

UNIVERSITÀ DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**CARATTERIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN
BIOSENSORE PER LA RILEVAZIONE DI ACIDO
LATTICO.**

Laureando: Rosati Giulio

Relatore : Ch. Mo Prof. Alessandro Paccagnella

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

10 Ottobre 2011

Anno Accademico 2010 – 2011

*Ai miei cari, che mi hanno permesso con i loro sacrifici di giungere dove
sono ora.*

Grazie.

INDICE

INTRODUZIONE	9
CAPITOLO 1: ELEMENTI DI ELETTROCHIMICA	11
1.1-Interfaccia elettrificata	11
<i>1.1.1-Classificazione dei conduttori</i>	12
1.1.1.1-Conduttori elettronici.....	13
1.1.1.2-Conduttori ionici.....	15
<i>1.1.2-Modelli dell'interfaccia elettrochimica</i>	20
1.1.2.1-Modello di Helmholtz.....	21
1.1.2.2-Modello di Gouy-Chapman.....	22
1.1.2.3-Modello di Stern.....	24
1.2-Cinetica elettrochimica	26
<i>1.2.1-Polarizzazione di una cella elettrochimica</i>	29
<i>1.2.2-limite di linearità di Schwan</i>	31
<i>1.2.3-Tipi di elettrodi</i>	35
1.2.3.1-Elettrodi di I specie.....	35
1.2.3.2-Elettrodi di II specie.....	36
<i>Bibliografia</i>	39
CAPITOLO 2: BIOSENSORI	40
2.1-Definizione e classificazione	40
<i>2.1.1-Metodi di rilevazione</i>	42
<i>2.1.2-Componente biologica</i>	44
<i>2.1.3-Performance</i>	44
<i>2.1.4-Metodi di immobilizzazione</i>	46
2.2-Biosensori a riconoscimento biocatalitico	48
<i>2.2.1-Generazioni di biosensori</i>	50
2.2.1.1-Biosensori di I generazione.....	50
2.2.1.2-Biosensori di II generazione.....	51
2.2.1.3-Biosensori di III generazione.....	53
2.3-Biosensori ad affinità	54

2.4-Altri tipi di biosensori.....	55
2.4.1-Nanoparticelle d'oro.....	55
2.4.2-Nanotubi di carbonio.....	57
<i>Bibliografia</i>	59
CAPITOLO 3: ASPETTI BIOLOGICI.....	60
3.1-Enzimi.....	60
3.1.1-Definizione e cenni storici.....	60
3.1.2-Tipologie e modelli.....	63
3.1.3-Cinetica enzimatica.....	67
3.1.3.1-Cinetica di Michaelis-Menten.....	67
3.1.3.2-Inibitori e cofattori.....	72
3.1.4-Un esempio notevole:l'enzima lattato ossidasi.....	74
3.1.4.1-Definizione.....	74
3.1.4.2-Isolamento.....	75
3.1.4.3-Reazioni catalizzate.....	76
3.2-Acido lattico.....	77
3.2.1-Definizione.....	77
3.2.2-Rilevanza dell'acido lattico.....	78
3.2.2.1-Presenza nell'uomo.....	78
3.2.2.2-Utilizzo nell'industria.....	80
3.2.3-Importanza della rilevazione.....	81
3.2.3.1-Settore sanitario.....	82
3.2.3.2-Settore agroalimentare.....	83
<i>Bibliografia</i>	85
CAPITOLO 4: TECNICHE DI MISURA.....	88
4.1- Caratterizzazione di un biosensore.....	88
4.1.1-Componente biologica.....	88
4.1.2-Trasduttore.....	88
4.1.3-Rilevazione.....	89
4.2-Spettroscopia elettrochimica di impedenza.....	89
4.2.1-Definizione.....	89

