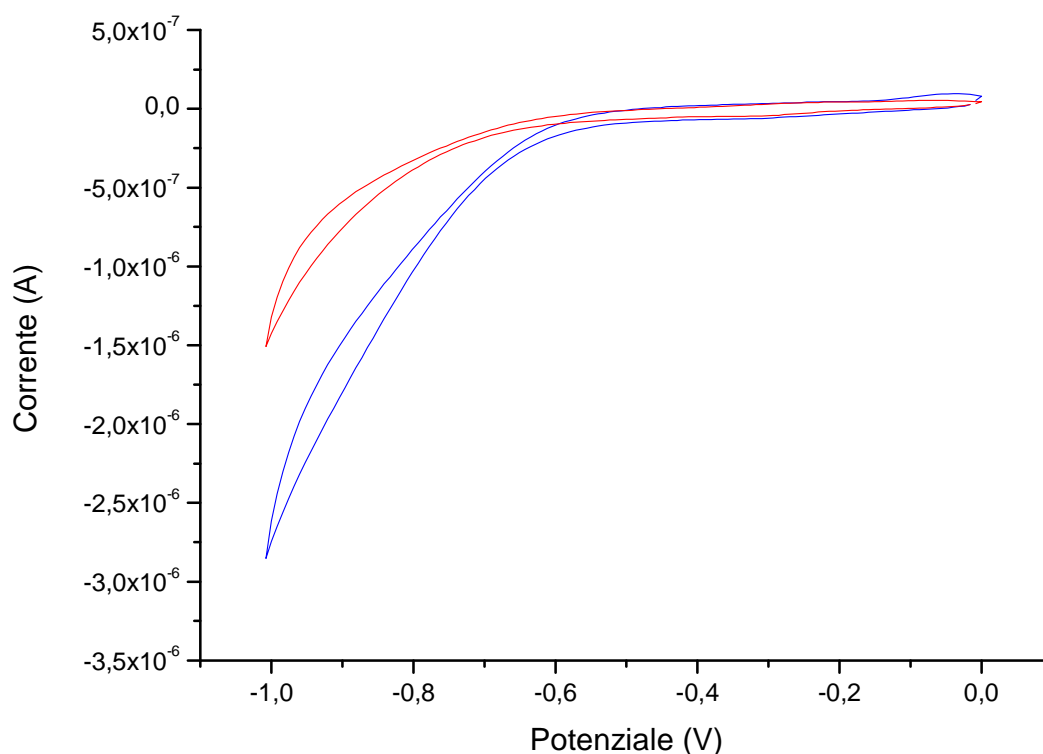


Fig. 2.16 Voltammogramma in PBS 0.1 M a pH 7.4 prima del *grafting* (blu) e dopo il *grafting* (rosso).

Questo step di modifica è stato infine caratterizzato mediante una prova di CV in presenza di FeCN nell'elettrolita, come proposto in figura 2.17. Si può notare come le due curve riferite ai voltammogrammi svolti precedentemente e successivamente alla modifica siano molto simili: la conduttività sembra non cambiare dopo il *grafting*. Tale comportamento può essere spiegato dal fatto che quando il pH dell'elettrolita è più alto della pKa della superficie ($\text{pH} > \text{pKa}$) il gruppo carbossilico del film di p-ABA attaccato sull'elettrodo si dissocia (in ioni R-COO^-) e carica negativamente la superficie creando forze repulsive tra la superficie stessa e gli ioni negativi in soluzione. Al contrario, a condizioni di pH inferiori alla pKa ($\text{pH} < \text{pKa}$) alla

superficie ci sono gruppi COOH non dissociati. In questo caso sulla superficie non ci sono forze repulsive in azione¹⁶. A pH 7.4 (pH dell'elettrolita di misura) il p-ABA sulla superficie elettrodica è carico negativamente perché la sua pKa è inferiore a tale valore. Ci sono quindi forze repulsive tra il tracciante redox negativo, FeCN, e la superficie modificata. Le CV di caratterizzazione riportate in figura 2.17 svolte prima e dopo l'attacco elettrochimico presentano picchi di intensità molto simile. Questo probabilmente è legato allo scarso ricoprimento del p-ABA sulla superficie dell'elettrodo.

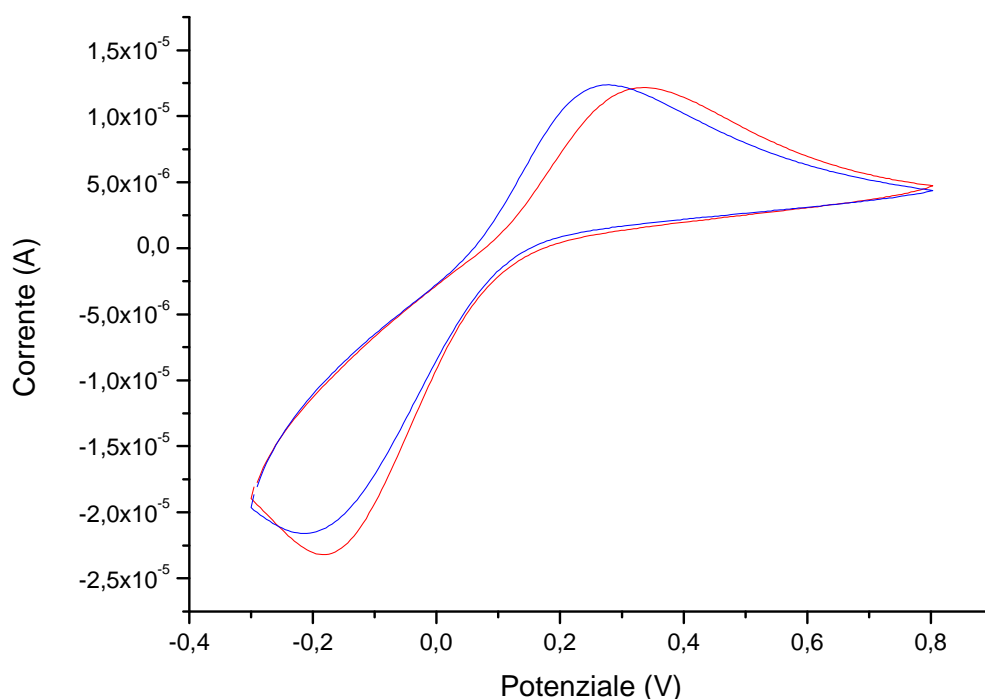
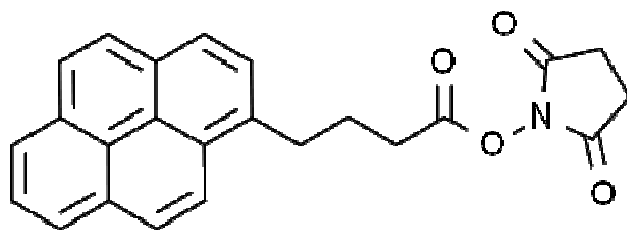


Fig 2.17 Voltammogramma di caratterizzazione della superficie pulita (curva blu) e della superficie modificata con grafting p-ABA (curva rossa) ottenuto da CV svolta in PBS 0.1 a pH 7.4 e FeCN 1mM.

2.2 Attacco del pirene

La superficie elettrodica funzionalizzata con il *grafting* elettrochimico può essere ulteriormente modificata per ottimizzare l'attacco del GO e infine la deposizione dell'aptamero. Questa modifica viene fatta utilizzando una molecola compatibile sia con la superficie modificata sia con il GO che verrà depositato successivamente sull'elettrodo. Una molecola che soddisfa a queste richieste è il PirBA-NHS¹⁷ (fig. 2.18).



2.18 Struttura molecolare di pirBA-NHS.

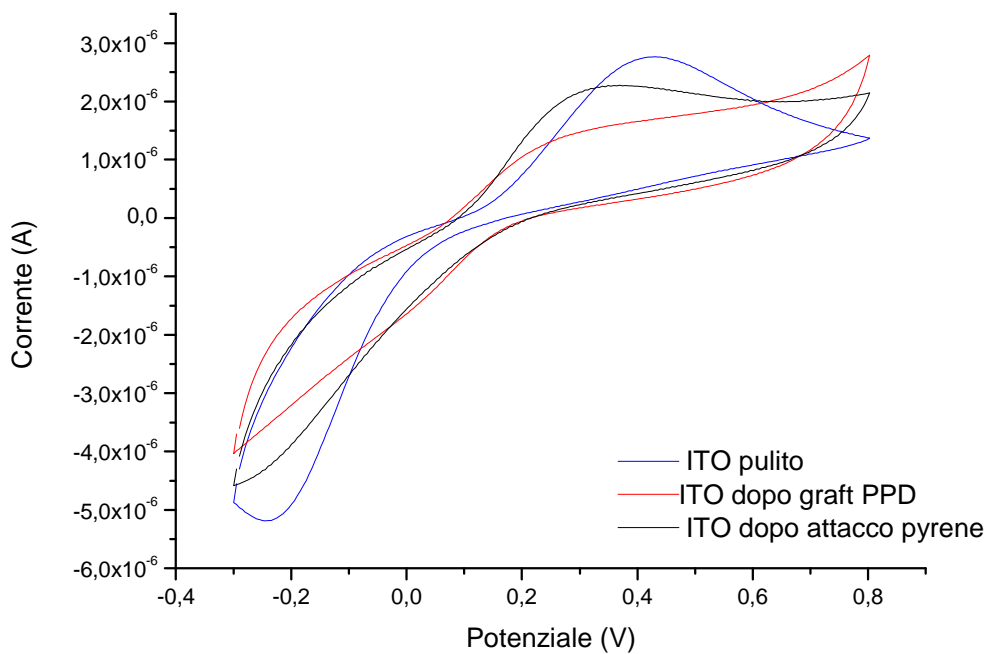
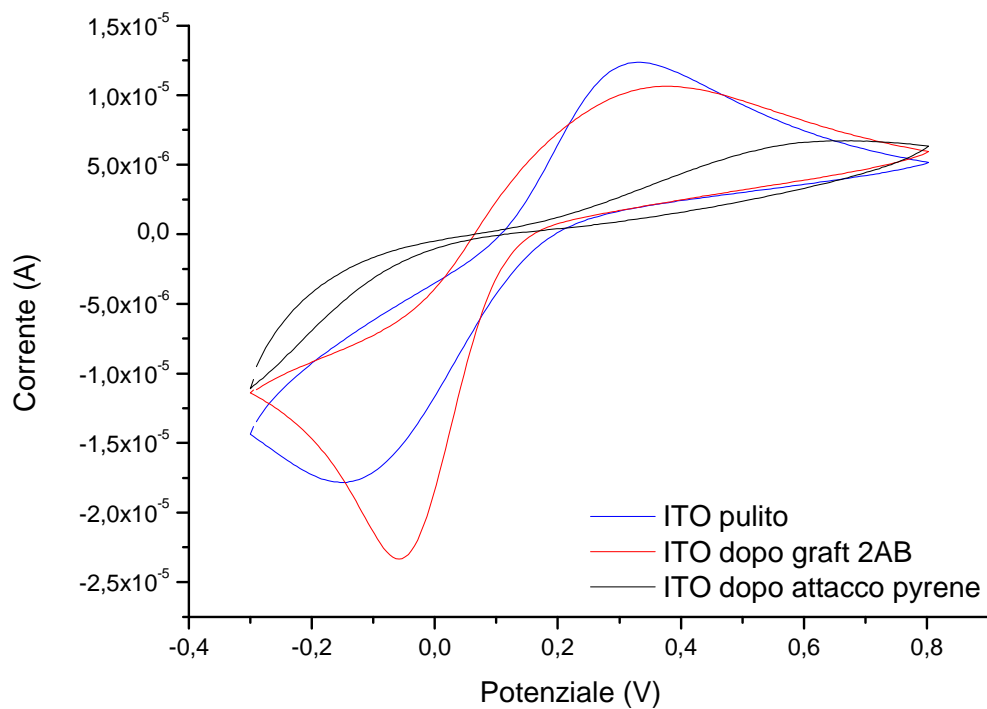
Dopo il trattamento di *grafting*, l'ITO è stato sottoposto all'attacco chimico del pirene (pirBA) che funge da collegamento per la successiva deposizione di grafene ossido. La struttura tridimensionale del PirBA si compone da una piattaforma piana costituita dal pirene e da una catena carboniosa inclinata che termina con il gruppo carbossilico (fig. 2.18). Il pirene è costituito da quattro anelli benzenici che hanno grande affinità con la struttura spaziale del grafene ossido e permettono un buon attacco del GO favorendo la deposizione di aptamero che permetterà il rilevamento di insulina¹⁷.

La deposizione di PirBA è stata osservata attraverso prove di caratterizzazione elettrochimica mediante voltammetria ciclica condotta precedentemente e successivamente alla fase di attacco chimico. A titolo di esempio viene riportata una prova fatta in PBS con tracciante FeCN (fig. 2.19) su un elettrodo di ITO precedentemente modificato elettrochimicamente con 2AB e PPD.

In entrambi i casi le prove di caratterizzazione dimostrano che la superficie ha subito due diverse modifiche: il *grafting* e l'attacco chimico del pirBA. Entrambe le modifiche hanno cambiato la risposta elettrochimica dell'elettrodo nei confronti della scarica del tracciante FeCN. Si può vedere come la corrente faradica diminuisca dopo l'aggiunta del PirBA (curva nera, fig. 2.19 b)) rispetto alla risposta dopo il *grafting* con 2AB (curva rossa). Questo suggerisce che il nuovo strato abbia una conducibilità minore di quello di 2AB. Si noti come i picchi in ossidazione e in riduzione siano appiattiti e più distanziati tra loro: questo allontanamento indica che l'elettrodo ha un comportamento meno reversibile nei confronti della reazione di scarica del tracciante.

Nel caso dell'attacco del pirBA sull'ITO modificato con la PPD (fig 2.19 b)) risulta che l'attacco del pirBA fa aumentare la corrente prodotta dall'elettrodo, e favorisce quindi la scarica del tracciante. Tale risultato è in accordo con i risultati riguardanti la PPD: il suddetto *grafting* blocca la scarica redox del tracciante sulla superficie dell'elettrodo.

a)



b)

Fig2.19. Voltammogrammi di caratterizzazione della superficie modificata di due elettrodo di ITO.

I risultati ottenuti da questa serie di prove preliminari hanno permesso di evidenziare le peculiarità dei diversi processi di grafting considerati e di individuare le modalità di funzionalizzazione compatibili con gli obiettivi dello studio, da utilizzare per la fase successiva di modifica dell'elettrodo lavorante dello SPE:

- l'attacco elettrochimico della PPD con l'idea di ottimizzare questa fase di modifica sintetizzando una nuova molecola di *grafting* in grado di migliorare l'attacco chimico del pirBA: la PirAB-PPD. In questo modo infatti si semplifica il procedimento di modifica dell'elettrodo e si migliora l'efficienza dell'attacco del pirBA.
- l'attacco elettrochimico del PANI perché produce un netto aumento dell'area elettrochimica e quindi una maggiore area disponibile per l'attacco del GO e successivamente dell'aptamero;
- l'attacco elettrochimico della 2AB perché risponde all'attacco del pirBA.

L'attacco del p-ABA è stato scartato perché non è compatibile con l'attacco del pirBA in quanto il gruppo superficiale carbossilico del PABA non si lega con il gruppo carbossilico del pirBA. Tale modifica risulta quindi impossibile e riduce l'affinità dell'elettrodo modificato al successivo attacco del GO.

2.3 Grafting su SPE dorato

Alla luce dei risultati ottenuti dallo studio preliminare sull'ITO sono state selezionate le modalità di trattamento più adatte e sono state quindi applicate all'elettrodo lavorante in oro dello SPE. Di seguito vengono presentati ed analizzati tutti i risultati ottenuti dagli esperimenti svolti sullo SPE.

2.3.1 Grafting ossidativo della PPD: il PANI

L'applicazione del *grafting* ossidativo per ottenere la polianilina sullo SPE d'oro, è del tutto analoga a quella riportata per l'ITO (cfr. 2.1.2). Di seguito si riportano le voltammetrie cicliche ottenute dal *grafting* sull'ITO e sullo SPE.

Confrontando i due grafici delle voltammetrie di attacco elettrochimico in figura 2.21 si nota immediatamente la presenza più consistente di picchi sul voltammogramma eseguito sullo SPE dorato rispetto all'ITO. Questo dimostra la maggiore reattività dell'oro nei confronti dell'attacco elettrochimico e la formazione di strutture diverse di PANI caratterizzate da picchi ossido-riduttivi diversi, come suggerisce la letteratura a riguardo¹⁴.

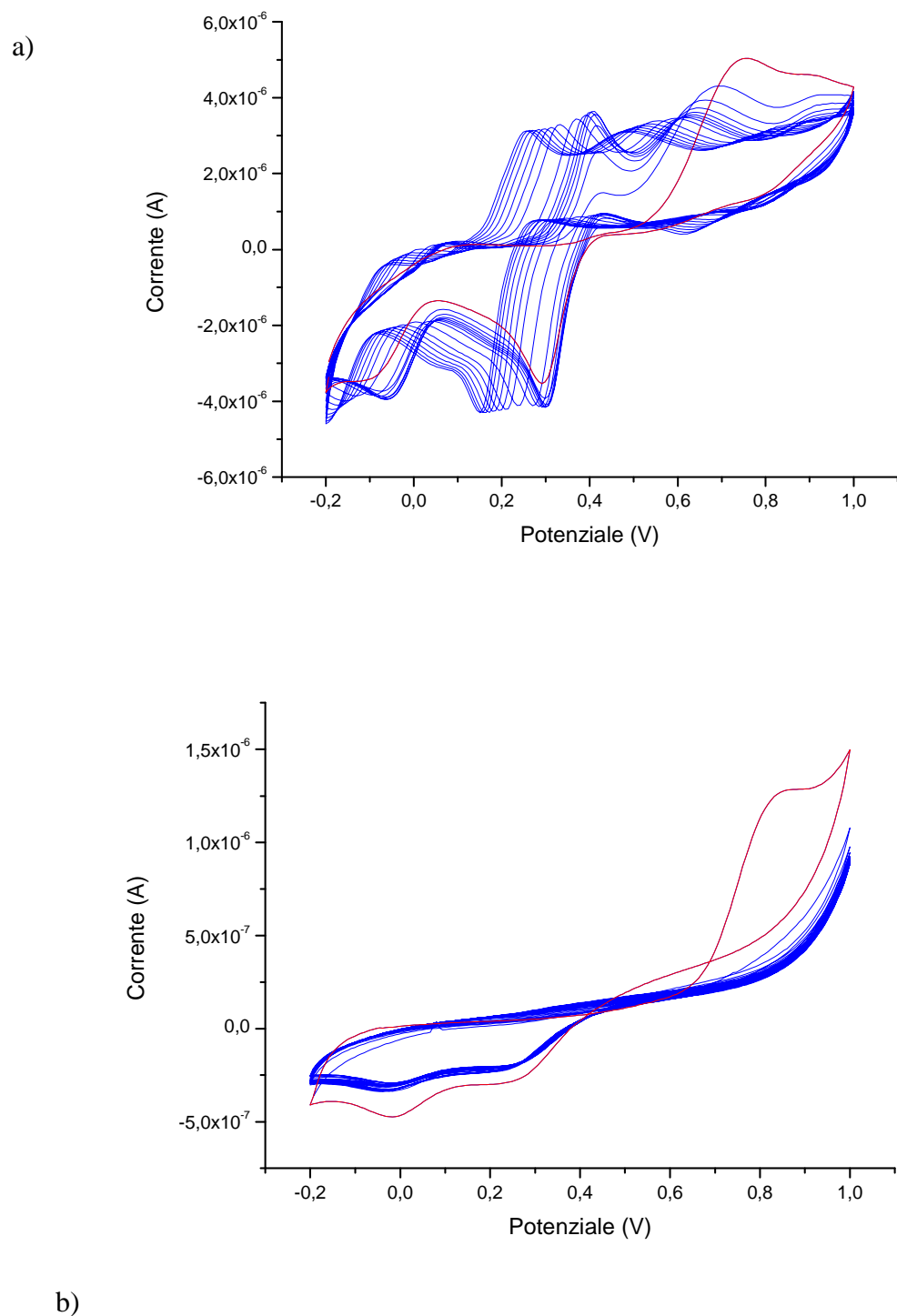


Fig. 2.21 a) Grafting PANI su substrato ITO. b) Grafting PANI su substrato d'oro (SPE). In entrambi i casi la prima scansione di grafting è evidenziata in rosso.

Analizzando il voltammogramma riferito allo SPE dorato si nota che a 0.8 V la PPD si ossida e si attacca all'oro: questo fenomeno è confermato dal picco in ossidazione che scende con il procedere dei cicli, mentre a 0.4 V sale un picco ossidativo a partire dalla seconda scansione

di voltammetria. A quest'ultimo potenziale si forma il doppio legame N=N della polianilina¹⁴ (Figura 2.6): con il passare dei cicli cresce il numero dei doppi legami e cresce la catena di PANI. Si fa notare il comportamento inverso di questi due picchi: uno cresce perché si formano i doppi legami del polimero, l'altro si riduce perché la superficie d'oro libera diminuisce, viene cioè passivata e cala il numero di molecole di PPD che si attaccano direttamente alla superficie, all'aumentare del ricoprimento dovuto al *grafting*.

Si osservi inoltre che le scansioni sono sempre più ravvicinate perché la superficie disponibile cala continuamente e sempre meno PPD si attacca.

Dalla voltammetria di caratterizzazione si possono dedurre proprietà elettrochimiche della polianilina.

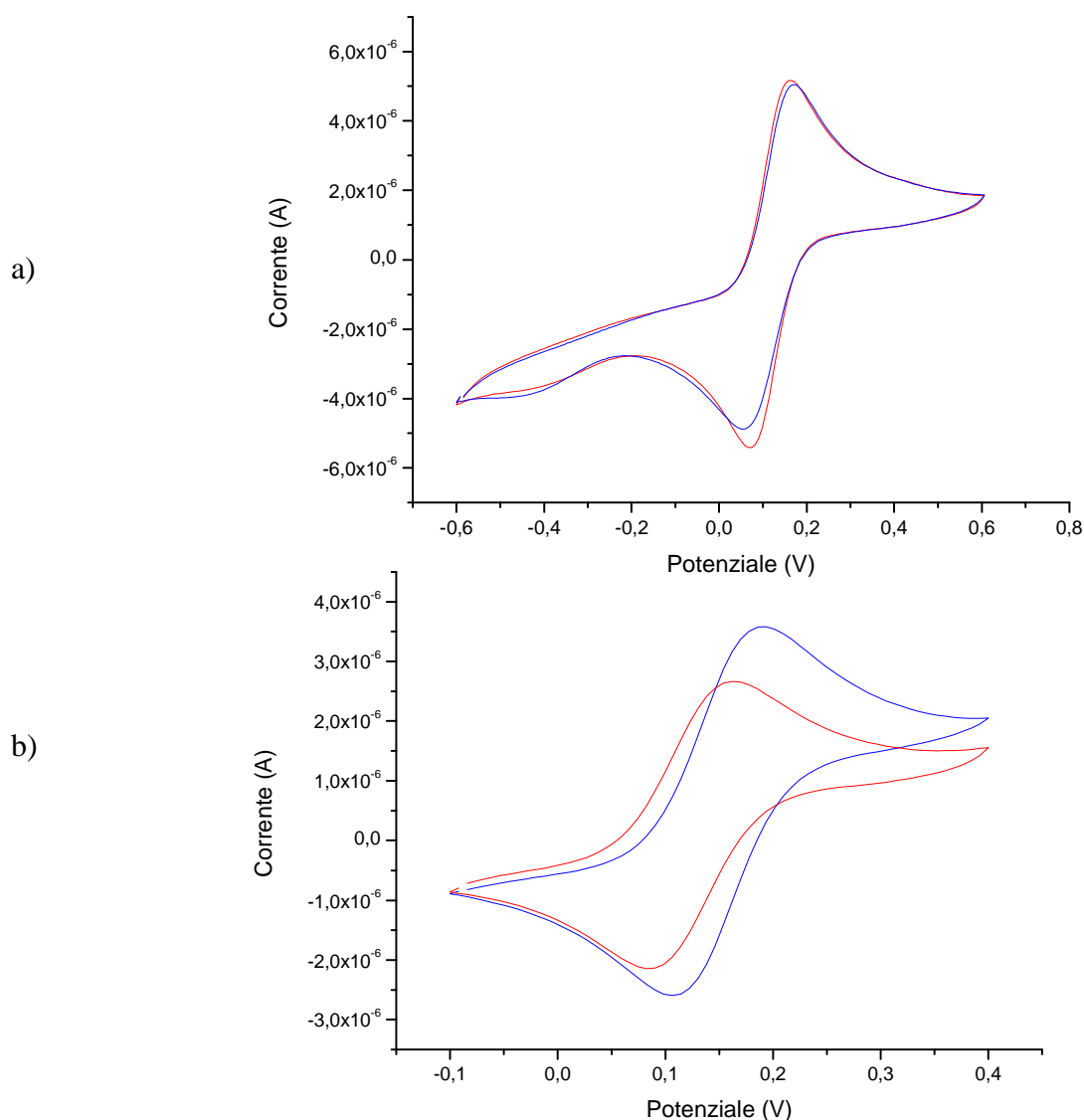


Fig. 2.22 (a) Voltammogramma in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FeCN 2mM. (b) Voltammogramma in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FcmetOH 5mM. In entrambi i grafici la voltammetria sull'elettrodo pulito è in blu mentre la voltammetria dopo la modifica apportata dal *grafting* è rappresentata dalla curva in rosso.

Dalla voltammetria ciclica eseguita con FeCN si nota che i picchi non diminuiscono di intensità dopo il *grafting*: questo indica che lo strato di PANI non fa diminuire la conducibilità dell'elettrodo perché continua ad avvenire la scarica redox di FeCN all'elettrodo: i due voltammogrammi sono infatti quasi sovrapponibili. Questo risultato non era scontato per un elettrodo d'oro che possiede una buona conducibilità iniziale (maggiore di quella dell'ITO). Il *grafting* PANI sull'ITO infatti aveva conferito una maggiore conduttività elettrica all'elettrodo, come evidenziato dal voltammogramma in figura 2.9.

Dalla prova di CV eseguita in elettrolita unito a FcMetOH, tracciante neutro, si evince che il *grafting* è avvenuto con successo in quanto il tracciante neutro ha più difficoltà a scaricarsi sul metallo a causa della presenza di uno strato polimerico intermedio "ingombrante" costituito dal PANI.

In conclusione si desume che la conducibilità dell'elettrodo d'oro non viene apprezzabilmente modificata dalla presenza della polianilina. Questo risultato non è banale considerate le buone proprietà elettriche tipiche dell'oro.

Sono state indagate inoltre le proprietà resistive dello SPE pulito e modificato con il *grafting* attraverso misure di EIS in presenza di tracciante negativo.

Dal grafico riportato in figura 2.23 si nota come il valore della Rct diminuisca dopo il *grafting*. Si ricorda che il valore della Rct è legato all'ampiezza della semicirconferenza rilevata ad alte frequenze: maggiore è il diametro di tale circonferenza, maggiore è la resistenza al trasferimento di carica associata alla superficie dell'elettrodo. In conclusione il grafico dimostra non solo che il *grafting* apporta una diminuzione di tale resistenza, in quanto la semicirconferenza dopo il *grafting* (in rosso, fig. 2.23) ha un diametro visibilmente minore rispetto a quello della circonferenza ottenuta dalla EIS svolta sull'elettrodo pulito (in blu), alle stesse condizioni di lavoro, ma permette anche la quantificazione di tale riduzione.

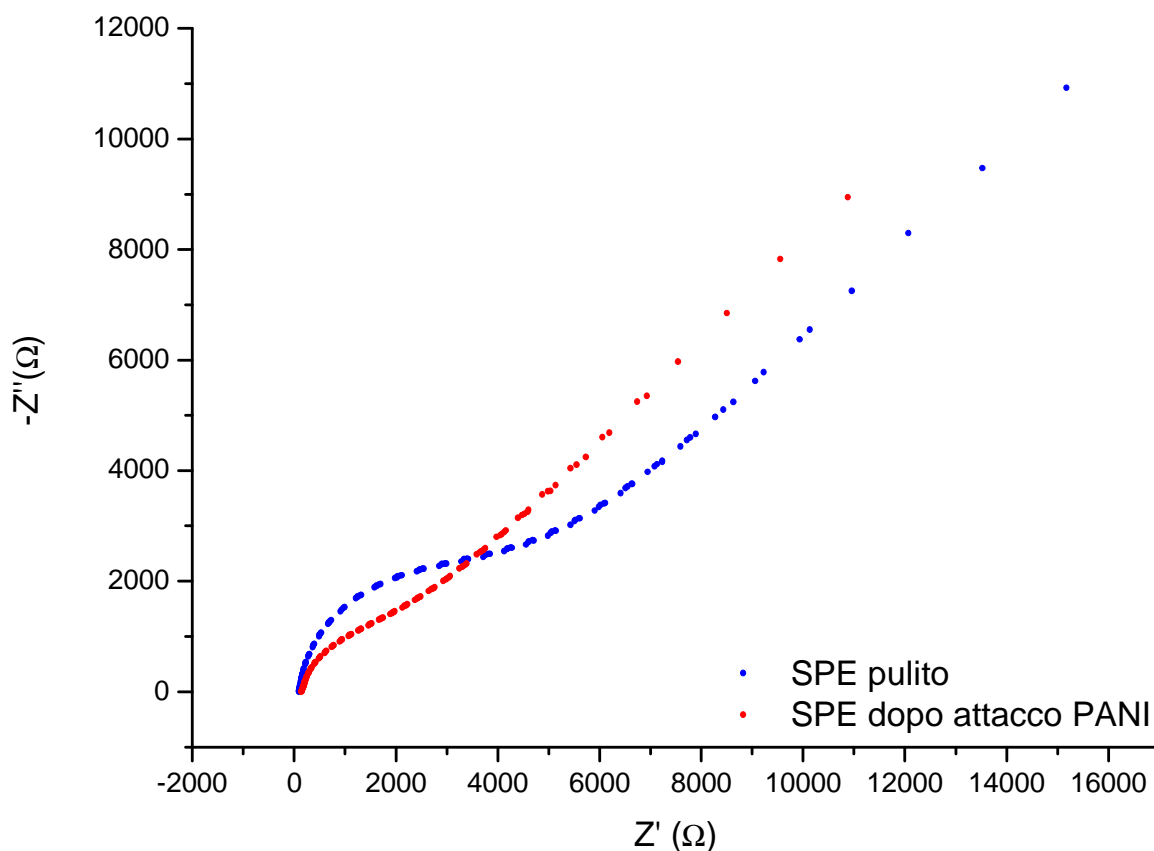


Fig. 2.23 EIS in PBS 0.1 M a pH 7.4 in FeCN 2mM.

2.3.2 Grafting 2AB

Il *grafting* 2AB sull'elettrodo d'oro dello SPE è avvenuto prestando particolare attenzione alle modalità di svolgimento: l'operazione è stata condotta al buio e la soluzione di *grafting* è stata deossigenata insufflando azoto gassoso. Queste due accortezze sono state impiegate per evitare eventuali reazioni secondarie e il degrado dei reagenti. La presenza di ossigeno infatti può ridurre l'efficacia del *grafting* in quanto il radicale $NH\bullet$ si lega all'ossigeno formando composti indesiderati.

Si è inoltre optato per un numero molto inferiore di scansioni rispetto a quanto fatto per l'ITO, come si vede in figura 2.24, ponendo come limite massimo di potenziale applicato il valore 1.8V anziché 2V come invece era stato scelto per l'ITO. Questa scelta ha l'obiettivo di preservare lo SPE evitando l'esposizione a potenziali di scarica redox dell'oro.

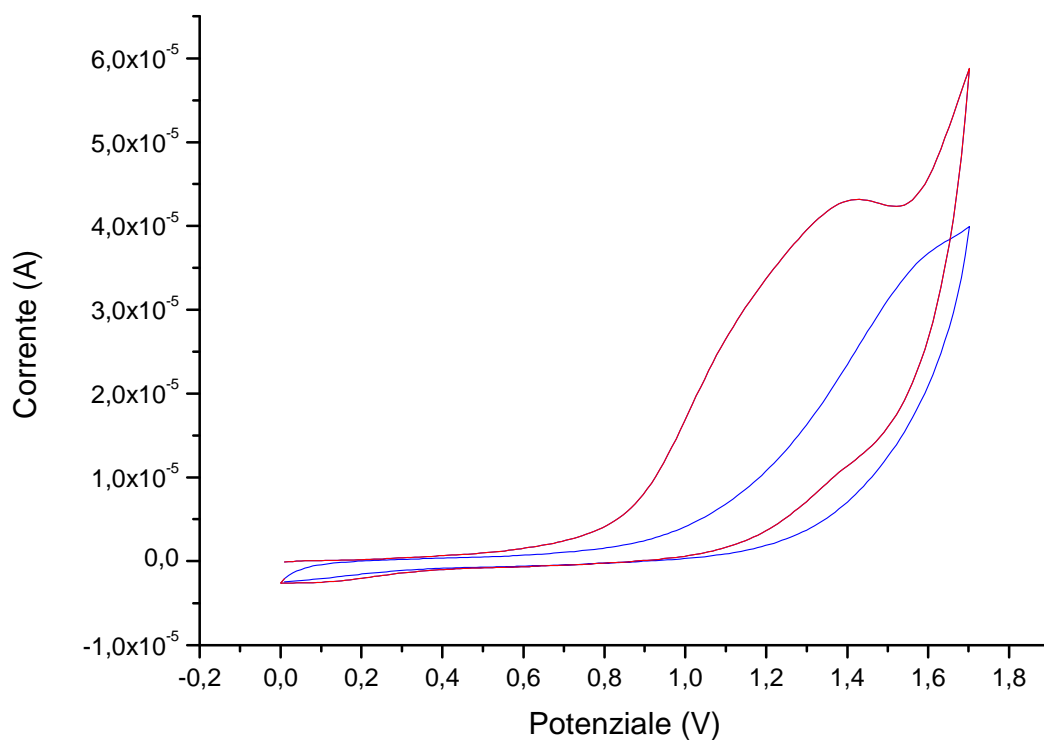


Fig. 2.24 Voltammogramma su superficie dorata dello SPE per ottenere il grafting 2AB. Viene evidenziata in rosso la prima scansione.

La buona riuscita del *grafting* è stata registrata anche dalle voltammetrie di caratterizzazione in presenza del tracciante FeCN, in fig. 2.25. Si nota come, dopo il *grafting*, il picco di ossidazione e di riduzione del FeCN siano più marcati (curva rossa).

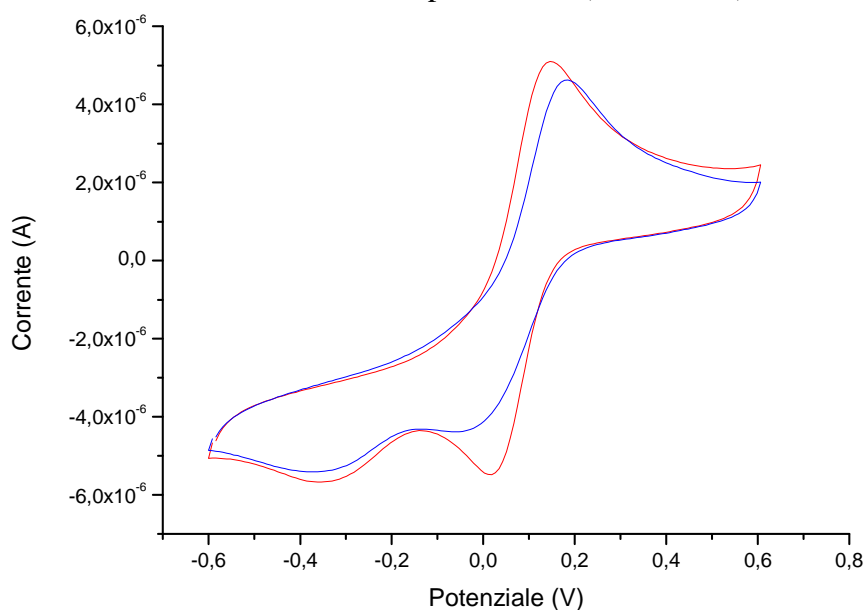


Fig. 2.25 Voltammogramma ottenuto da voltammetria ciclica in PBS 0,1 M a pH 7,4 e FeCN 2 mM. La curva blu si riferisce alla voltammetria fatta sullo SPE pulito, la curva rossa alla misura eseguita dopo il *grafting* 2AB.

Anche questo *grafting* favorisce la scarica del tracciante negativo: la superficie modificata è ricoperta di ammine cariche positivamente che attraggono il tracciante carico negativamente. Le analisi di impedenza condotte sull'elettrodo modificato mostrano una diminuzione della resistenza alla scarica di tracciante carico negativamente, FeCN, dopo il *grafting*. In figura 2.26 si riportano i grafici ottenuti dalle prove di EIS dello SPE pulito e di quello modificato con il *grafting* 2AB, che evidenziano come la semi cicconferenza caratterizzante la resistenza alla carica è più ampia per lo SPE d'oro pulito rispetto a quella determinata per lo SPE che ha subito il *grafting*.

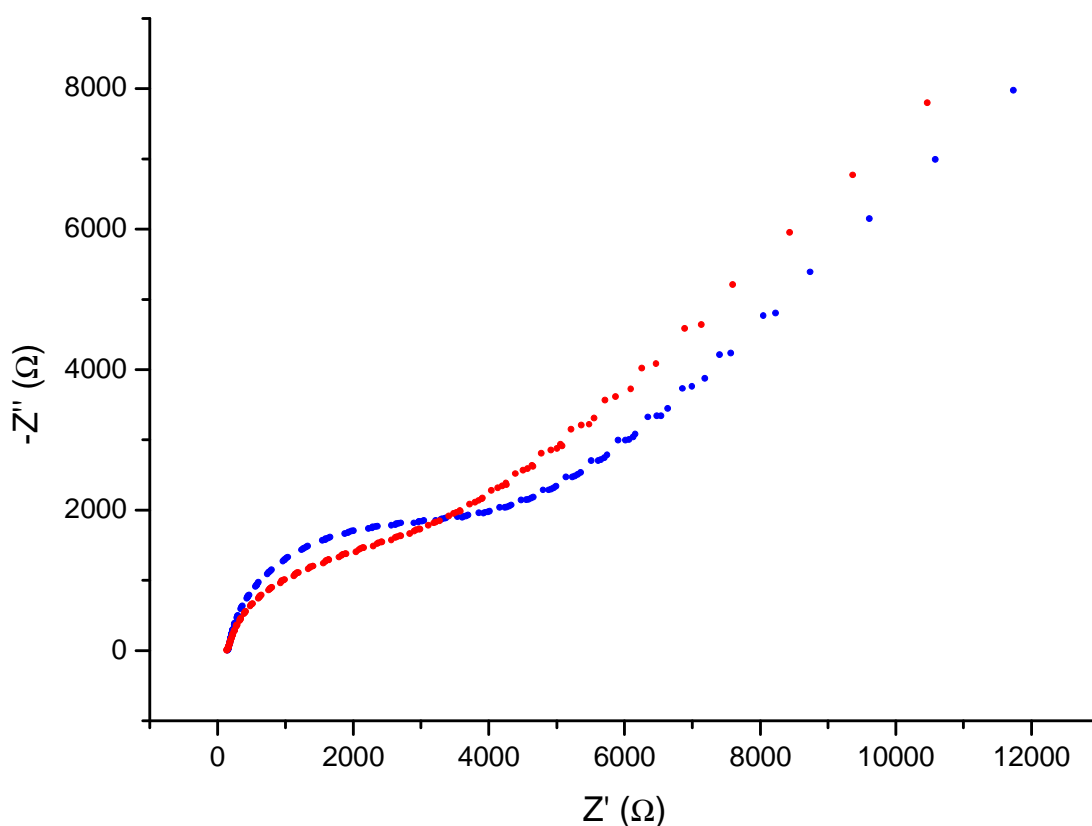


Fig. 2.26 Grafico relativo alla misura di EIS di SPE pulito (curva blu), EIS di SPE dopo *grafting* 2AB (curva rossa) in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FeCN 2mM.