4.2.1.1-Ipotesi di applicabilità.....	90
4.2.1.2-Tipo di caratterizzazione.....	91
4.2.1.3-Fasi dell'analisi dei dati.....	92
4.2.2-Modelli elettrici equivalenti.....	95
4.2.2.1-Elementi.....	96
4.2.2.2-Modelli degli elettrodi.....	100
4.2.2.3- Interconnessioni e parassiti.....	106
4.3-Tecniche voltammetriche.....	107
4.3.2-Cronoamperometria.....	107
4.3.2-Ciclovoltammetria.....	109
4.3.2.1-Definizione.....	109
4.3.2.2-Sistemi reversibili.....	112
4.3.2.3-Sistemi irreversibili o quasi-reversibili.....	113
4.3.2.4-Microelettrodi.....	115
Bibliografia.....	120
CAPITOLO 5: MISURE ED ANALISI.....	122
5.1-Il biosensore elettrochimico ad enzimi.....	122
5.1.1-Dispositivi.....	124
5.1.1.1-Microelettrodi.....	124
5.1.1.2-Macroelettrodi.....	125
5.2-Protocolli sperimentali.....	125
5.2.1-Pulizia dei dispositivi.....	125
5.2.2-Eliminazione delle bolle.....	126
5.2.3-Misure.....	128
5.3-Caratterizzazione del dispositivo non funzionalizzato.....	129
5.3.1-Studio dei parametri di misura.....	129
5.3.2-Studio della concentrazione di mediatore.....	132
5.3.2.1-Scopo dello studio.....	132
5.3.2.2-Fasi dello studio.....	133
5.3.2.3-Risultati.....	137
5.4-Funzionalizzazione del biosensore.....	137
5.4.1-Caratterizzazione dell'adsorbimento diretto.....	138

5.4.1.1-Protocollo di adsorbimento.....	138
5.4.1.2-Studio della copertura.....	139
5.4.1.3-Studio sulla concentrazione di enzima.....	142
5.4.2-Studio sul cross-linking.....	144
5.4.2.1-Protocollo di deposizione.....	144
5.4.2.2-Studio sulla concentrazione di spaziatore.....	144
5.5-Rilevazione dell'acido lattico.....	147
5.5.1-Parametri sperimentali.....	147
5.5.2-Metodi di diluizione.....	148
5.5.3-Misure.....	149
5.5.4-Performance del biosensore.....	150
Bibliografia.....	152
CONCLUSIONI.....	153

INTRODUZIONE

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la realizzazione di un dispositivo elettronico per la rilevazione e la misura della concentrazione di lattato in campioni liquidi di volume nell'ordine dei microlitri.

Il dispositivo elettronico che si intende realizzare è un biosensore cosiddetto di seconda generazione, il quale impiega un mediatore ossido-riduttivo in combinazione con una componente biologica per la rilevazione dell'analita di interesse, ovvero l'acido lattico.

La componente biologica, immobilizzata sulla superficie dell'elettrodo d'oro, è responsabile del riconoscimento molecolare dell'analita: in questa tesi si utilizzerà l'enzima lattato ossidasi, specifico per l'acido lattico.

L'enzima in questione, in presenza di lattato, catalizza una reazione chimica di ossido-riduzione. Grazie al mediatore, in cui l'enzima è immerso, il trasferimento elettronico conseguente alla reazione viene rilevato dall'elettrodo sul quale è immobilizzato l'enzima.

La misura amperometrica è stata effettuata con la tecnica della voltammetria ciclica o ciclovoltammetria (CVM).

Il Capitolo 1 della presente tesi descrive i fenomeni di interfaccia elettrochimica ed i modelli elettrici principalmente impiegati per la loro descrizione.

Nel Capitolo 2 viene invece presentata una trattazione sui biosensori, classificandoli in base a diversi loro parametri specifici.

Il Capitolo 3 è invece dedicato agli aspetti biologici del biosensore che si intende realizzare. In esso è presente una trattazione generale sugli enzimi e viene successivamente descritto l'enzima lattato ossidasi. Il Capitolo 3 si conclude con una descrizione dell'acido lattico, della sua rilevanza in alcuni processi biologici e dell'importanza della sua rilevazione in ambito sanitario e agroalimentare.

Nel Capitolo 4 vengono descritte le tecniche di misura utilizzate nella caratterizzazione elettrica del biosensore.