È stato inoltre verificato che il *grafting* producesse uno strato avente ammine primarie libere superficiali, essenziali per l'attacco successivo del GO. Per questa prova è stato predisposto un esperimento sfruttando la TNBS: molecola che possiede la proprietà di legarsi irreversibilmente alle ammine primarie.

Il processo avviene secondo la nota reazione^{9,16}:

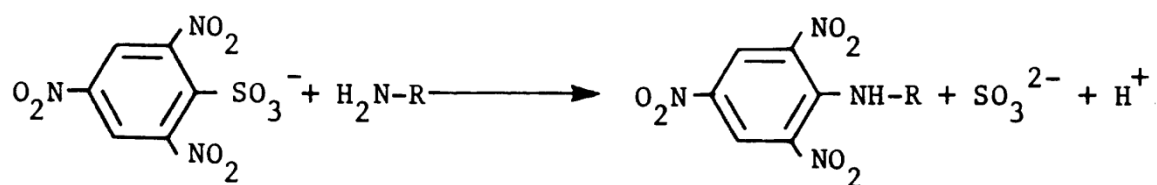


Fig 2.27 Schema di reazione tra TNBS e ammine primarie¹⁸.

Per la prova è stata preparata una soluzione di TNBS 1 mM in buffer di borato di sodio 0.025 M a pH 9.6. La soluzione è stata applicata in goccia sullo SPE per 12 ore al buio.

Lo SPE è stato quindi risciacquato con acqua milli-Q e asciugato con un flusso d'azoto. Per rilevare la riduzione dei gruppi nitro è stata svolta una voltammetria ciclica in PBS il cui voltammogramma si riporta in figura 2.28. Il picco caratteristico della reazione redox della TNBS è a -0.45 V, come si vede distintamente nella misura fatta dopo l'immersione dello SPE graftato (curva rossa).

Questo dimostra la presenza in superficie di ammine primarie libere.

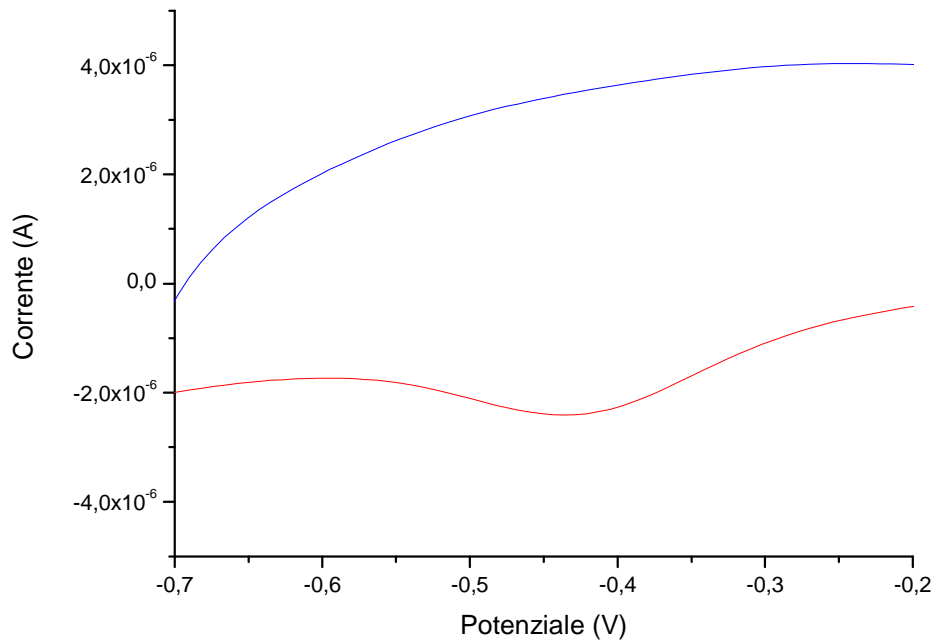
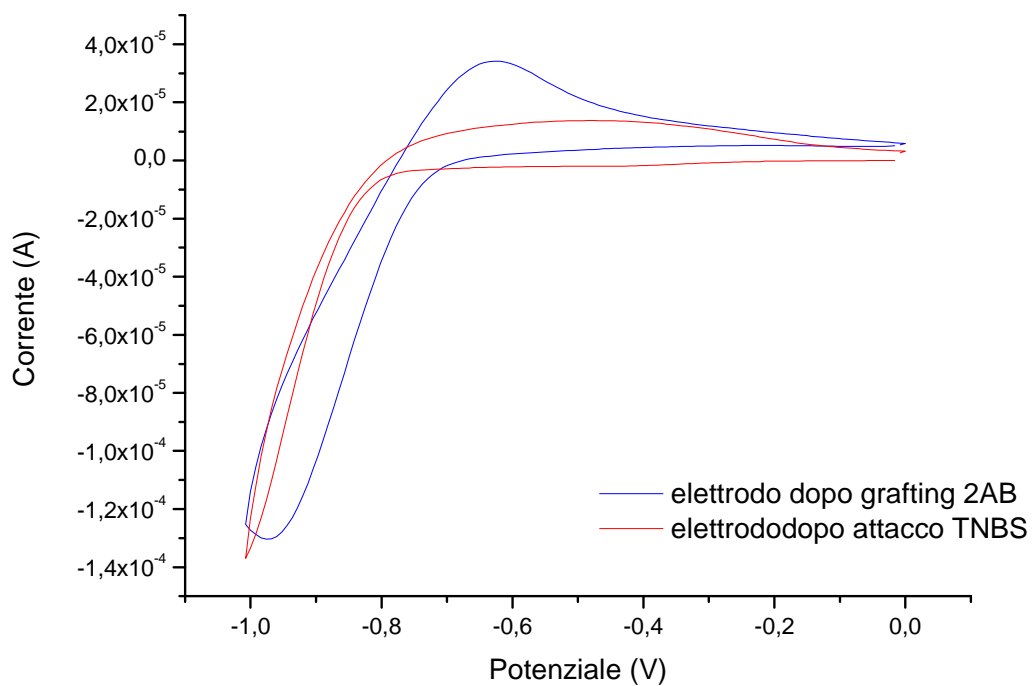


Fig. 2.28 Voltammogramma relativo alla CV fatta in PBS 0.1 M a pH 7.4. In blu viene evidenziata la misura fatta sullo SPE a grafting 2AB avvenuto, in rosso quella eseguita dopo immersione dello SPE in TNBS.

Integrando la curva voltammetrica si ottiene la quantità di ammine primarie libere presenti in superficie dalla seguente relazione:

$$\Gamma = \frac{i_p 4RT}{3n^2 F^2 A v} \quad (4)$$

dove:

R è la costante dei gas perfetti, T la temperatura assoluta, $n=4$ in questo caso dato che vengono scambiati 4 elettroni, A è l'area geometrica dell'elettrodo ($0.0.2 \text{ cm}^2$), v è la velocità di scansione della CV (in questo esperimento è pari a 0.05 V/s).

In tabella 2.1 si riportano i dati dei ricoprimenti per i vari *grafting*. Lo stesso esperimento è stato svolto su elettrodi modificati con attacco elettrochimico PPD o mediante attacco chimico di cysteammina per avere un dato di confronto. Si riportano le voltammetrie cicliche fatte dopo l'attacco del TNBS su tutti i diversi elettrodi modificati in figura 2.28.

Dai dati raccolti per i vari *grafting* riportati in tabella 2.1 si conclude che il ricoprimento maggiore di ammine si ottiene dopo il *grafting* 2 AB, pari a $6.6 \cdot 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ di ammine. Questo dato per il ricoprimento ottenibile da attacco elettrochimico è in accordo con la letteratura¹¹. Il ricoprimento di ammine per il *grafting* PPD risulta un terzo di quello ottenuto dopo l'attacco della 2AB e il numero delle ammine risultante dall'esperimento svolto sull'elettrodo con cysteammina è circa metà di quello trovato per il ricoprimento del 2AB. Si conclude che il *grafting* 2AB permette di ottenere un maggior ricoprimento della superficie elettrodica di ammine.

Tabella 2.1 Ricoprimento ammine in diversi *grafting*

Tipo di <i>grafting</i>	Area picco ($10^7 \text{ A} \cdot \text{V}$)	Ricoprimento (10^{12} mol/cm^2)
2AB	2.9 ± 1.6	6.6 ± 3.7
PPD	1 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Cysteammina	1.4 ± 0.1	3.1 ± 0.1

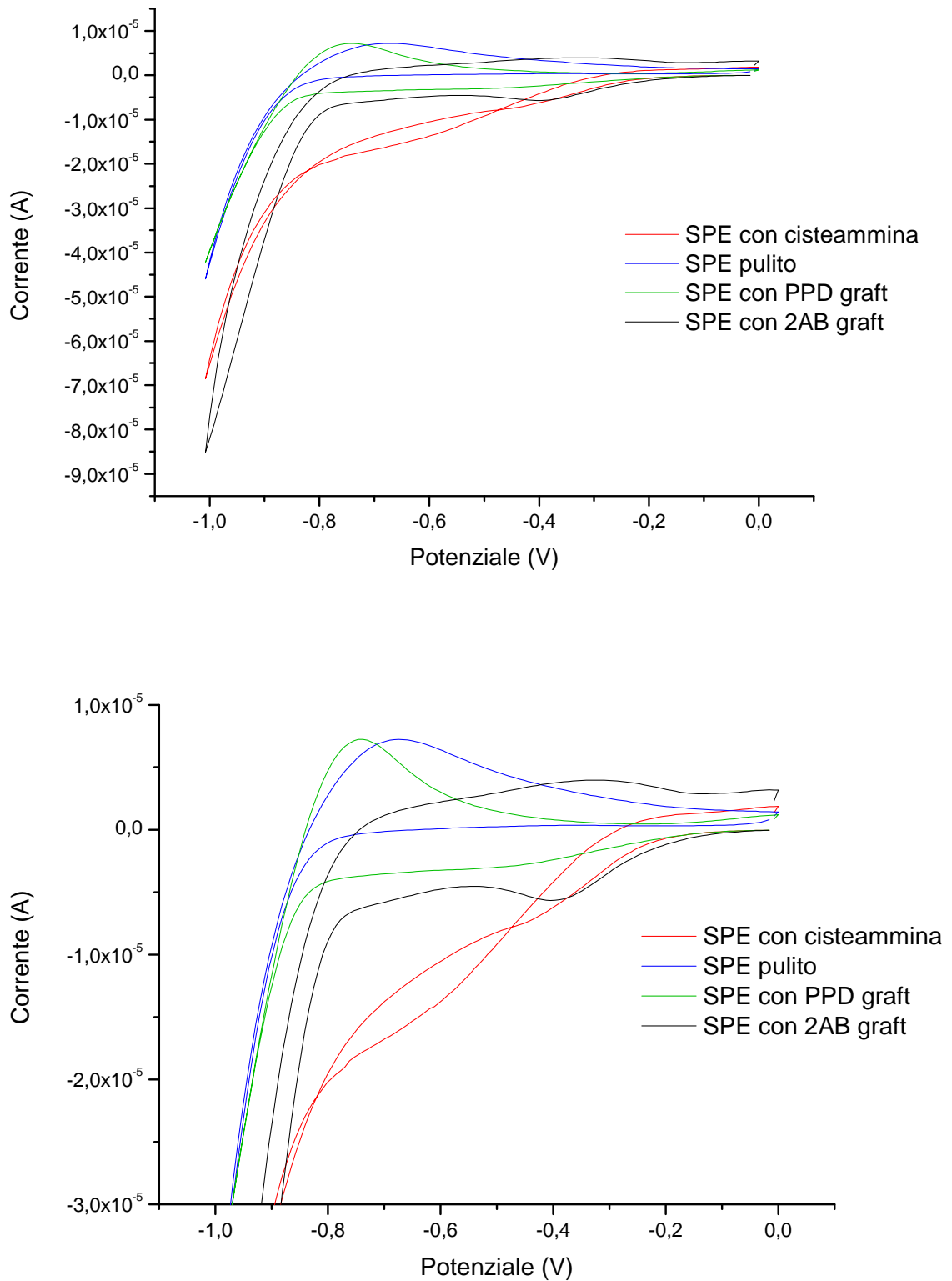


Fig. 2.29 Voltammogrammi relativi alle CV fatte in PBS 0.1 M a pH 7.4. eseguita dopo immersione dello SPE in TNBS

Conclusa la fase di *grafting* lo SPE modificato con 2AB viene sottoposto all'attacco del pir-BA. Questo trattamento permette di migliorare il deposito del GO e quindi quello dell'aptamero. Di seguito vengono descritti i diversi esperimenti condotti per attaccare chimicamente il pir-BA.

In un primo esperimento il pir-BA è stato attaccato all'ammina superficiale del 2AB mediante soluzione di pir-BA 10mM in PBS 0.1M a pH 7.3 con aggiunta di 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ di pirrolidinone per sciogliere il pir-BA e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ di 3EA. La soluzione è stata messa in goccia a contatto con l'elettrodo modificato con *grafting* di 2AB per 12 ore.

In figura 2.30, si riportano le voltammetrie di caratterizzazione di questo attacco.

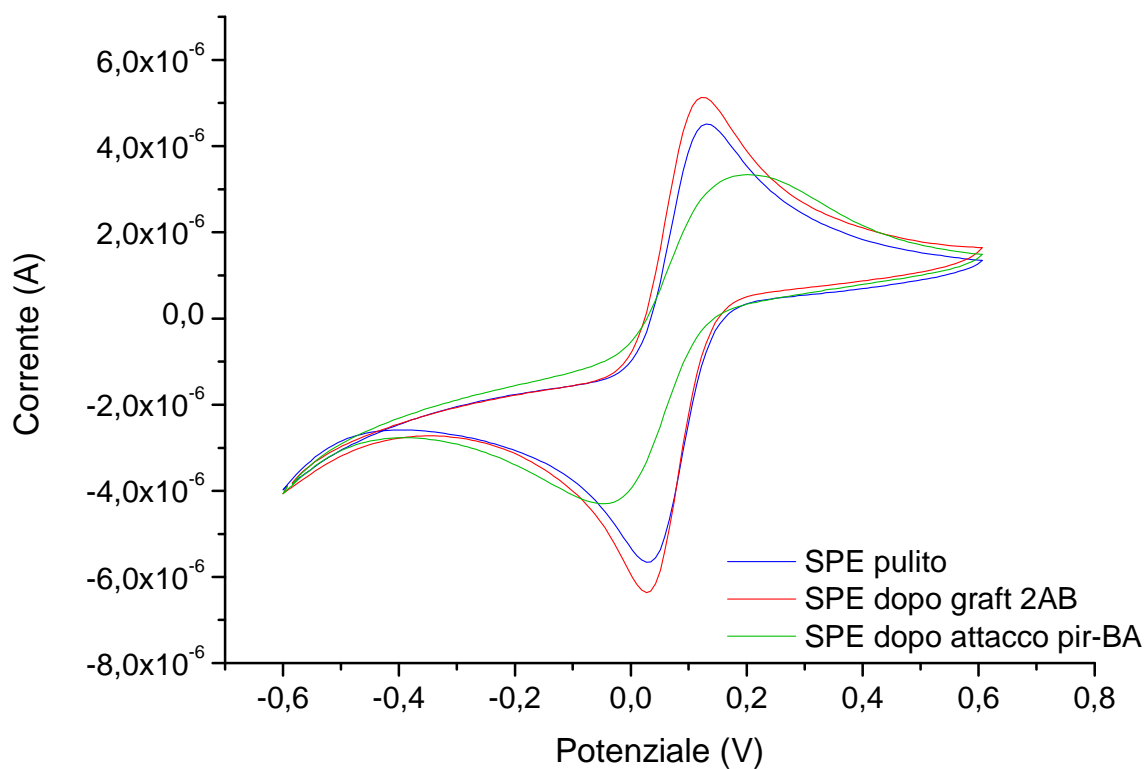


Fig. 2.30 Voltammogramma relativo alla CV fatta in PBS 0.1 M a pH 7.4 in FeCN 2mM.

In un secondo esperimento si è svolto l'attacco elettrochimico del pir-BA come mostrato in figura 2.31.

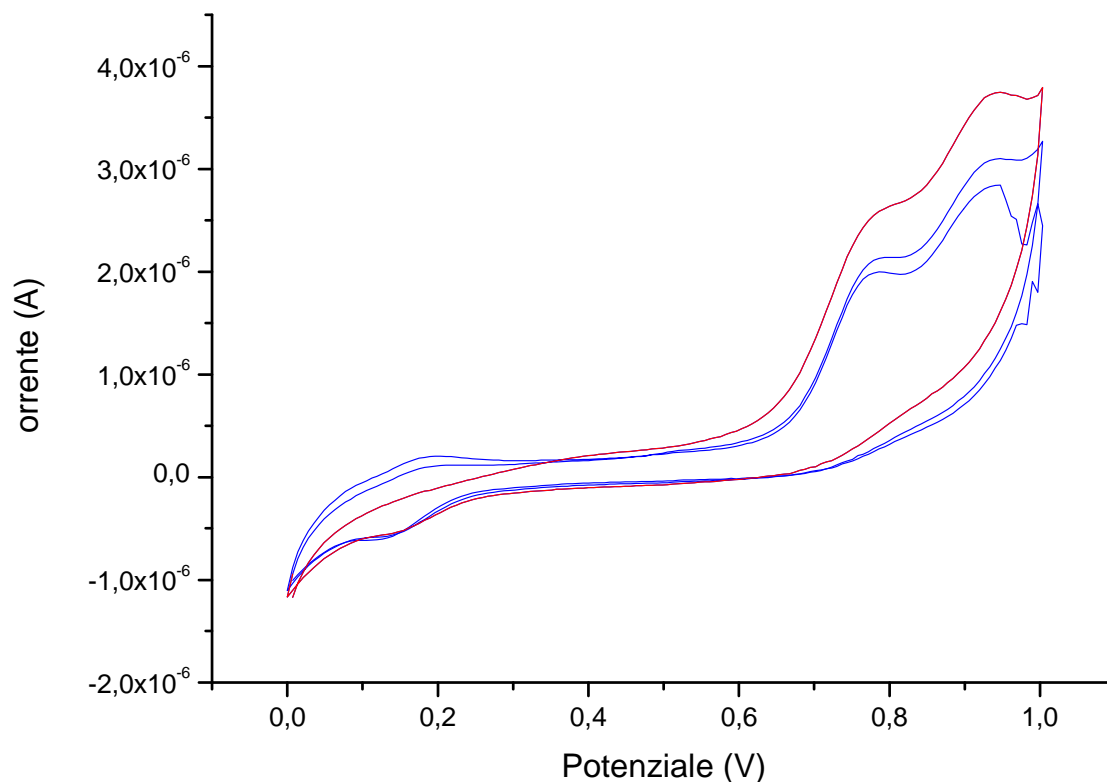


Fig. 2.31 Voltammogramma relativo al grafting del pir-BA.

L'attacco del pirene sulla superficie d'oro non risulta facilmente verificabile mediante CV, per questo motivo è stata sfruttata la spettroscopia Raman come suggerito dalla letteratura¹⁹. Si riporta lo spettro Raman di caratterizzazione di entrambi gli attacchi del pir-BA in figura 2.32.

Si conclude che in entrambi i casi il pir-BA si è legato alla superficie dello SPE in quanto dallo spettro Raman si riconoscono i picchi tipici del pirene a 1400 e 1600 cm^{-1} come suggerisce la letteratura²⁰. L'avvenuto attacco favorirà l'attacco successivo del GO¹⁷.

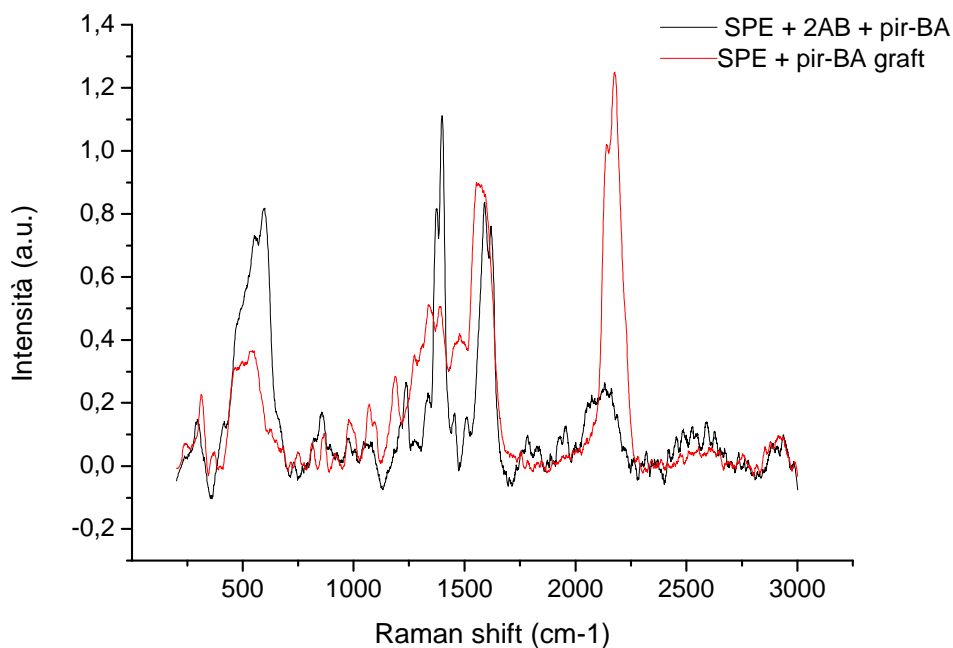


Fig. 2.32 Spettri Raman dello SPE dopo attacco elettrochimico e dopo l'attacco chimico del pir-BA.

2.3.3 Grafting PirBA-PPD

Questo tipo di *grafting* è stato applicato al solo elettrodo SPE perché è stato pensato come evoluzione del *grafting* 2-AB e del *grafting* PPD: si tratta dell'attacco elettrochimico della PirBA-PPD (cfr. 1.1.2), molecola che combina insieme il gruppo amminico della PPD e quello aromatico del pirene. Questa nuova applicazione offre il notevole vantaggio di ottenere in un unico step l'attacco dell'ammina alla superficie d'oro dello SPE e del PirBA che funge anche in questo caso da elemento di collegamento tra lo strato amminico e il grafene ossido. Le condizioni di *grafting* sono molto simili a quelle sopra citate per l'attacco della PPD: si forma un sale di diazonio grazie alla presenza di acido cloridrico in soluzione di *grafting* e avviene l'attacco del PirBA-PPD dopo opportuna polarizzazione. È stato notato che la molecola di PirBA-PPD è poco solubile in acqua debolmente acida e per aumentarne la solubilità si è reso necessario usare una concentrazione maggiore di acido cloridrico rispetto agli altri *grafting* che sviluppano diazonio.

In figura 2.33 si riporta il risultato dato dalla voltammetria ciclica di *grafting*.

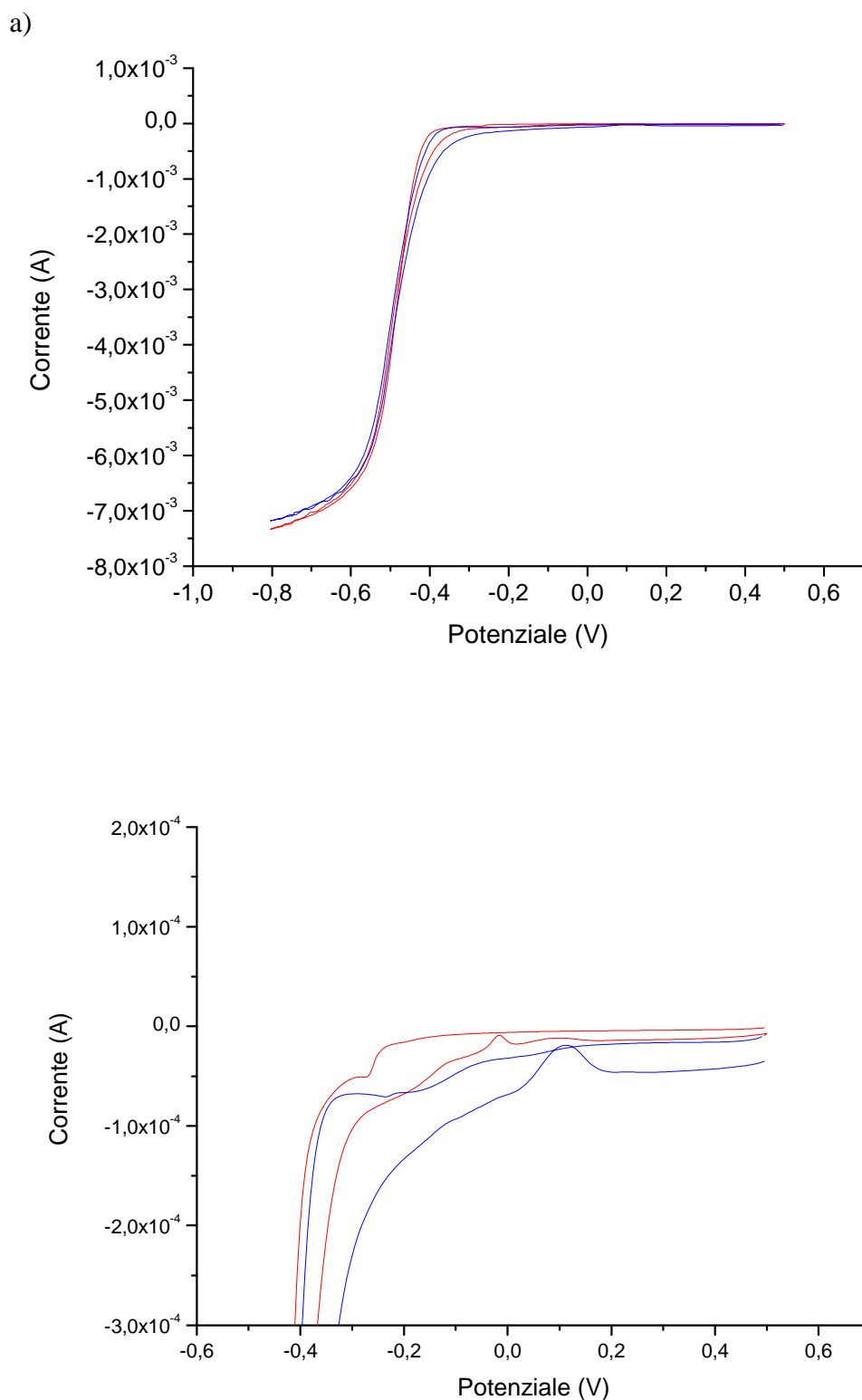


Fig. 2.33 a) Voltammogramma ottenuto dal grafting elettrochimico di PirBA-PPD in soluzione di grafting. In rosso viene evidenziato il primo ciclo di grafting. b) zoom dello stesso voltammogramma di grafting.

Dal grafico si vede che a $0 \text{ V} \div -0.1 \text{ V}$ avviene una riduzione durante la prima scansione di potenziale (curva in rosso), riduzione che persiste anche nel secondo ciclo, a circa 0 V .

Il *grafting* è stato anche caratterizzato mediante le voltammetrie in FeCN come si vede nel grafico di fig. 2.34.

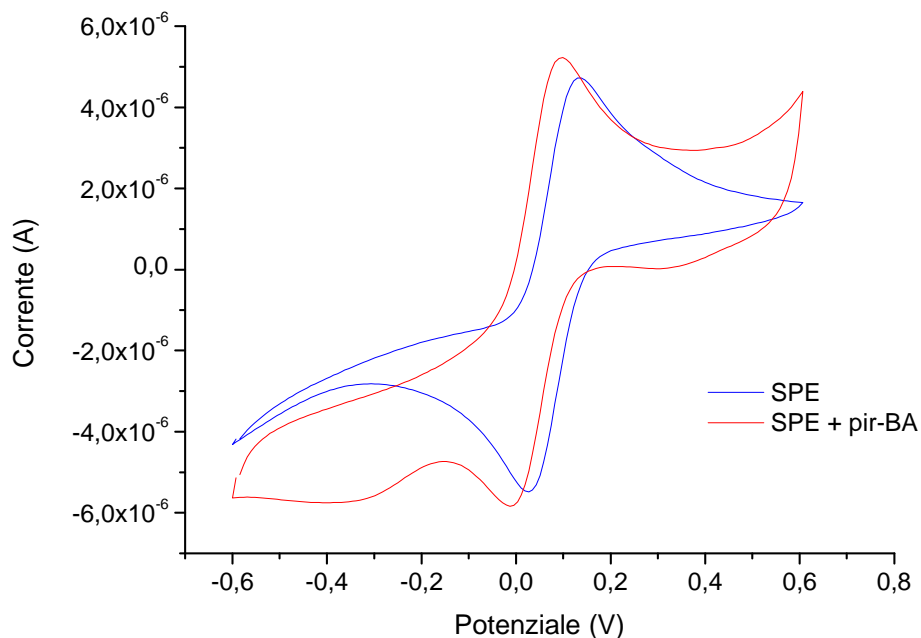


Fig. 2.34 Voltammogramma ottenuto da voltammetria ciclica in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FeCN 2mM. La curva blu si riferisce alla voltammetria fatta sullo SPE pulito, la linea rossa a quella eseguita dopo il *grafting* PyrBA-PPD.

Le voltammetrie cicliche svolte in elettrolita con tracciante FeCN mostrano come il *grafting* con PirBA-PPD non favorisca particolarmente la scarica elettrochimica del tracciante all'elettrodo (curva in rosso) caratterizzata da picchi più accentuati sia in ossidazione che in riduzione, a 0.1 V e 0 V rispettivamente. La superficie elettrodica così modificata risulta quindi meno conduttiva dell'elettrodo d'oro.

2.4 Attacco dell'ossido di grafene (GO) sullo SPE

La superficie dell'elettrodo dorato viene sottoposta ad un attacco chimico di grafene ossido. La scelta di attaccare questo materiale è dovuta alle sue proprietà: il GO contiene gruppi funzionali ossigenati (gruppi carbossilici, epossidi, ossidrilici) che lo rendono disperdibile in soluzione e attivo chimicamente. Inoltre è in grado di formare superfici planari che costituiscono una piattaforma per l'adsorbimento del DNA a singolo filamento (tra cui gli aptameri). La combinazione di queste proprietà con l'alto rapporto superficie/volume tipico

del GO e con la facilità di reperibilità permette l'applicazione del GO per la realizzazione di biosensori elettrochimici.³

Tecnicamente viene applicata una goccia di grafene ossido in sospensione sopra l'elettrodo lavorante; l'operazione è condotta in ambiente umido per evitare che la goccia si secchi. L'elettrodo viene mantenuto a 4° C al buio per 12 ore. Infine viene risciacquato con acqua milli-Q e asciugato con azoto.

Dalle prove fatte in laboratorio si è visto che il GO si deposita in maniera più efficace sopra elettrodi modificati con pyrene. Il PirBA attaccato, sottostante al GO, funge da collegamento tra la superficie dorata e il GO e ne favorisce il deposito in quanto il pirene non è altro che una piattaforma nanometrica di grafene, costituita da quattro anelli aromatici¹⁷.

In tabella 2.2 vengono riportati sinteticamente i risultati ottenuti dalle voltammetrie eseguite per i vari esperimenti svolti con i diversi *grafting*.

Tabella 2.2 *Vengono riportati i dati relativi all'aumento del picco redox in base al picco dello SPE d'oro iniziale ottenuto da CV in FeCN 5mM in PBS 0.1M a Ph 7.4.*

Graft	Aumento altezza picco dopo GO(%)
PANI	16
2AB	4
Pir-BA	27
PirBA-PPD	14
No graft	13

Dalle voltammetrie di caratterizzazione si evince che il GO modifica la conduttività dell'elettrodo in base ai trattamenti ai quali è stato precedentemente sottoposto. Si può notare che il GO si attacca anche alla superficie d'oro pulita, cioè non sottoposta ad attacchi elettrochimici o chimici.

Viene di seguito riportata, come esempio, una voltammetria di caratterizzazione svolta dopo l'attacco del GO su uno SPE che era stato sottoposto ad attacco elettrochimico del pirBA-PPD (fig. 2.35).

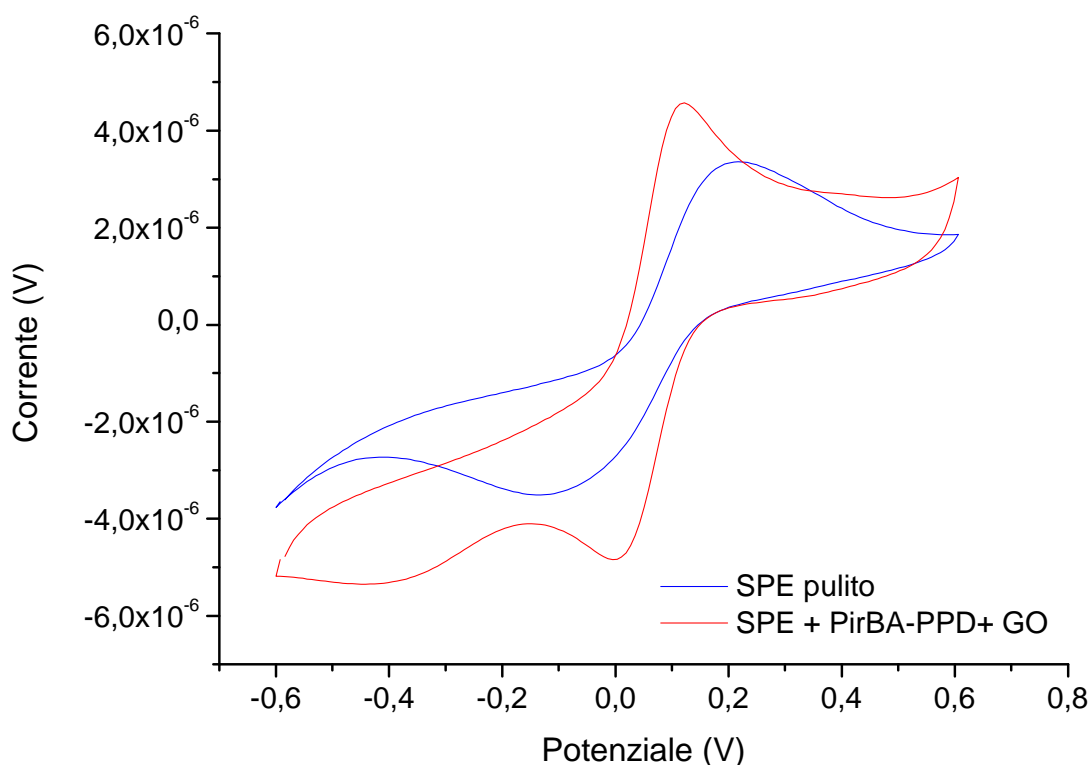


Fig. 2.35 Voltammogramma ottenuto da voltammetria ciclica in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FeCN 2 mM. La curva rossa si riferisce alla voltammetria fatta sullo SPE dopo il grafting PyrBA-PPD, la curva blu è il voltammogramma eseguito dopo l'attacco chimico del GO.

La superficie dell'elettrodo dopo modifica è stata sottoposta a spettroscopia Raman per verificare l'avvenuto attacco del GO. In figura 2.36 viene riportato lo spettro ottenuto dall'analisi di uno SPE dorato ricoperto di GO. Si notano i due picchi caratteristici del GO: a 1300 cm^{-1} si trova il picco tipico della la D-band e a 1600 cm^{-1} si trova quello della G-band. Tipicamente la G-band è più intensa della D-band nello spettro del GO perché quest'ultima è relativa ai difetti presenti nel reticolo. La superficie di GO presenta un maggior numero di gruppi funzionali e quindi meno difetti e infatti il picco più intenso è la G-band²¹. In seguito vedremo che dopo la riduzione del GO l'intensità dei due picchi si invertirà.

L'intensità di questi due picchi verrà presa come riferimento per verificare il successivo processo di elettroriduzione del GO.

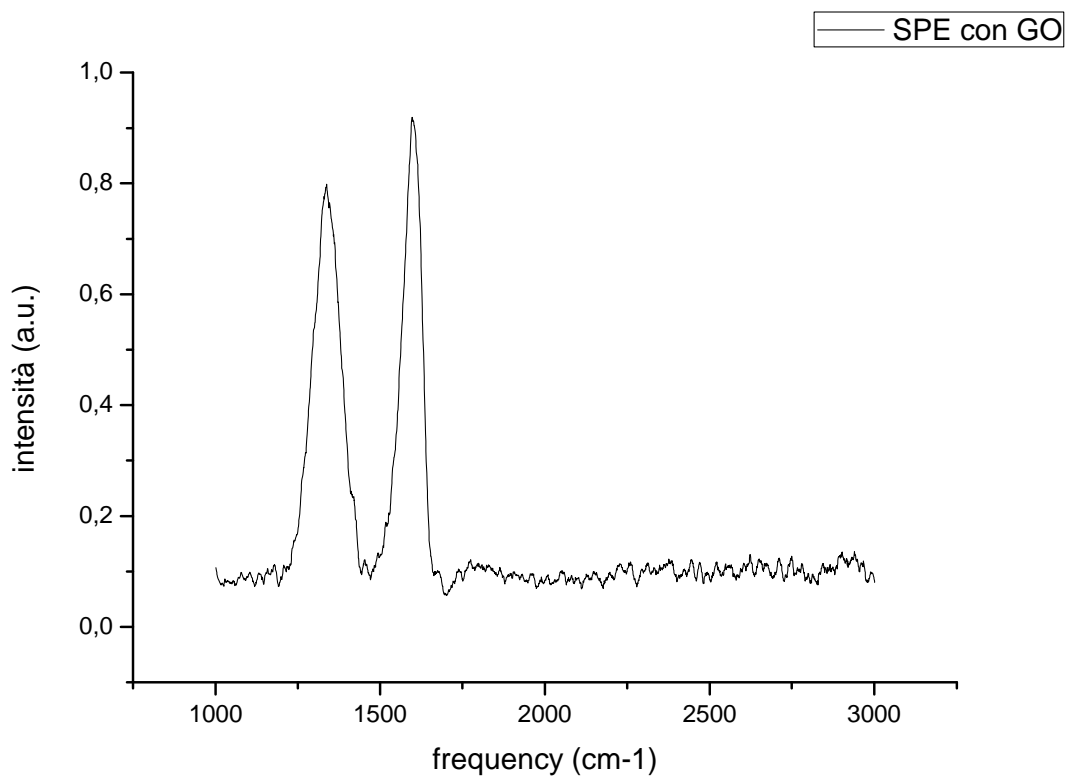


Fig. 2.36 Spettro Raman di uno SPE dopo l'attacco chimico di GO.

Si può quindi concludere che sullo SPE è stato attaccato il GO, come documentato inequivocabilmente dallo spettro Raman oltre che dalle voltammetrie cicliche.

2.5 Riduzione elettrochimica dell'ossido di grafene (erGO)

Per aumentare la conduttività dell'elettrodo lavorante si sottopone la superficie ricoperta di GO ad una riduzione elettrochimica mediante voltammetria ciclica come riportato in figura 2.37.

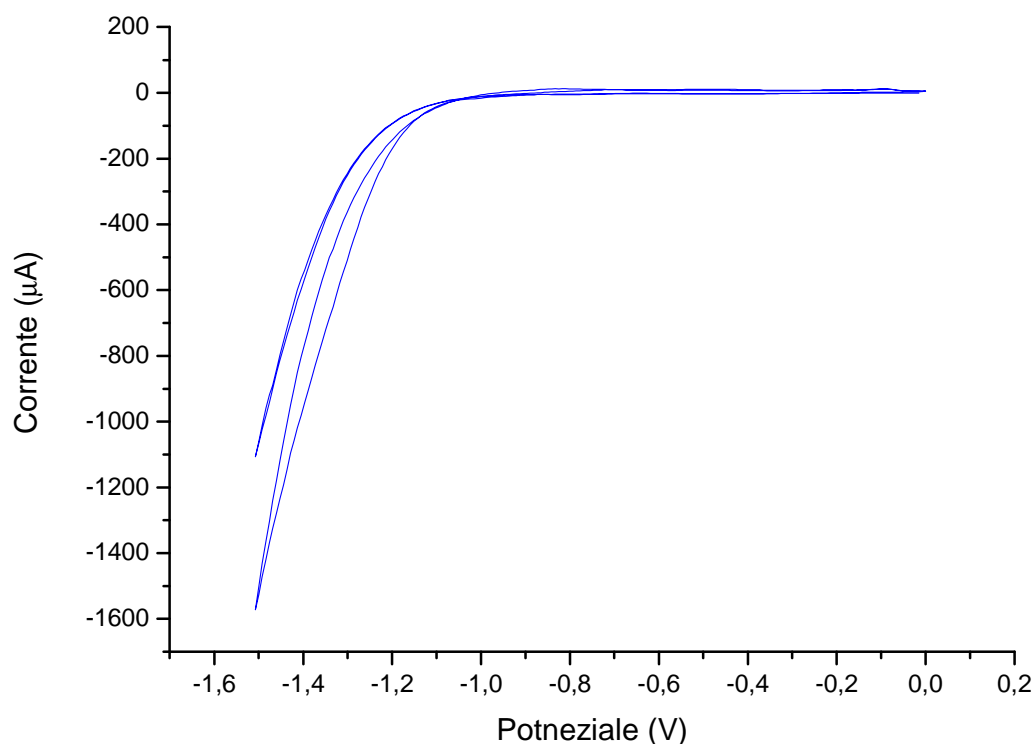


Fig. 2.37 Voltammogramma per ottenere la riduzione elettrochimica del GO. Sono stati svolti due cicli di voltammetria in soluzione acquosa di NaCl 0.5.