Il Capitolo 5 è dedicato interamente alle misure effettuate per la caratterizzazione e la validazione del biosensore. In esso viene definita la soluzione contenente il mediatore, che consente la rilevazione dell'attività di catalisi dell'enzima in presenza del lattato. Inoltre, viene valutata e caratterizzata la procedura di immobilizzazione

dell'enzima sulla superficie elettrodica, la sua stabilità e la concentrazione di enzima necessaria ad ottenere una buona copertura della superficie, mediante misure di Spettroscopia d'impedenza.

Il Capitolo 5 si conclude presentando la rilevazione vera e propria del lattato e la definizione quantitativa di alcuni parametri legati alle prestazioni di rilevazione del biosensore realizzato.

CAPITOLO 1: ELEMENTI DI ELETTROCHIMICA

1.1 Interfaccia elettrificata^{[1][2]}

L'elettrochimica trae origine dall'esistenza di interfacce e dalle proprietà elettriche che ne derivano. L'interfaccia è la superficie di separazione tra due fasi diverse. Le cause di diversità peraltro possono essere molteplici: stato fisico (solido/liquido, solido/gas, liquido/gas), immiscibilità (liquido/liquido), separazione imposta tra due liquidi miscibili con diversa composizione chimica.

L'interfaccia costituisce una condizione di discontinuità delle proprietà chimiche e fisiche del sistema. Se le due fasi sono, per un qualsiasi motivo, diverse, è evidente che le proprietà chimico-fisiche siano differenti. Le molecole che si trovano in prossimità dell'interfaccia, in quella porzione di spazio che costituisce l'interfase (cioè la porzione di volume del sistema che racchiude l'interfaccia, costituita quindi da una porzione di volume di una fase e una porzione di volume dell'altra fase), subiscono interazioni chimico-fisiche che non sono più bilanciate in tutte le direzioni, come invece accade in quella porzione di volume lontana dall'interfaccia (detta bulk).

Questa condizione di discontinuità provoca una perdita di omogeneità nella soluzione sfociando in concentrazioni ed orientazioni delle molecole diverse nell'interfase e nel bulk della soluzione.

Molto spesso le particelle che costituiscono le due fasi presentano proprietà elettriche, ad esempio cariche elettriche vere e proprie, come gli elettroni e gli ioni, oppure un qualche valore di momento dipolare o quadrupolare, o una certa polarizzabilità. La condizione di eterogeneità e anisotropia in cui vengono a trovarsi queste particelle elettricamente attive quando entrano nella regione interfase fa sì che si produca una elettrificazione: si realizza un eccesso di cariche elettriche da una parte dell'interfaccia ed un eccesso di segno opposto dall'altra parte dell'interfaccia,



L'elettrificazione produce una differenza di potenziale ($\Delta\phi$) attraverso l'interfaccia che, pur non essendo molto elevata (al massimo dell'ordine dei Volt), produce un campo elettrico elevatissimo ($\sim 10^9$ V/m)

Figura 1.1: Schematizzazione dell'accumulo di carica all'interfaccia tra due fasi.

confinati in uno spazio di dimensioni molto ridotte, qual è appunto la regione interfaseale.

1.1.1 Classificazione dei conduttori

L'elettrificazione della regione interfaseale è tanto più pronunciata se le due fasi sono costituite da conduttori elettrici. In questo caso, infatti, esistono delle vere e proprie cariche elettriche (elettroni, ioni) mobili, per cui la realizzazione degli accumuli nella regione interfaseale è più facile. Un dispositivo elettrochimico può essere immaginato, nella sua essenzialità, come la disposizione in serie di un conduttore ionico interposto tra due conduttori elettronici. Ciò provoca rilevanti effetti associati al passaggio di corrente elettrica: il processo di trasferimento di carica che si instaura produce una differenza di potenziale ($\Delta\phi$) attraverso l'interfaccia che, pur non essendo molto elevata (al massimo dell'ordine dei Volt), produce un campo elettrico elevatissimo ($\sim 10^9$ V/m) in corrispondenza di ogni singola interfaccia conduttore elettronico/conduttore ionico.