La riduzione del grafene ossido avviene tra -1.2 V e -1.4 V, principalmente durante il primo ciclo di voltammetria, come si può vedere dal grafico in figura 2.37 che presenta una spalla in quel range di potenziale. La riduzione consente di eliminare gran parte delle funzioni ossigenate presenti sulla superficie del grafene³ (aldeidi, chetoni, epossidi) lasciando invariata la concentrazione di acidi carbossilici¹¹ che si trovano principalmente sui bordi dei fogli grafenici. Il GO diventa, quindi, erGO (*electrochemically-reduced graphene oxide*).

La riduzione della superficie elettrodica è stata registrata anche mediante le prove di caratterizzazione: le voltammetrie cicliche eseguite in tracciante FeCN dopo lo step di deposito del GO e quelle svolte successivamente alla sua elettroriduzione mostrano un aumento deciso della conduttività superficiale dovuto all'assenza delle specie ossigenate, come confermato dalla letteratura¹¹. L'andamento è riportato in figura 2.38 dove a confronto

viene rappresentato quello della superficie elettrodica ricoperta di GO chimicamente depositato.

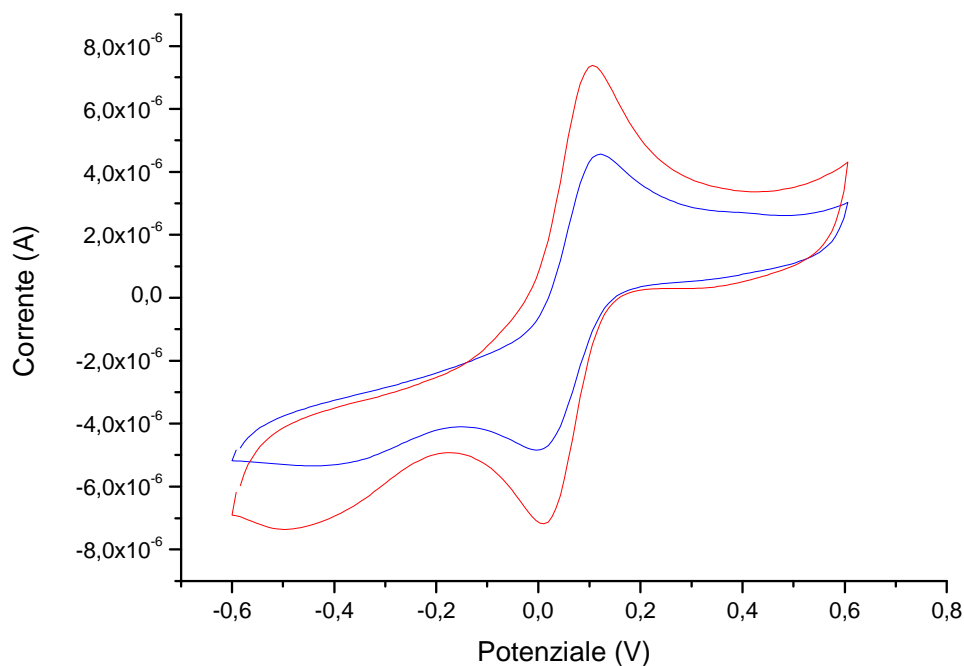


Fig. 2.38 Voltammogramma ottenuto da voltammetria ciclica in PBS 0.1 M a pH 7.4 e FeCN 2mM. La curva blu si riferisce alla voltammetria fatta sullo SPE dopo l'attacco del GO, la curva rossa è il voltammogramma eseguito dopo l'elettroreduzione del GO.

L'elettroreduzione del GO è stata inoltre caratterizzata mediante l'analisi in spettroscopia Raman di cui si riporta lo spettro in figura 2.39. Si nota che i picchi caratteristici della *G-band* e della *D-band* hanno valori di intensità invertiti rispetto allo spettro del GO: il GO presenta un picco di *G-band* più intenso di quello di *D-band*, in accordo con la letteratura¹¹ l'elettroreduzione lo spettro Raman cambia e l'intensità del picco di *D-band* diventa maggiore di quella del picco di *G-band*. Questo fenomeno è spiegato dal fatto che l'elettroreduzione provoca il distacco di molti gruppi funzionali attaccati al GO, lasciando una superficie con più difetti. La *D-band* è proprio il picco caratteristico di tale conformazione, tipica dell'erGO.

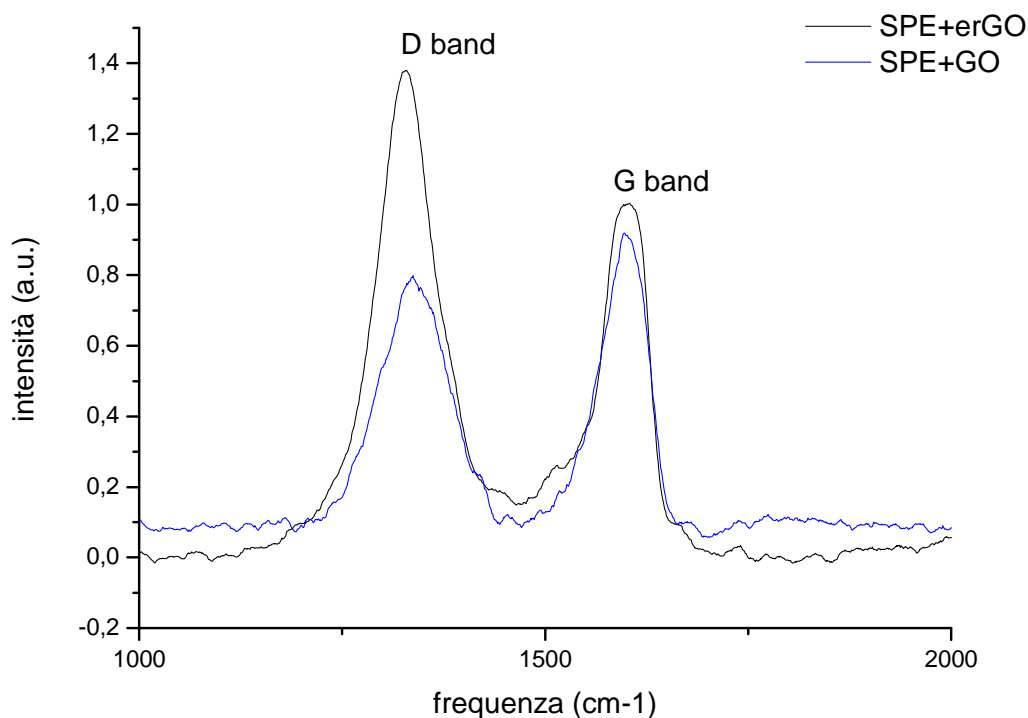


Fig. 2.39 Spettri Raman di SPE con deposito di GO (in blu) e con deposito di GO ridotto elettrochimicamente.

2.5.1 Efficienza del ricoprimento di erGO

I diversi *grafting* applicati allo SPE hanno apportato migliorie alla superficie elettrodica in termini di ricoprimento del grafene ossido: gli elettrodi trattati con *grafting* presentano una conduttività maggiore rispetto agli elettrodi in cui il GO è stato depositato direttamente sull'oro come dimostrano le altezze dei picchi delle misure di CV sintetizzati in tabella 2.3. L'area è stata analizzata con un AFM (microscopio a forza atomica) che ha permesso di valutarne quantitativamente la micro topografia.

Questo fenomeno è legato al fatto che l'area elettrochimica degli SPE modificati con *grafting* è maggiore, come dimostra la scansione della superficie dell'AFM riportata in figura 2.40: confrontando la rugosità dello SPE dorato pulito con quella dello SPE modificato con *grafting* di PirBA-PPD e erGO (fig 2.41) si nota che le asperità della superficie aumentano: lo SPE pulito possiede un'area elettrochimica maggiore del 7% rispetto all'area geometrica mentre lo SPE con PirBA-PPD e erGO ha il 15% in più di superficie rispetto all'area geometrica dell'elettrodo pulito. Sfruttando la legge di Randles-Sevcik (2) è stato possibile calcolare

l'area elettrochimica ottenuta dopo l'elettroriduzione dell'erGO riportata per ogni metodo di *grafting* in tabella 2.3.

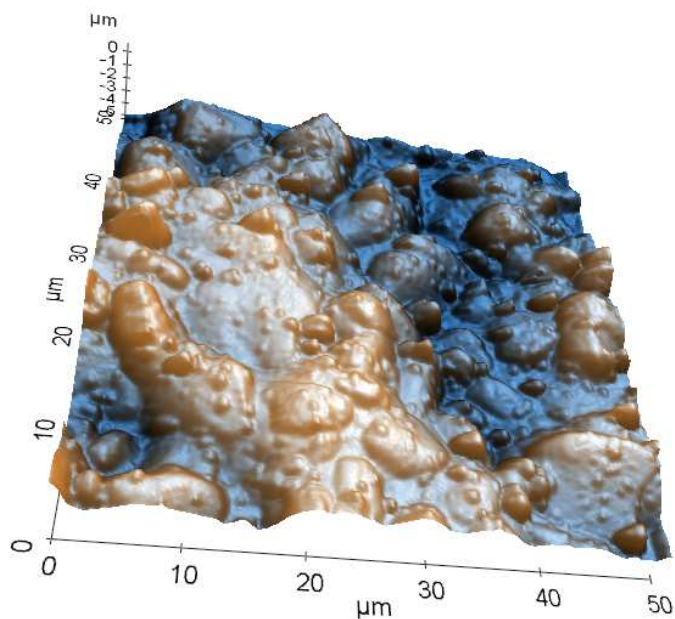


Fig. 2.40 Scansione AFM della superficie di un elettrodo SPE Au/PyrBA-PPD/erGO.

La superficie dello SPE è rugosa come risulta dall'immagine di figura 2.40, ottenuta dalle prove fatte all'AFM.

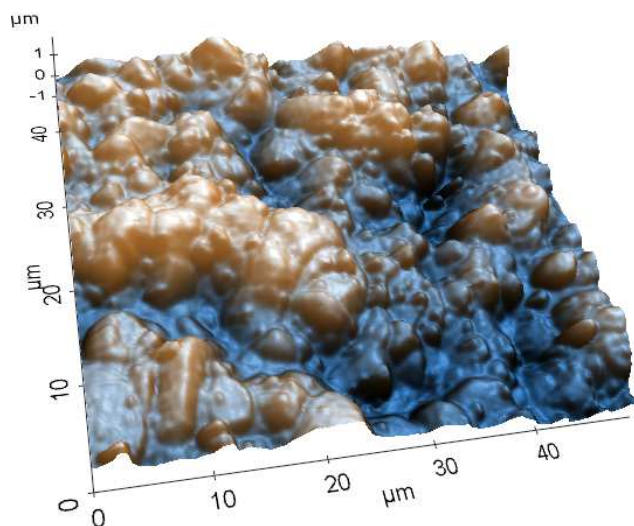


Fig 2.41 Immagine AFM 3D della topografia di un elettrodo PSE pulito.

La rugosità dell'area d'oro misurata dallo strumento è pari a 0.276 μm mentre quella dello SPE modificato con *electrografting* pirBA-PPD e erGO risulta di 0.304 μm . La variazione di rugosità media non è quindi significativa.

Tabella 2.3 La tabella riporta l'area elettrochimica calcolata con la relazione di Randles-Sevcik degli elettrodi modificati con i vari graft e dopo elettroriduzione del GO.

Tipo di grafting	Area elettrochimica (cm^2)	Altezza picco media (μA)
PANI	0.045	7.2 \pm 1.4
2AB	0.051	8.2 \pm 2.3
Pyrene	0.041	6.7 \pm 0.7
PYR-PPD	0.042	6.7 \pm 0.9
No graft	0.033	5.3 \pm 0.1

L'area elettrochimica così ottenuta risulta molto maggiore della superficie geometrica, pari a 0.02 cm^2 e quindi il numero di molecole di aptamero coniugato che potrà adsorbirsi sarà maggiore. Lo SPE non modificato con il *grafting* presenta l'area elettrochimica minima, pari a 0.033 cm^2 mentre tutti gli SPE modificati con procedure elettrochimiche mostrano un valore di area elettrochimica almeno doppio rispetto all'area geometrica teorica dell'elettrodo.

Tali risultati evidenziano l'importanza non solo del trattamento di grafting ma anche di una sua ottimizzazione.

Dopo le modifiche subite, l'elettrodo presenta caratteristiche elettrochimiche molto diverse dallo SPE dorato di partenza. Una dimostrazione viene presentata dalle prove di caratterizzazione in CV svolte in presenza di tracciante FeCN dopo ogni step di modifica, come riportato in figura 2.42.

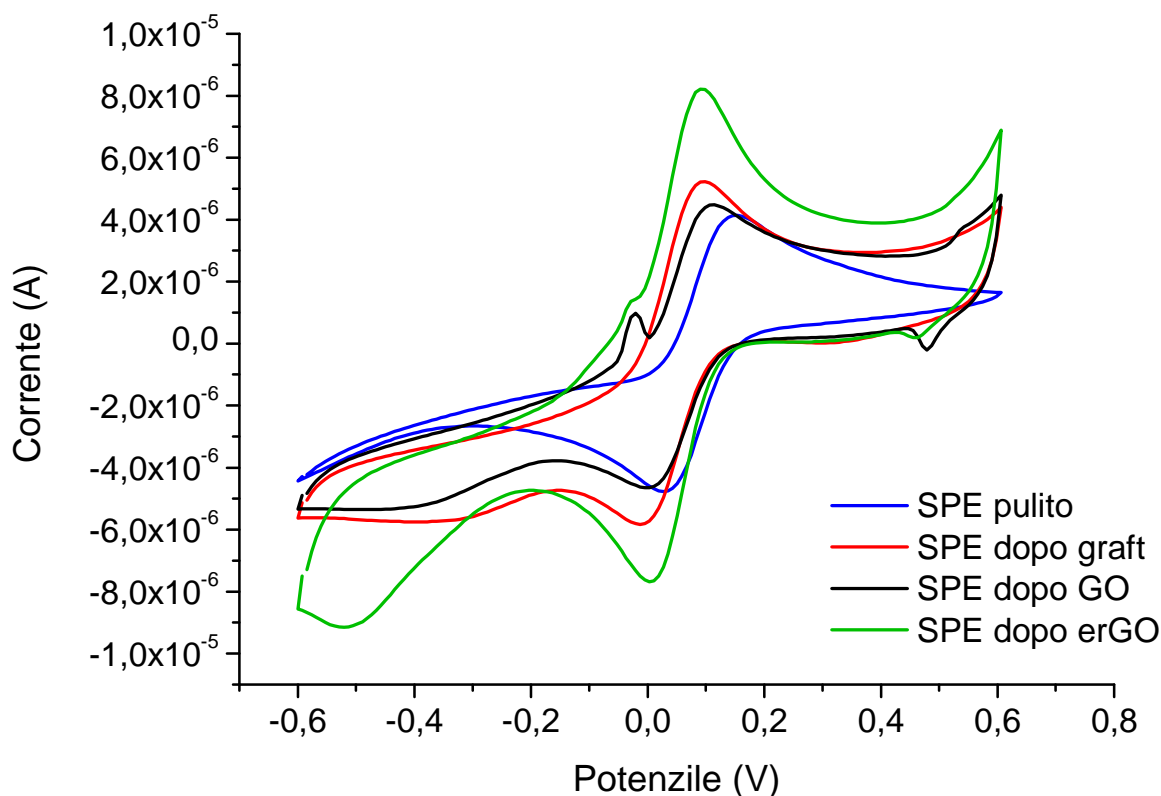


Fig. 2.42 Grafico riassuntivo delle varie fasi di modifica: in blu viene riportato il voltammogramma dello SPE pulito, in rosso quello dopo grafting PirBA-PPD, in verde quello dopo l'attacco del GO e in nero quello dopo l'elettroreduzione del GO.

2.6 Rilevamento dell'insulina

Per completare la realizzazione del sensore elettrochimico per il rilevamento di insulina è necessario attaccare un elemento sensibile a tale proteina, l'IBA¹¹ (*insulin-binded aptamer*).

Per aumentare il segnale elettrochimico dell'IBA, questo oligonucleotide viene coniugato all'antrachinone, una molecola redox attiva. Per ottimizzare l'aumento del segnale si è deciso di legare all'antrachinone⁷ entrambi gli estremi del l'IBA ottenendo un composto bi-coniugato (fig 1.3).

L'aptamero bi-coniugato all'antrachinone, denominato IBA-AQ, viene fatto adsorbire sulla superficie modificata dell'elettrodo. In presenza di insulina l'aptamero si lega alla molecola target.

Il legame insulina-aptamero è più forte del legame insulina-erGO e questo fa sì che l'aptamero si desorba in presenza dell'insulina⁷ (fig 2.43).

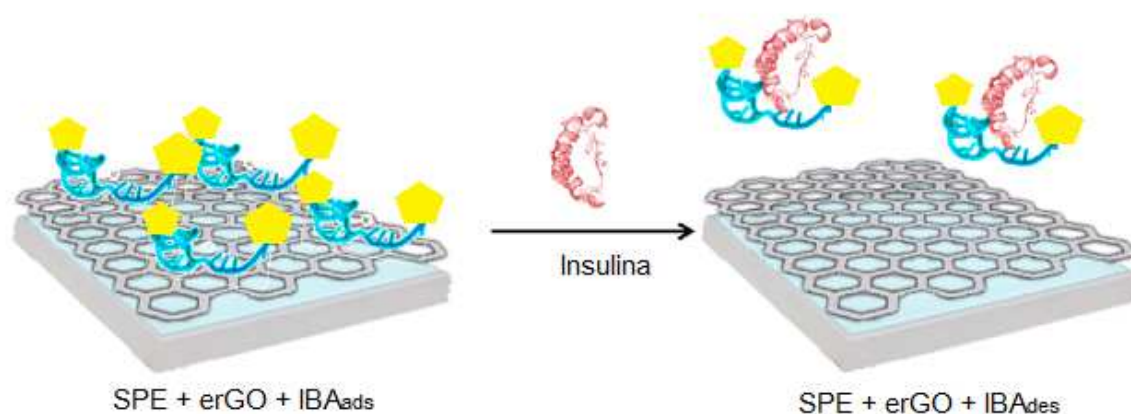


Fig. 2.43 Schema di processo di adsorbimento e desorbimento dell'aptamero IBA-AQ sullo strato di erGO.

2.6.1 Adsorbimento dell'aptamero sull'elettrodo lavorante

Lo SPE dorato graftato, modificato con il GO ridotto elettrochimicamente è stato sottoposto all'attacco chimico dell'aptamero sensibile all'insulina: l'IBA (*insulin-binding aptamer*).

Questo oligonucleotide non è però facilmente rilevabile elettrochimicamente, quindi è stato necessario sintetizzare una nuova molecola composta dall'IBA e da un componente redox attivo. In particolare è stato scelto l'antrachinone come molecola elettrochimicamente reattiva. Tecnicamente l'aptamero è stato legato covalentemente a due molecole di antrachinone ottenendo un composto bi-coniugato (1.3). Infine l'oligonucleotide legato alla specie redox-attiva è stato depositato chimicamente sull'elettrodo SPE modificato.