I conduttori elettrici sono appunto di due specie, a seconda del tipo di cariche elettriche dotate di mobilità:

- conduttori elettronici (I specie), per i quali le uniche cariche elettriche in grado di muoversi sono gli elettroni. Appartengono a questa specie i metalli, i semiconduttori e composti del carbonio come la grafite, il carbonio vetroso, il diamante opportunamente drogato, ma anche alcuni materiali polimerici;
- conduttori ionici (II specie), nei quali le cariche elettriche mobili sono gli ioni, generalmente sia positivi che negativi. Appartengono a questa specie le soluzioni elettrolitiche, i cristalli ionici, gli elettroliti fusi, in particolare i cosiddetti liquidi ionici, gli elettroliti polimerici.

L'interfaccia tra un conduttore elettronico ed un conduttore ionico costituisce un caso molto importante e viene denominata elettrodo. La sua caratteristica fondamentale è che, oltre alla elettrificazione interfaseale, se si ha trasferimento di carica attraverso l'interfaccia questa è inevitabilmente accompagnata da un processo chimico ossidoriduttivo. Infatti, le uniche cariche elettriche che possono attraversare una tale interfaccia sono gli elettroni, ma, mentre nel conduttore elettronico gli elettroni sono liberi e ospitati in modo sostanzialmente indifferente, cioè il conduttore si comporta

come un serbatoio di elettroni dal quale possono tranquillamente entrare ed uscire, nel conduttore ionico gli elettroni non sono liberi, ma sono allocati su un qualche orbitale di una qualche specie chimica. Ciò significa che, quando un elettrone attraversa l'interfaccia dal conduttore elettronico a quello ionico, deve finire sull'orbitale di una qualche specie chimica, ma questo costituisce un processo di riduzione di tale specie chimica. Viceversa, quando un elettrone attraversa la predetta interfaccia dal conduttore ionico a quello elettronico, deve uscire da un orbitale di una qualche specie chimica che, perciò, si ossida. Quindi un elettrodo è sede potenziale di processi di ossidoriduzione.

1.1.1.1 Conduttori elettronici

Le proprietà dei conduttori elettronici sono descritte dalla teoria delle bande.

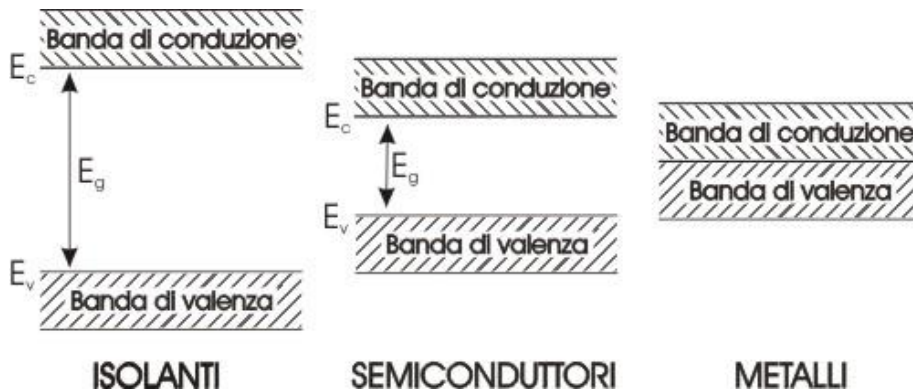


Figura 1.2: Rappresentazione delle bande di conducibilità e di valenza e del loro gap energetico per conduttori, isolanti e semiconduttori.

I conduttori elettronici, come ad esempio i metalli, mettono in comune gli elettroni di valenza per la costituzione del reticolo cristallino. Gli orbitali atomici che ospitano gli elettroni di valenza danno origine a due bande: la banda di valenza, costituita dagli orbitali ad energia minore, la banda di conduzione, costituita dagli orbitali molecolari ad energia maggiore.

Il numero di elettroni di valenza può essere inferiore a quello che può essere ospitato nell'insieme degli orbitali della banda di valenza, per cui la banda è occupata solo parzialmente. Anche quando la banda di valenza fosse completamente piena, essa risulta comunque parzialmente sovrapposta alla banda di conduzione vuota. In questa situazione gli elettroni della banda di valenza sono estremamente "mobili", perché hanno a disposizione un numero elevatissimo di orbitali nella stessa banda, ai quali possono accedere liberamente, dato che il salto energetico tra un orbitale ed un altro

è largamente inferiore all'energia cinetica $k_B T$ (k_B = costante di Boltzmanⁱ e T temperatura in gradi Kelvin).

Nei materiali non metallici i livelli energetici della banda a più bassa energia sono completamente occupati e quelli della banda a energia superiore sono completamente vuoti, ma tra le due bande vi è un ampio intervallo energetico. Per trasferire un elettrone dal livello energetico più alto della banda inferiore completamente piena (banda di valenza) a quello più basso della banda superiore completamente vuota (banda di conduzione) occorre un'elevata quantità di energia (band gap, E_g) rispetto all'energia cinetica $k_B T$. Per tale motivo gli elettroni non sono in grado di passare da una banda all'altra; d'altra parte, essendo tutti occupati gli orbitali della banda di valenza, gli elettroni non sono in grado di muoversi attraverso il materiale perché sono confinati nel proprio orbitale: la sostanza viene definita isolante. Taluni materiali presentano una differenza energetica relativamente piccola tra la banda di valenza piena e quella di conduzione vuota, per cui è possibile eccitare facilmente alcuni elettroni e trasferirli quindi dalla banda piena a quella vuota. In questa situazione si liberano degli orbitali nella banda di valenza, che consentono una certa mobilità agli altri elettroni e, d'altra parte, gli elettroni finiti nella banda di conduzione sono diventati mobili, data la grande disponibilità di orbitali vuoti in quella banda: la sostanza in questo caso viene definita semiconduttore.

Esistono diversi polimeri organici che presentano valori di conducibilità specifica (elettronica) anche molto elevata, confrontabile con quella dei metalli.

In realtà il meccanismo della conduzione elettronica può essere abbastanza diverso a seconda del tipo di polimero e del suo trattamento.

I polimeri conduttori elettronici vengono impiegati come tali in diversi dispositivi (cioè come materiali elettrodi al posto dei metalli), come quelli usati nell'elettrocatalisi, grazie al fatto che la sintesi organica consente di modificare la superficie di tali materiali elettrodi in modo tale da consentire il legame di qualsiasi gruppo funzionale (cioè qualsiasi catalizzatore).

Particolarmente importante è il loro utilizzo in bioelettrochimica, sia per la possibilità di realizzare biosensori (ad esempio potendo attaccare sulla loro superficie enzimi in grado di "riconoscere" sostanze specifiche), sia per la loro maggiore

ⁱ Costante di Boltzmann $k_B = 1.3806505 \cdot 10^{-23}$ J/K

compatibilità biologica rispetto ai metalli, per cui possono venire inseriti negli organismi viventi.

1.1.1.2 Conduttori ionici ^{[1][6][7]}

Esistono diverse classi di conduttori ionici: soluzioni elettrolitiche, solidi ionici, sostanze fuse (sali, ossidi) e polimeri. A seconda del tipo di conduttore la conducibilità ha luogo attraverso meccanismi differenti.

Nelle soluzioni liquide il componente maggioritario è detto solvente. Non tutti i solventi sono uguali, ma possono essere classificati in due grandi famiglie: quelli ionici e quelli molecolari. I primi sono essenzialmente costituiti da specie completamente dissociate in ioni (es. sali fusi), sia in forma monoatomica sia in forma poliatomica, e presentano elevata conducibilità elettrica.

I solventi molecolari sono costituiti da molecole. Anche i liquidi molecolari, come quelli ionici, non sono completamente amorfi, ma mantengono in parte la struttura originaria della forma cristallina dello stato solido da cui derivano. In particolare l'acqua a temperatura ambiente è costituita per il 70% di aggregati di circa 50 molecole con struttura simile a quella del ghiaccio, mentre il restante 30% è costituito da molecole sostanzialmente singole.