La scelta di usare un oligomero disostituito è dettata dal fatto che presenta una quantità di antrachinone doppia rispetto a quella che si avrebbe per un aptamero mono sostituito e quindi il segnale elettrochimico restituito dovrebbe essere maggiore. Questa fase di preparazione e caratterizzazione dell'elettrodo è stata indagata con voltammetrie ad onda quadra (SWV). L'uso di questa tecnica elettrochimica è richiesto dalle condizioni di lavoro che hanno previsto concentrazioni estremamente basse di insulina da rilevare.

Dalla prove di SWV si riscontra, dopo l'attacco dell'aptamero coniugato, la presenza di un picco a -0.47 V ⁷, potenziale di scarica tipico dell'antrachinone (fig. 2.44), a conferma della presenza dell'aptamero sulla superficie dell'elettrodo. Le prove di caratterizzazione sono state eseguite in PBS a pH 5.1 perché in tali condizioni l'antrachinone risulta più stabile²².

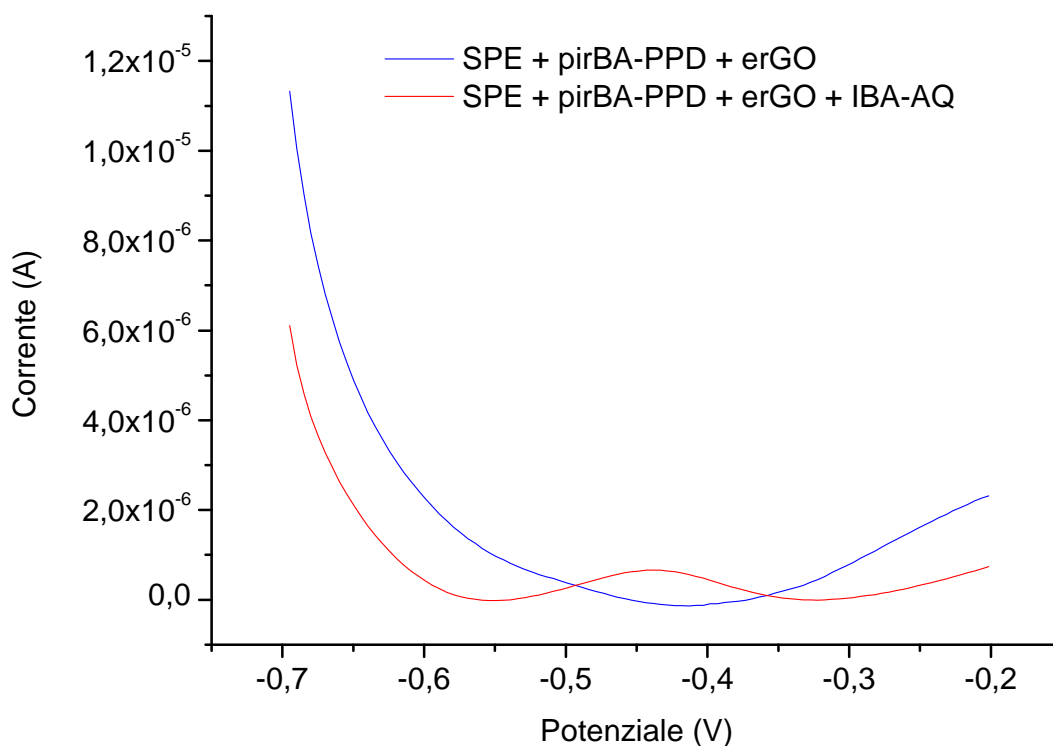


Fig. 2.44 Voltammogramma della SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di un elettrodo Au/PyrBA-PPD/erGO (curva blu) e di un elettrodo modificato Au/PirBA-PPD/erGO/IBA-AQ (curva rossa).

È stato inoltre verificato che l'elettrodo modificato con *grafting* PyrBA-PPD e erGO presenta un ricoprimento di aptamero maggiore rispetto a quello ottenuto sullo SPE direttamente ricoperto di erGO. L'incremento registrato è pari al 30%, come evidenziato in figura 2.45.

Questo risultato dimostra che il trattamento con *grafting* elettrochimico incide favorevolmente anche sul ricoprimento dell'aptamero sulla superficie dello SPE, confermando il ruolo fondamentale di tale step di modifica nel processo di fabbricazione del sensore. Tale step risulta quindi necessario per ottenere un ricoprimento ottimizzato.

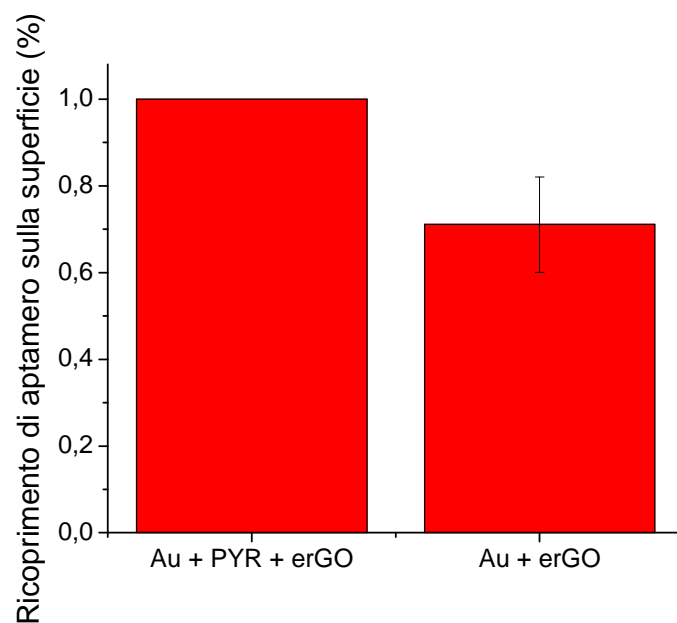


Fig. 2.45 Ricoprimento di aptamero sullo SPE d'oro precedentemente sottoposto a grafting pirBA-PPD e erGO e sullo SPE direttamente ricoperto di erGO.

Per completezza in figura 2.46 si riporta la SWV di caratterizzazione dell'elettrodo SPE dopo l'attacco dell'erGO e dopo l'attacco dell'aptamero bi-coniugato.

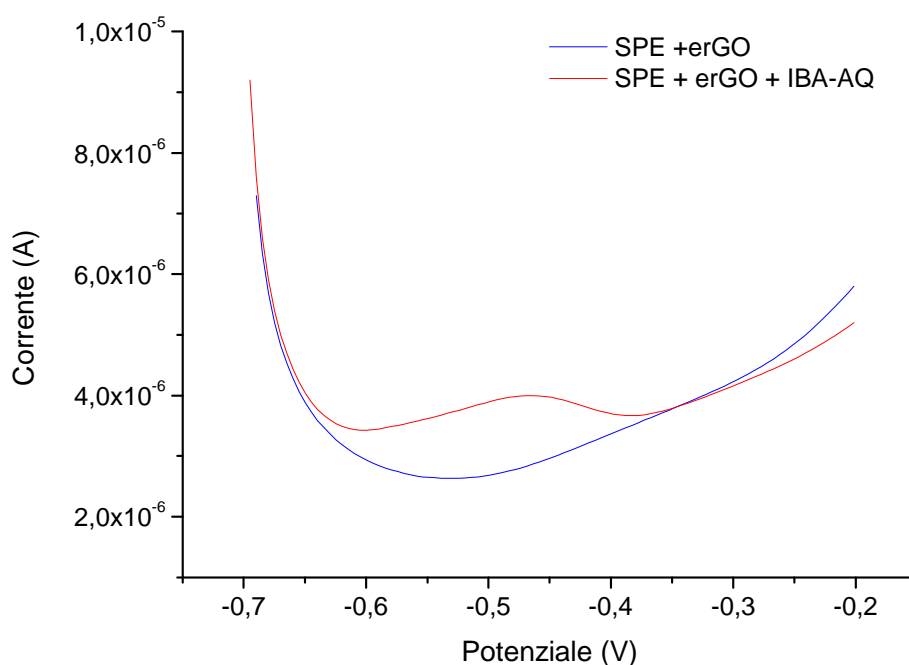


Fig. 2.46 Voltammogramma della SWV in PBS 0,1 M a pH 5,1 di un elettrodo Au/erGO (curva blu) e di un elettrodo modificato Au/erGO/IBA-AQ (curva rossa).

Successivamente, si è analizzato il comportamento dello SPE con erGO e IBA-AQ nei confronti dell'insulina: si osserva che questo elettrodo modificato è meno sensibile dello SPE funzionalizzato con pirBA-PPD, ricoperto di erGO e IBA-AQ come mostra il grafico in figura 2.47. Mettendo questi due elettrodi modificati a contatto con una soluzione di insulina 0.1 nM si riscontra la caduta di segnale elettrico dalle SWV di caratterizzazione: l'aptamero si lega all'insulina e si desorbe dall'area elettrodica. Utilizzando dosi più concentrate di insulina il sensore erGO/IBA-AQ non risponde più mentre lo SPE/pirBA-PPD/ erGO/IBA-AQ risponde e si vede un progressivo calo del segnale all'aumentare della concentrazione d'insulina.

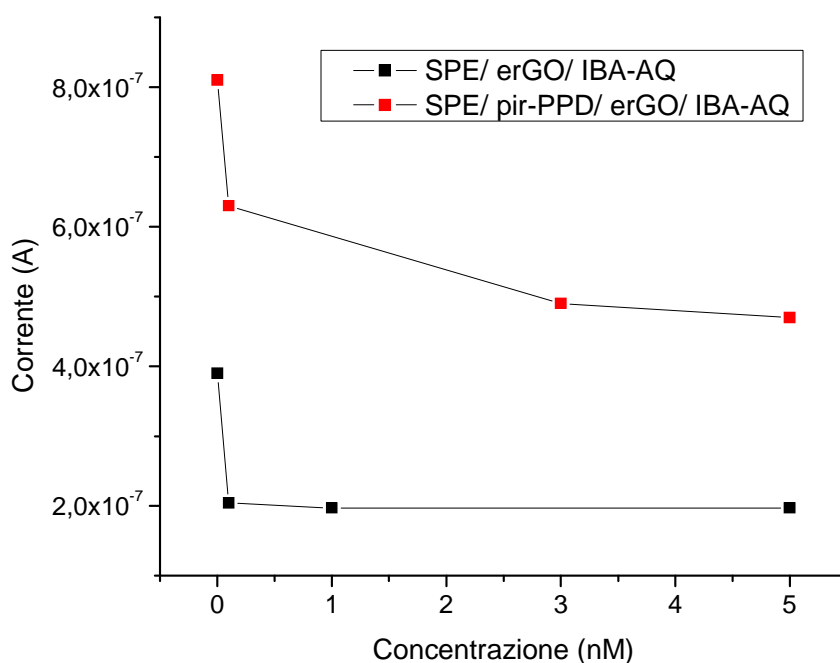


Fig. 2.47 Confronto tra la risposta all'insulina dell sensore SPE/pirBA-PPD/ erGO/IBA-AQ e SPE/ erGO/IBA-AQ.

In aggiunta è stato verificato l'attacco dell'IBA-AQ allo SPE/GO e all'oro dello SPE. Di seguito vengono riportati le SWV di caratterizzazione per questi attacchi (fig. 2.48 e 2.49). Il trattamento di attacco dell'aptamero direttamente sulla superficie d'oro dello SPE è stato realizzato lasciando in contatto l'IBA coniugato con lo SPE per 30 minuti, come da protocollo. Successivamente è stata svolta la prova di caratterizzazione mediante SWV (fig. 2.48) e il voltammogramma ottenuto permette di concludere che non è avvenuto l'attacco dell'IBA-AQ in quanto non si registra il picco caratteristico del chinone.

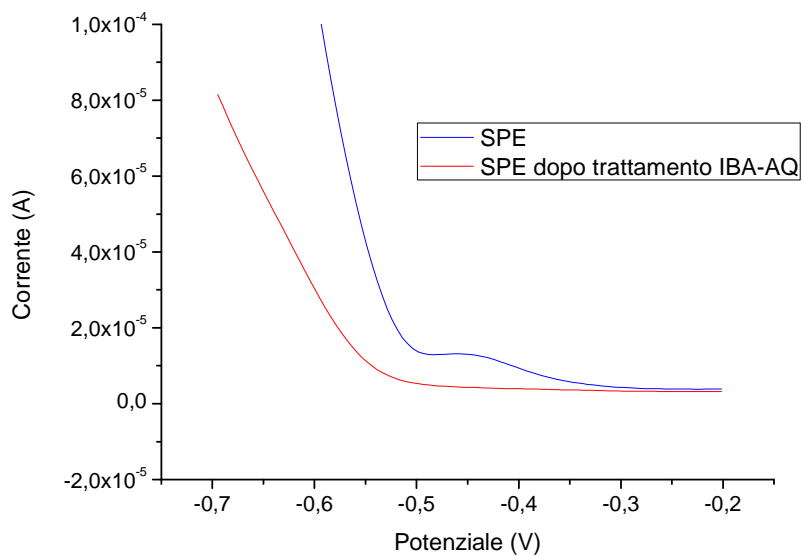


Fig. 2.48 Voltammogramma della SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di un elettrodo SPE prima e dopo l'attacco IBA-AQ.

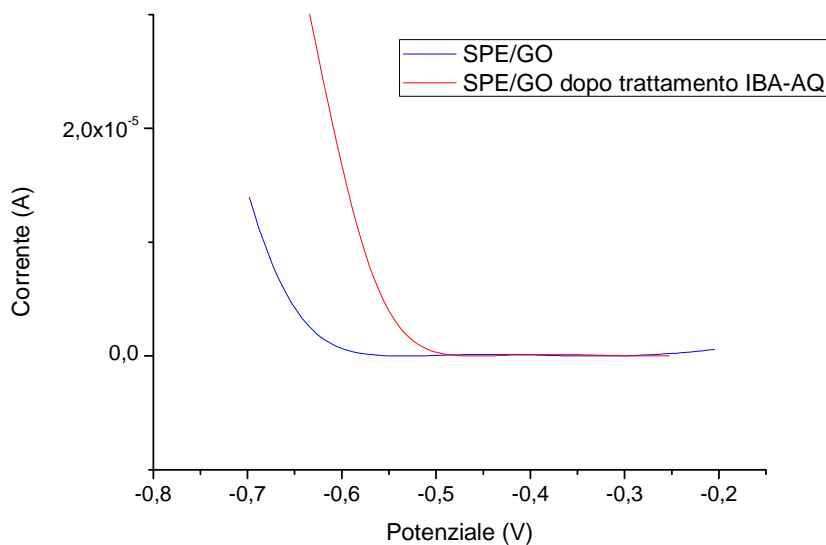


Fig. 2.49 Voltammogramma della SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di un elettrodo SPE/GO prima e dopo l'attacco IBA-AQ.

I risultati ottenuti confermano che tutte le fasi di modifica apportate sulla superficie d'oro dello SPE sono necessarie per ottenere il biosensore ottimizzato per il rilevamento di insulina. Si dimostra qui la necessità di tali modifiche.

2.6.2 Metodo di rilevamento dell'insulina

In presenza di insulina si genera un legame tra l'aptamero e la suddetta proteina, quindi questo complesso si stacca dalla superficie elettrodica e va in soluzione. Tale fenomeno causa la diminuzione del segnale di corrente elettrica scaricata all'elettrodo perché si riduce la quantità di antrachinone legato sulla sua superficie. Grazie alla presenza dell'antrachinone è possibile monitorare meglio la presenza dell'IBA-AQ sulla superficie e di conseguenza il rilevamento. Il metodo di misurazione della concentrazione di insulina è quindi indiretto e si basa sul legame tra oligonucleotide-antrachinone e insulina.

Per misurare la quantità di insulina presente in un campione è stata sfruttata la SWV indagando un range di potenziale compreso tra -0.7 V e -0.2 V.

2.6.3 Calibrazione del biosensore

Lo studio del biosensore si è quindi rivolto al comportamento dell'aptamero nei confronti di concentrazioni diverse di insulina. Al fine di procedere alla calibrazione degli SPE modificati Au/PyrBA-PPD/erGO/IBA-AQ, sono state utilizzate aliquote a concentrazioni comprese tra 0 e 1 μM di insulina. Lo SPE è stato posto in contatto con insulina a concentrazione crescente. Dopo ogni prova è stata misurata la riduzione del picco caratteristico dell'antrachinone mediante prove di SWV ottenendo gli andamenti riportati in figura 2.50.

L'elaborazione dei dati restituisce un intervallo di risposta lineare del sensore compreso tra 0 e 10 nM di insulina in soluzione, come si vede dal grafico proposto in figura 2.51.

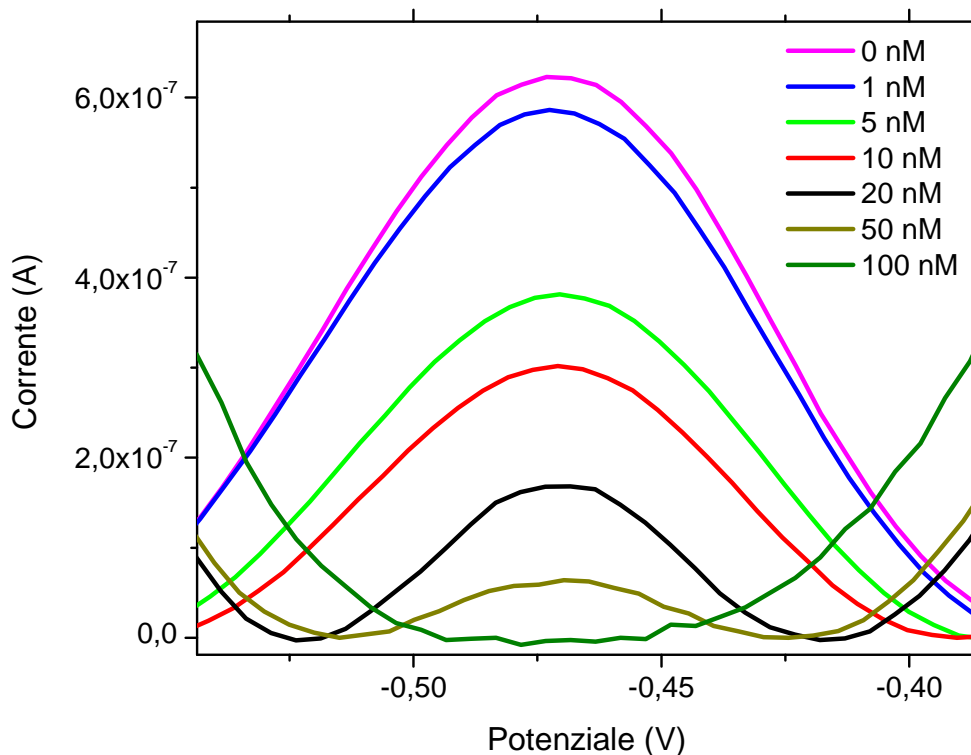


Fig 2.50 Il grafico riporta l'andamento dell'altezza del picco ottenuto da SWV PBS a pH 5.1 eseguite sullo SPE dorato/graft pirBA-PPD/erGO/apt-AQ all'aumentare della concentrazione delle aliquote di insulina alle quali lo SPE è stato sottoposto.