Una soluzione elettrolitica è formata da un solvente molecolare e dagli ioni in esso disciolti. In questo caso la conducibilità elettrica raggiunge valori anche elevati (pur sempre largamente inferiori a quelli dei conduttori elettronici di tipo metallico), grazie alla buona mobilità degli ioni. La formazione di una soluzione elettrolitica avviene quindi per dissoluzione di un elettrolita in un solvente molecolare. Esistono peraltro due tipi di elettroliti: gli elettroliti ionofori e gli elettroliti ionogeni.

Gli elettroliti ionofori sono i cristalli ionici, cioè quelle sostanze che sono costituite da ioni già nel loro stato naturale (generalmente lo stato solido, anche se esistono diversi tipi di cristalli ionici liquidi a temperatura ambiente). Si

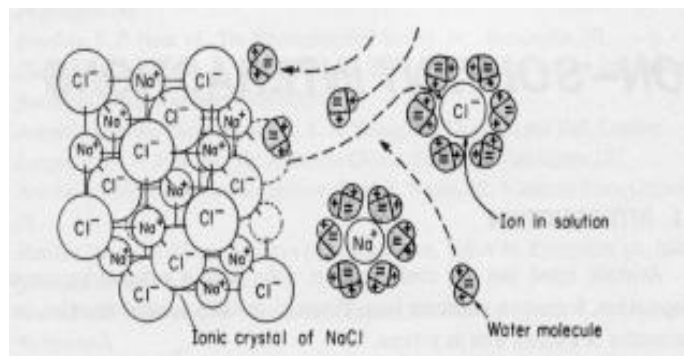


Figura 1.3: Esempio del meccanismo di solvatazione del NaCl da parte delle molecole d'acqua.

tratta ad esempio di sali, ossidi, idrossidi, per i quali la struttura cristallina è costituita da ioni di carica opposta tenuti assieme dalle forti interazioni coulombiane.

Gli elettroliti ionogeni sono invece sostanze costituite da molecole neutre che producono coppie di ioni attraverso una reazione chimica con il solvente nel quale vengono disciolti (in generale si tratta di una reazione acido-base, cioè di scambio protonico).

Per sciogliere un cristallo ionico si devono eliminare le forze d'interazione elettrostatica tra gli ioni; ciò avviene per effetto di due contributi, entrambi rilevanti: da una parte la diminuzione delle forze coulombiane per effetto dell'aumento della permittività, alla quale la forza coulombiana è inversamente proporzionale; pertanto maggiore è la costante dielettrica ϵ del solvente maggiore è la possibilità di separare gli ioni e quindi di avere la dissoluzione del cristallo ionico. In secondo luogo è però necessario avere delle interazioni sufficientemente forti tra gli ioni e le molecole del solvente per compensare il lavoro di separazione degli ioni, cioè il lavoro necessario per vincere le residue forze coulombiane, che rimangono comunque rilevanti.

L'interazione solvente-soluto è definita in generale solvatazione, idratazione nel caso in cui il solvente sia l'acqua.

Ciò porta alla costituzione della cosiddetta sfera primaria di solvatazione, cioè un guscio di molecole di solvente fortemente legate allo ione da costituire un tutt'uno tanto che gli ioni si muovono assieme alla sfera primaria e, di fatto, le dimensioni idrodinamiche divengono quelle degli ioni solvatati.

Il trasporto di specie sciolte in un solvente avviene casualmente con movimenti di tipo Browniano.

Le particelle di solvente e di soluto si scontrano in continuazione e si muovono stocasticamente, con velocità differenti, in varie direzioni.

La risposta di una specie i -esima sottoposta ad una forza, che può essere espressa come l'opposto del gradiente di un potenziale, viene descritta in termini di flusso J . In questo caso il flusso viene definito come la quantità di materia (misurata in grammoparticelle, cioè in moli di particelle) che attraversa una sezione unitaria (ortogonale al gradiente) nell'unità di tempo.