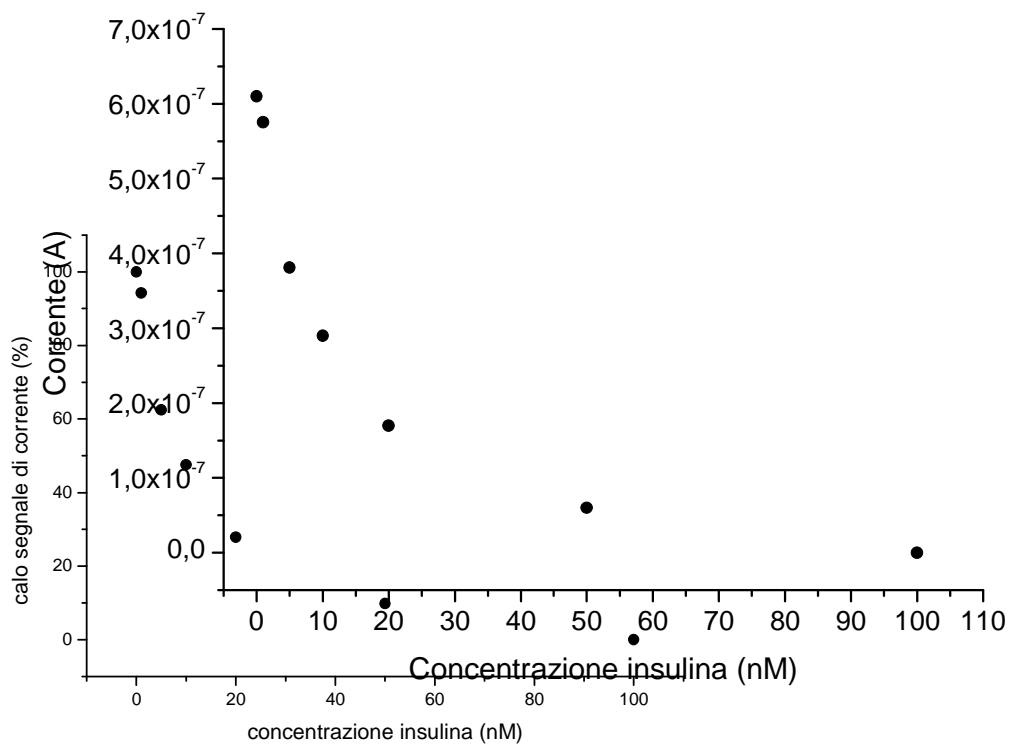


Fig. 2.51 grafico rappresenta l'andamento normalizzato della diminuzione di segnale elettrochimico all'aumentare della concentrazione di insulina alla quale il biosensore è stato sottoposto, in riferimento ai dati riportati in fig 2.50

2.6.4 Effetto degli interferenti

L'insulina, in condizioni reali, si trova nel sangue in presenza di molte altre molecole con struttura simile, come ad esempio le citochine. Risulta quindi importante verificare il comportamento dell'aptamero IBA-AQ a contatto con molecole interferenti presenti nell'ambiente fisiologico in cui si ritrova l'insulina. Per indagare la specificità dell'aptamero, sono state condotte prove sperimentali usando interferenti suggeriti dalla letteratura^{1,8}. In particolare sono state scelte come interferenti specie chimiche biologicamente simili all'insulina o potenzialmente presenti nell'ambiente di rilevamento, quali: BSA e BMP4.

Tali molecole, sciolte in soluzioni di identica concentrazione, pari a 10 ng/mL, sono state messe a contatto con la superficie elettrodica una alla volta. Infine è stata applicata una soluzione equimolare di insulina per verificare quanto aptamero si fosse staccato dalla superficie dello SPE. È stata scelta questa concentrazione per osservare l'effetto degli interferenti in quanto è all'interno del range di rilevabilità del biosensore.

L'osservazione dell'attacco-stacco dell'aptamero coniugato è stata attuata attraverso misure in SWV seguendo l'abbassamento del picco caratteristico dell'antrachinone. L'istogramma in figura 2.52 illustra sinteticamente i risultati ottenuti dalle prove con gli interferenti.

In particolare risulta che la BSA è stata rilevata come interferente dell'IBA-AQ perché produce un crollo del picco redox dell'IBA-AQ pari al 14%, come si vede in figura 2.53.

Per quanto riguarda la BMP4 è stata osservata una diminuzione molto più blanda del picco caratteristico, pari al 2% del valore iniziale, come indicato in figura 2.54.

Infine si riporta la prova fatta in SWV con una soluzione equimolare di insulina: il segnale dell'IBA-AQ si riduce del 20% come si può osservare in figura 2.55.

Si conclude che l'aptamero IBA in questione risulta sensibile anche ad altre molecole. Si rende quindi necessario uno studio più approfondito sull'aptamero con l'obiettivo di selezionarne uno con maggior selettività nei confronti dell'insulina.

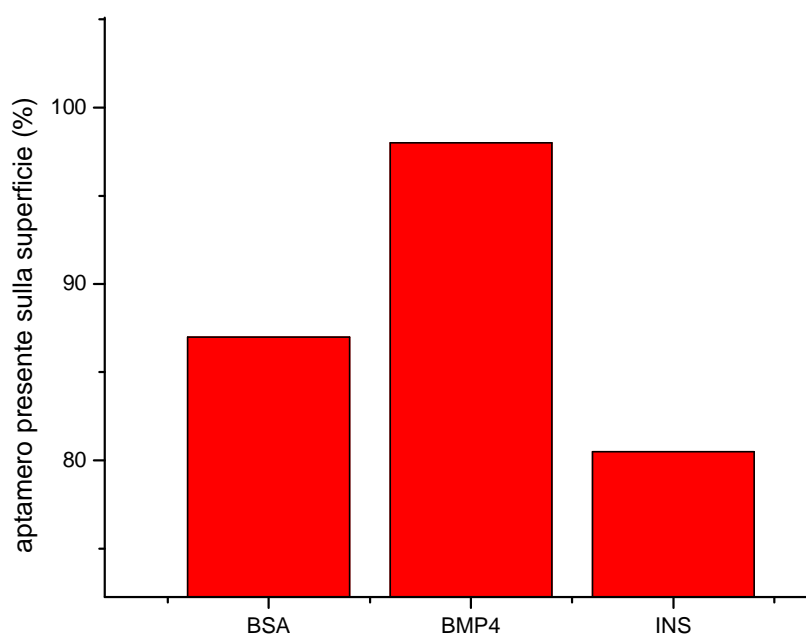


Fig. 2.52 Diminuzione del picco caratteristico dell'IBA-AQ per le varie prove svolte con interferenti.

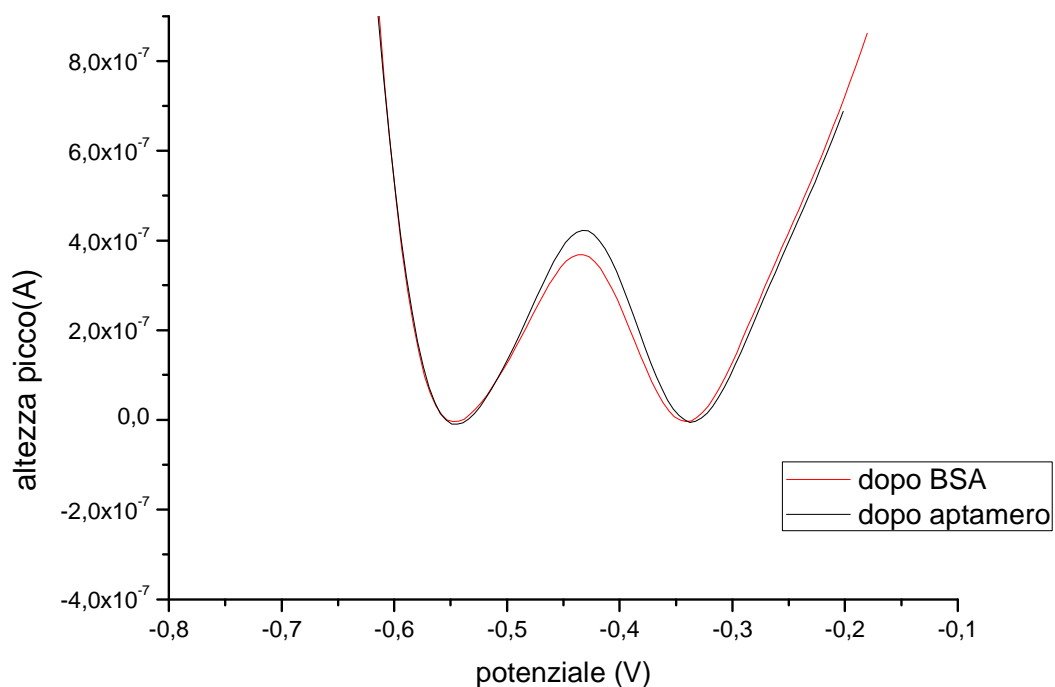


Fig. 2.53 SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ (nero) e di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ dopo l'attacco della BSA (curva rossa).

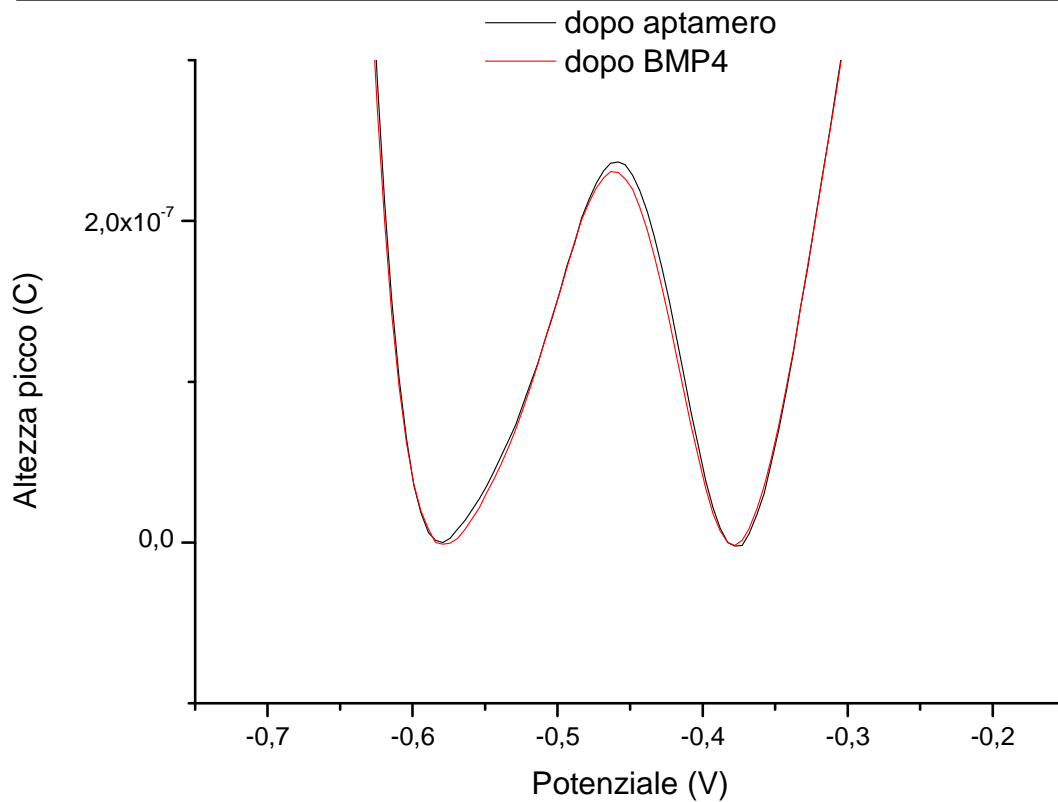


Fig. 2.54 SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ (nero) e di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ dopo l'attacco dell'insulina (curva rossa).

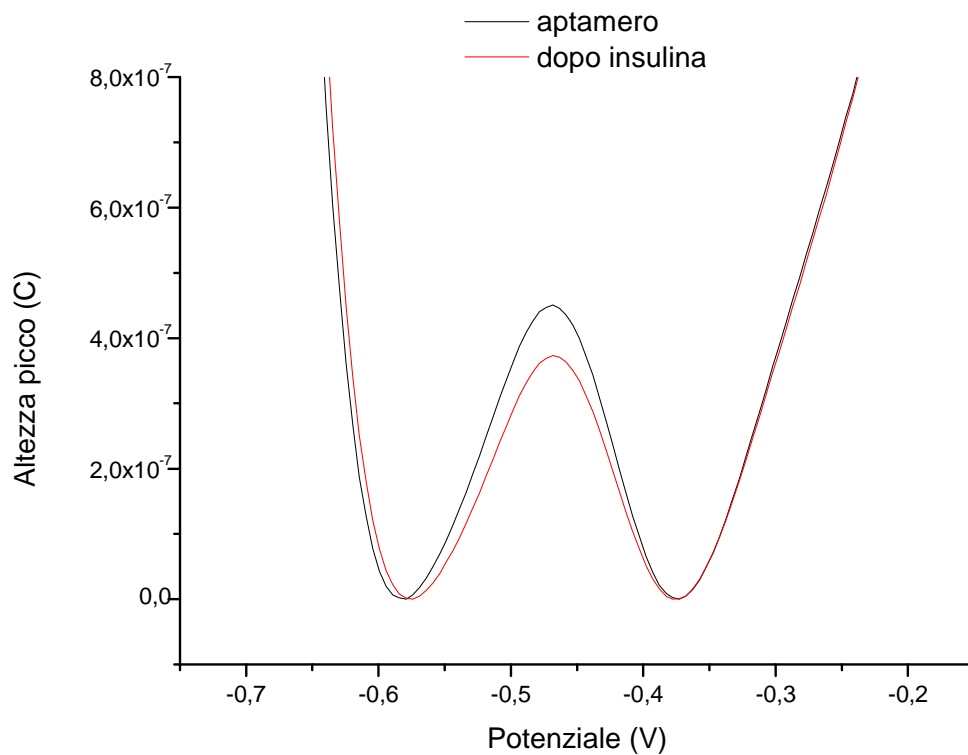


Fig. 2.55 SWV in PBS 0.1 M a pH 5.1 di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ (nero) e di SPE dorato/graft pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ dopo l'attacco della BMP4 (curva rossa).

2.6.5 Rigenerazione del sensore

Il sensore funziona grazie al fenomeno di rimozione dell'aptamero dalla superficie in presenza di insulina. È quindi evidente che per essere riutilizzato il sensore va rigenerato. Lo SPE è stato sottoposto a prove di rigenerazione e sono state individuate due diverse metodologie: una rigenerazione per via elettrochimica e una rigenerazione per via biochimica. La prima rigenerazione viene attuata mediante l'esecuzione di una SWV ripetuta quattro volte tra i potenziali 0.4 V e 0.8 V, proposta in figura 2.56. In questo modo si ottiene l'ossidazione della guanina, amminoacido riccamente presente nella struttura dell'aptamero, che avviene al potenziale di circa 0.6 V²³. L'ossidazione della guanina produce la rottura dell'aptamero e il suo consequenziale distaccamento dalla superficie elettrodica. In questo modo si ottiene un elettrodo pulito dall'aptamero e la superficie torna ad essere di erGO. Questa metodologia di rigenerazione ha il vantaggio di essere una tecnica molto veloce ed efficace ma risulta piuttosto aggressiva nei confronti degli strati inferiori dell'elettrodo. Questo viene dimostrato dal fatto che il ricoprimento di aptamero cala col procedere dei cicli di rigenerazione, come mostrato nel grafico di figura 2. 57. La rigenerazione un tempo dell'ordine delle decine di secondi, comparabile con il tempo necessario allo svolgimento della SWV.

L'effetto che ha questo trattamento sullo SPE è stato indagato anche attraverso misure Raman. Nello spettro eseguito prima della rigenerazione, riportato in figura 2.58, si notano chiaramente i picchi del pir-BA collocati tra la G band e la D band del GO e alle frequenze di circa 1200 cm⁻¹. Dopo la SWV di rigenerazione i picchi del pir-BA non sono più così evidenti, questo potrebbe voler dire che le scansioni compromettono alcuni legami esistenti negli strati sottostanti all'aptamero sulla superficie dello SPE.

La seconda metodologia di rigenerazione prevede il deposito di insulina sullo SPE Au/pirBA-PPD/erGO/apt-AQ per 10 minuti ed il successivo deposito di aptamero bi coniugato. Questa seconda opzione di rigenerazione è molto più lenta in quanto è necessario lasciar reagire l'insulina sulla superficie elettrodica. Un secondo svantaggio è il probabile adsorbimento di insulina sulla superficie dello SPE con un successivo disturbo delle misure nelle fasi seguenti.

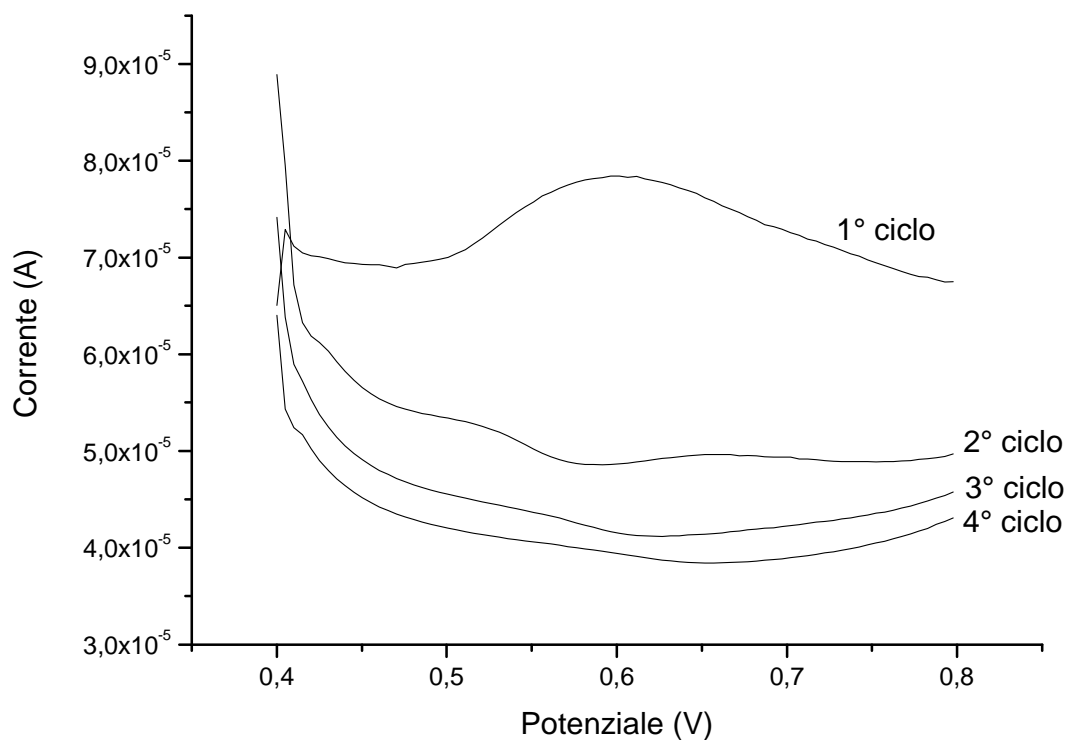


Fig. 2.56 SWV in PBS 0.1M a pH 5.1. I quattro cicli di SWV sono necessari per strappare l'aptamero dalla superficie dello SPE.

In figura 2.57 si riporta il grafico riassuntivo dei due metodi adottati.

Si nota che dopo più tentativi di rigenerazione biochimica il segnale elettrochimico dell'IBA-AQ ridepositato sulla superficie dello SPE assume valori simili. Questo significa che non si forma un multistrato di aptamero e il sensore può essere quindi riutilizzato. Invece per quanto riguarda la rigenerazione elettrochimica seriale dopo ogni ciclo di rigenerazione la quantità di aptamero che viene ridepositata sullo SPE cala.

Si conclude quindi che entrambi i metodi di rigenerazione presentano vantaggi e svantaggi e vanno quindi utilizzati in base alle esigenze di misura.

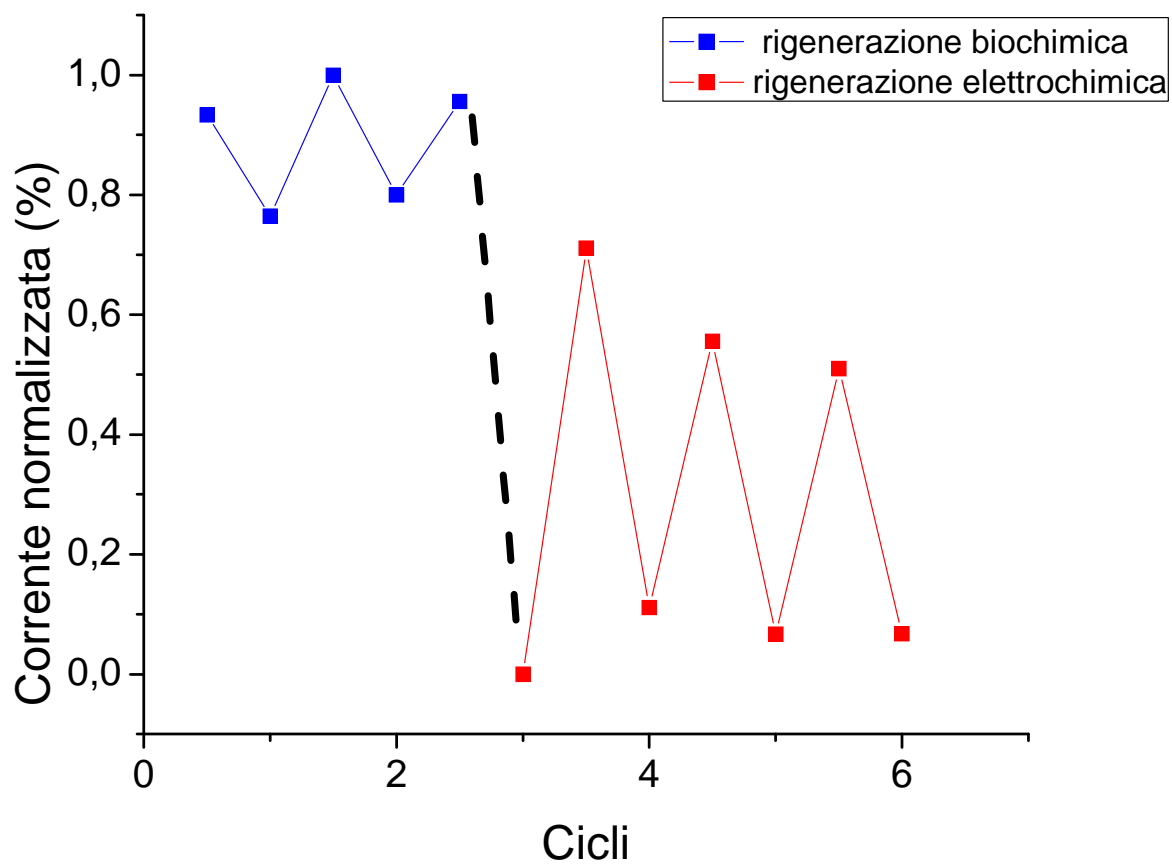


Fig. 2.57 Il grafico riporta i cicli di rigenerazione del biosensore. Ogni ciclo inizia con il deposito di aptamero per via chimica.

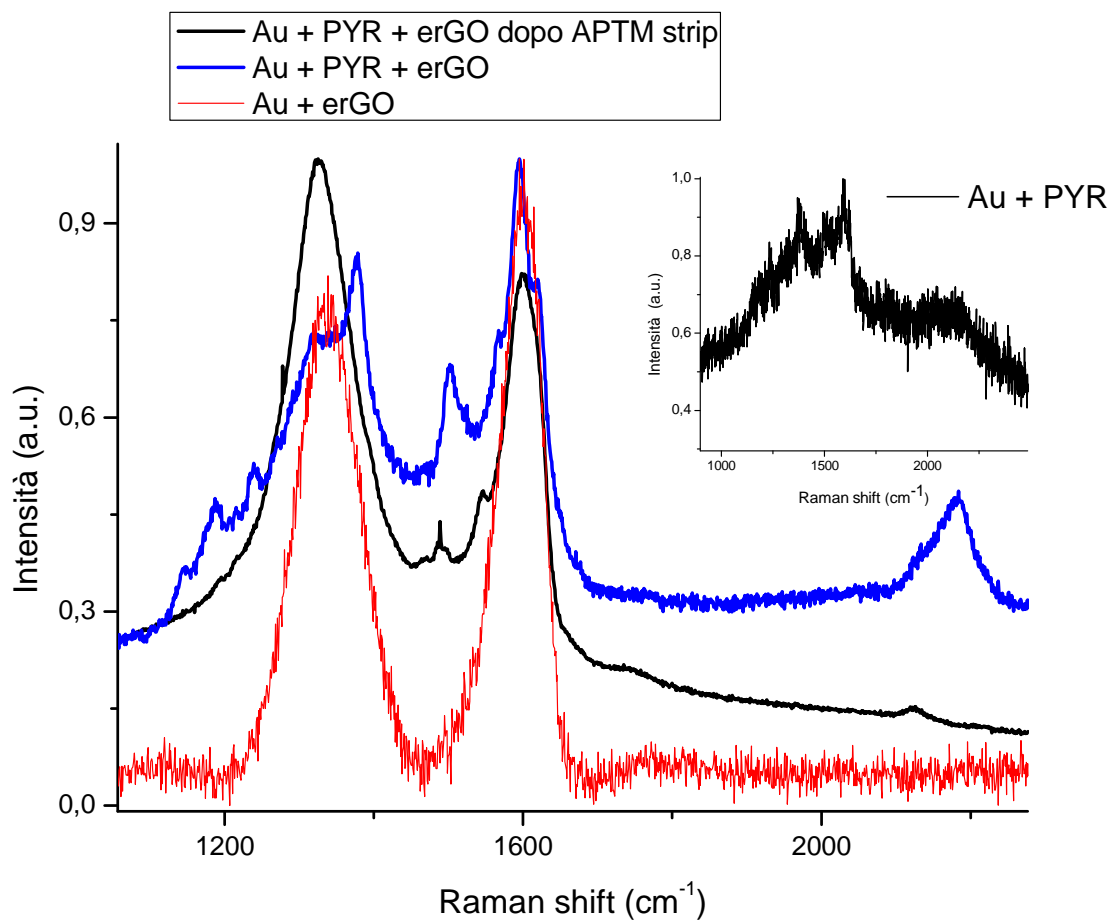


Fig 2.58 Spettro Raman di uno SPE Au/pyrBA-PPD/erGO/apt-AQ prima (spettro in blu) e dopo (spettro in nero) la rigenerazione elettrochimica. Viene inoltre riportato lo spettro di riferimento dell'erGO, in rosso.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un biosensore elettrochimico per la rilevazione di insulina nel sangue. Il sistema messo a punto è caratterizzato da un limite di rilevabilità di 150 pM e presenta una risposta lineare per valori di concentrazione di insulina inferiori a 5nM quindi ampiamente all'intero del campo di concentrazione di interesse per le applicazioni in ambito clinico.

Utilizzando un elettrodo in ITO, sono stati dapprima studiati i diversi stadi di trattamento, necessari per predisporre l'elettrodo al deposito dell'aptamero IBA scelto come elemento sensibile per il rilevamento dell'insulina. In particolare sono state esaminate diverse modalità di funzionalizzazione della superficie, con riferimento alla fase di *electro-grafting*, utilizzando ammine diverse. I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare peculiarità e limiti dei diversi processi, anche in relazione al successivo attacco del pirene, usato come *linker* tra la superficie funzionalizzata con ammine ed il grafene ossido.

I risultati ottenuti con riferimento a queste due fasi di trattamento hanno stimolato l'interesse per lo sviluppo di un processo di sintesi di una nuova molecola, il pirBA-PPD, che può essere attaccata elettrochimicamente alla superficie dell'elettrodo ed incorpora lo stesso pirene. L'impiego di questa molecola permette di eliminare uno step di modifica, semplificando il processo di realizzazione del sensore. Inoltre viene definito in modo univoco il rapporto tra PPD e pirene, ottimizzando la presenza di quest'ultimo sulla superficie dell'elettrodo.

La sperimentazione condotta su ITO ha permesso di mettere a punto il protocollo utilizzato per la realizzazione del biosensore, a partire da Screen-Printed-Electrodes (SPE) commerciali, con elettrodo lavorante in oro. Il processo di fabbricazione prevede i seguenti stadi di trattamento: electro-grafting utilizzando la molecola appositamente sintetizzata, pirBA-PPD; deposizione del grafene ossido; riduzione del grafene ossido per via elettrochimica e deposito dell'aptamero. In particolare, per aumentare il segnale elettrochimico dell'aptamero, quest'ultimo è stato coniugato ad entrambi gli estremi all'antrachinone, una molecola redox attiva.

Per lo studio sullo SPE è stata progettata e realizzata una cella elettrochimica microfluidica che permette di lavorare volumi ridotti di fluido di processo, dell'ordine di 30-50 μ L.

Test specifici sono stati condotti per verificare che il contributo di ciascuno stadio di trattamento sia necessario per la realizzazione del dispositivo elettrochimico.

La selettività del sensore è stata verificata analizzando la sua risposta a BSA e BMP4, usualmente presenti nell'ambiente fisiologico in cui si trova l'insulina ed ad essa biologicamente simili. I risultati mostrano una discreta sensibilità dell'IBA nei confronti della BSA, mentre la risposta è di entità trascurabile per quanto riguarda la BMP4.

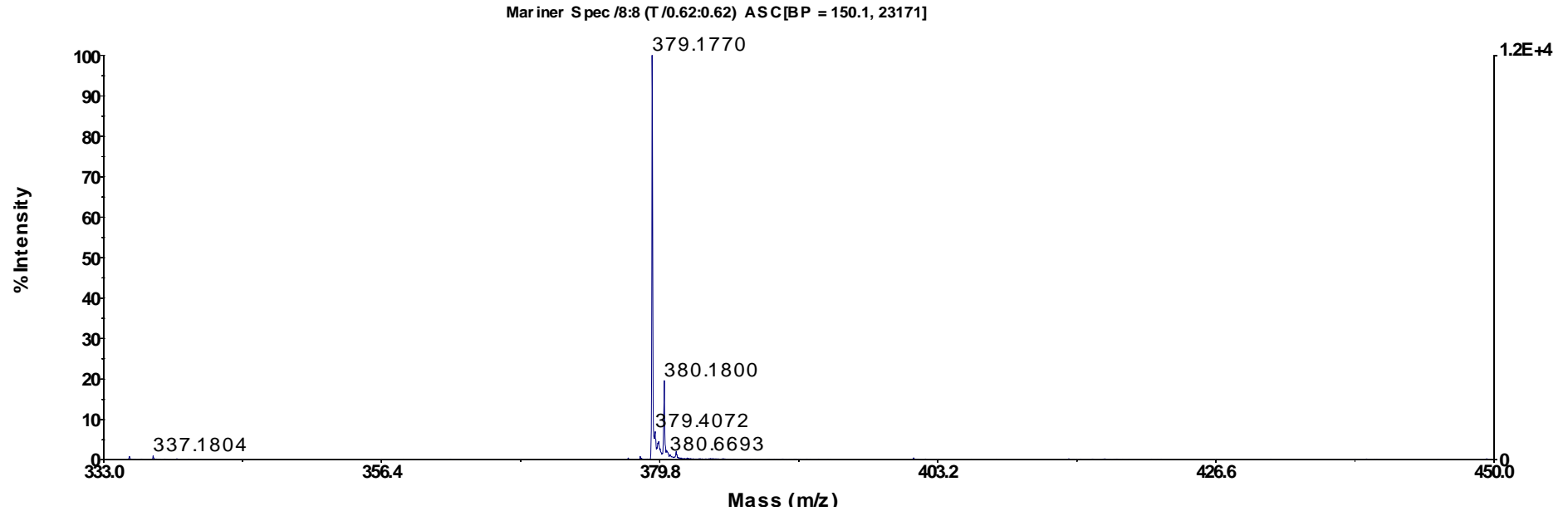
In prospettiva, quindi, si potrebbe considerare uno studio più approfondito sulle caratteristiche dell'aptamero per rendere il sensore più specie-specifico .

Sono state inoltre investigate due diverse modalità di rigenerazione, una biochimica e una elettrochimica. La prima, pur richiedendo tempi maggiori, si dimostra efficace nel ripristinare le caratteristiche del biosensore; la seconda è molto veloce ma risulta aggressiva nei confronti della superficie modificata: il trattamento danneggia in particolare il pirene.

Ulteriori approfondimenti potranno riguardare la stabilità del sensore nel tempo e la possibilità di una sua integrazione in piattaforme microfluidiche per misure multiparametriche e con elevata risoluzione temporale.

APPENDICE 1

Spettro di massa ESI-TOF
del pirBA-PPD.
L'analisi restituisce il PM della
Molecola pari a 378,177 Da



Nomenclatura

A = l'area elettrochimica (cm^2)
 c = concentrazione di elettrolita in soluzione (mol/cm^3)
 D = il coefficiente di diffusività (cm^2/s)
 d_m = distanza percorsa dalla fase mobile (cm)
 d_r = distanza percorsa dall'analita (cm)
 E_{pot} = step di potenziale (V)
 F = costante di Faraday (C/mol)
 i_p = L'altezza di picco redox (C V)
 n = il numero di elettroni scambiati (-)
 R = costante ideale dei gas (J/mol K)
 R_{ct} = resistenza al trasferimento di carica (Ω)
 R_f = fattore di rallentamento (-)
 T = temperatura (K)
 v = velocità di scansione della voltammetria ciclica (V/s)
 ω_{SVW} = frequenza (Hz)

Lettere greche:

ΔE_p = separazione tra i potenziali di picco di una coppia reversibile in condizioni standard (V)
 Γ = ricoprimento (mol/cm^2)

Acronimi:

2AB = 1,4butanediamine
3EA = Trietilammine
ACN = Acetonitrile
AQ = anthraquinone
BMP4 = Bone morphogenetic protein 4
BSA = Bovine serum albumin

CV=*Cyclic voltammetry*
DCM=*Diclorometane*
DMSO=*Dimethyl sulfoxide*
ED=*Etyl eter*
EIS=*Electrochemical Impedance Spectroscopy*
erGO=*electrochemically reduced Graphene oxide*
ESI-TOF=*Time-of-flight mass spectrometry*
GO= *Graphene oxide*
IBA=*insulin-binding aptamer*
IBA-AQ=*insulin-binding aptamer- anthraquinone*
ITO=*Indium Tin Oxide*
NHS=*N-Hydroxysuccinimide*
p-ABA=*4-Aminobenzoic acid*
PANI=*polianiline*
PBS=*Phosphate-buffered saline*
PEG=*polietilen glicole*
PirBA-NHS=*1-Pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester*
PirBA-PPD=*1-Pyrenebutyric acid- p-phenylendiamine*
PPD=*p-phenylendiamine*
SPE =*Screen-printed Electrode*
SWV=*square wave voltammetry*
TBATFB=*Tetrafluoroborate*
TLC=*thin-layer chromatography*

Bibliografia

1. Y. Pu, Z. Zhu, D. Han, H. Liu, J. Liao, K. Zhang, W. Tan, 2011, Insulin-binding aptamer-conjugated graphene oxide for insulin detection, *Analyst*, **136**, 4138-4140
2. F. Mastrantonio, F. Vangimigli, L. Grassi, P. Cappa, G. De Micheli, S. Carrara, *BioNanoSci.*, 2013, Comparative performance of different nanostructured electrochemical sensors on insulin detection, **3**, 285-288
3. Hongmin Ma, Dan Wu, Zhentao Cui, Yan Li, Yong Zhang, Bin Du & Qin Wei (2012). Graphene-Based Optical and Electrochemical Biosensors: A Review. *Analytical letters*
4. Kun Han, Zhiqiang Liang and Nandi Zhou (2010). Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors*
5. Ying Liu, Nazgul Tuleouva, Erlan Ramanculov and Alexander Revzin (2010). Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection. *American Chemical Society*
6. Marcela C. Rodriguez, Abel-Nasser Kawde and Joseph Wang (2005). Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. *The royal Society of Chemistry*
7. Ying Lui, Zimple Matharu, Ali Rahimian, Alexander Revzin (2014). Detecting multiple cell-secreted cytokines from the same aptamer-functionalized electrode. *Biosensors and bioelectronic*
8. Wataru Yoshidaa, Eriko Mochizuki a, Madoka Takasea, Hijiri Hasegawaa, Yo Moritaa, Hiroki Yamazaki, Koji Sodea, Kazunori Ikebukuroa (2008). Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing. *Elsevier*
9. Richard, McCreery (2000). *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Wiley
10. Holler, Skoog, Crouch (2007); *Principles of Instrumental Analysis*(6th ed). Thomson Brooks/Cole.
11. Lamberti, F.; Angoli, S.; Brigo, L.; Granozzi, G; Giomo, M.; Elvassore; N. (2013). Surface functionalization of fluorine-doped tin oxide samples through electrochemical grafting. *American Chemical Society*
12. Perrin, D. D., *Ionization Constants of Inorganic Acids and Bases in Aqueous Solution, Second Edition*, Pergamon, Oxford, 1982.
13. Edward Song and Jin-Woo Choi (2013). Conducting Polyaniline Nanowire and Its Applications in Chemiresistive Sensing. *Nanomaterials*

14. Lei Zhang, Zhige Shi, Quihua Lang, Jie Pan (2009). Electrochemical synthesis of belt-like polyaniline network on p-phenylenediamine functionalized glassy carbon electrode and its use for the direct electrochemistry of horse heart cytochrome *c*. *Elsevier*.
15. Paul M. Dewick (2006). *Essentials of Organic Chemistry*. Wiley.
16. Gamze Abacıoğlu, Zafer Üstündağ, Serkan Demirci, Aybüke A. İsbir Turan, Haslet Ekşia, Remziye Güzel, Sebahattin Balcı, Ali Osman Solak (2014). Surface pKa determination of benzoic acid modified gold electrode by electrochemical and contact angle measurement methods.
17. Xidan Zong, Na Kong, Jingquan Liu, Wenrong Yang, Mengmei Cao and J. Justin Gooding(2013). The Influence of Graphene on the Electrical Communication Through Organic Layers on Graphite and Gold Electrodes. *Electroanalysis*
18. E. G. Sarantonis, E.P. Diamandis and M.i.Karayannis (1985). Kinetic study of the reaction between trinitrobenzenesulfonic acid and amino acids with a trinitrobenzenesulfonate ion-selective electrode. *Analytical biochemistry*
19. Gewu Lu, Gaoquan Shi (2005). Electrochemical polymerization of pyrene in the electrolyte of boron trifluoride diethyl etherate containing trifluoroacetic acid and polyethylene glycol oligomer. *Elsevier*
20. Le Bao, Pengtao Sheng, Jie Li, Shangyuan Wu, Qingyun Cai and Shouzhuo Yao (2012). Surface enhanced Raman spectroscopic detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using a gold nanoparticles-modified alginate gel network. *Analyst*
21. Cristina Gomez-Navarro, R. Thomas Weitz, Alexander M. Bittner, Matteo Scolari, Alf Mews, Marko Burghard and Klaus Kern (2007). Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. *American Chemical Society*
22. Yuehua Dou, Stephen Haswell, John Greenman, Jay Wadhawan (2009). Immobilized anthraquinone for redox mediation of horseradish peroxidase for hydrogen peroxide sensing. *Elsevier*
23. Huanshun Yina,b, Yunlei Zhouc, Qiang Maa, Shiyun Aia,* , Peng Jua, Lusheng Zhub, Linan Lud (2013). Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene–Nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination. *Elsevier*

Ringraziamenti

Vorrei qui ringraziare innanzi tutto la Professoressa Monica Giomo, per la gentilezza e la cortese disponibilità dimostrata durante tutta l'esperienza di tesi.

Ringrazio profondamente il Dott. Francesco Lamberti per avermi aiutata in questi mesi con grande professionalità, passione e immancabile ironia, grazie per avermi insegnato molti segreti dell'elettrochimica, grazie davvero!

Grazie al prof. Salmaso per l'aiuto nella realizzazione di bellissime molecole;

Grazie Nena, che mi hai incoraggiato in laboratorio e per la compagnia di alta qualità!

Grazie alla Giò Silver, impareggiabili sostenitori di vita oltre che di tesi, infinite grazie!

Grazie al Vez, per tutto l'aiuto che mi hai continuamente dato e grazie alle perle di umorismo brillante che mi regai!

Grazie a Paola, che mi sei vicina da ancor prima di nascere e che mi hai sostenuto per anni e anni di università, non solo per questa tesi!

Grazie alle inossidabili: Ile, Tania, Chiara che ci sono sempre, e mi fanno vivere bellissimi momenti, soprattutto al di fuori del lavoro tesi!

Grazie Sara per la grande disponibilità e la pazienza con cui mi ascolti!

Grazie a Saggio e Luke per il supporto morale e tecnico a tutti gli orari, anche quelli improbabili!

Grazie Ciano, ottimo compagno di studi e di vita universitaria: senza di te non so se sarei qui!

Grazie a Vitti per la dolcezza con cui mi hai sempre accompagnata e grazie ad Arturo per la vitalità che mi sai trasmettere!

Grazie a Federico per avermi insegnato a vivere con coraggio.

Grazie a Paolo per aver sostenuto le mie scelte più strampalate!

GRAZIE a tutti voi perché, ognuno a modo proprio, ha contribuito a farmi arrivare sino a qui.

Ve lo assicuro: senza di voi non ce l'avrei fatta!