Di seguito saranno presi in considerazione solamente i processi in cui esiste una relazione lineare tra flussi e forze, ossia quando il sistema considerato non si discosta molto dalle condizioni d'equilibrio idrodinamico.

La relazione tra flusso e la forza che lo origina può essere ricavata in termini del tutto generali con la seguente considerazione. La velocità con cui si muovono le particelle dipende dalle loro dimensioni e forma, dall'interazione tra le molecole del solvente e dall'interazione tra particelle di soluto e solvente. Nel caso più comune si verifica che le molecole del soluto sono più grandi di quelle del solvente, la forma delle molecole può essere considerata sferica e l'interazione tra le particelle di solvente e soluto è trascurabile. In questo caso il movimento delle particelle del soluto può essere ipotizzato simile a quello di particelle sferiche, di raggio r_i , in un mezzo viscoso con coefficiente di viscosità η . La forza f_i che agisce su una particella induce un'accelerazione per cui la particella si muoverà di moto uniformemente accelerato lungo la direzione della forza agente. A questo moto si oppone la resistenza dovuta all'attrito prodotto dalla viscosità della soluzione, che genera una forza resistente (con la stessa direzione ed il verso opposto a quello del moto) quantificata dalla legge di Stokes:

$$f_r = 6\pi\eta r_i v \quad (1.1)$$

Poiché la forza resistente dipende dalla velocità, essa crescerà all'aumentare della velocità del moto uniformemente accelerato, fino ad eguagliare (ed annullare) la forza agente. La velocità v_0 in condizioni stazionarie, cioè quando la risultante delle due forze è nulla, è quindi descritta dalla legge di Stokes:

$$v_0 = \frac{f_i}{6\pi\eta r_i} \quad (1.2)$$

dove f_i è la forza che agisce sulle particelle. A tale velocità stazionaria corrisponde un flusso:

$$J_i = c_i v_0 \quad (1.3)$$

Nel caso dell'azione di un campo elettrico, il flusso della specie ionica i -esima è generato dalla forza elettrica agente che, per una grammoparticella vale:

$$f_i = -z_i F \text{ grad} \phi \quad (1.4)$$

dove F è la costante di Faradayⁱⁱ. Considerando il caso normale di un gradiente monodirezionale, si può quindi scrivere:

$$J_i = c_i v_0 = c_i \frac{f_i}{6\pi\eta r_i} = -c_i \frac{z_i F \text{ grad} \phi}{6\pi\eta r_i} = -c_i u_i^* z_i F \frac{d\phi}{dx} = -c_i u_i \frac{d\phi}{dx} \quad (1.5)$$

dove u_i^* è la mobilità assoluta dello ione i -esimo, cioè la velocità stazionaria che si ha in presenza di una forza agente unitaria, mentre u_i è la mobilità ionica elettrochimica, cioè la velocità in presenza di un gradiente di potenziale unitario. Dal punto di vista elettrico la grandezza correlata a questo flusso di materia è la densità di corrente j , ossia il flusso di carica elettrica, che può essere così definita:

$$j = -\sigma \text{ grad} \phi \quad (1.6)$$

dove il coefficiente fenomenologico σ , è la conducibilità elettrica specifica, cioè il reciproco della resistività ρ .

Attraverso la legge di Faraday, che correla la quantità di carica con quella di materia, è possibile scrivere la seguente equivalenza tra la densità di carica e il flusso di massa delle specie cariche:

$$\begin{aligned} j &= \sum_i z_i F J_i \\ &= - \left(\sum_i u_i |z_i| c_i F \right) \text{ grad} \phi \end{aligned} \quad (1.7)$$

In tal modo si ottiene la definizione di conducibilità specifica totale:

$$\sigma = \sum_i u_i |z_i| c_i F \quad (1.8)$$

ⁱⁱ Costante di Faraday: $F = 96.485,3399 \text{ C/mol}$

Un parametro molto importante, che caratterizza il trasporto di cariche elettriche è il numero di trasporto, che rappresenta la frazione di cariche elettriche (cioè della corrente elettrica) trasportata da una singola specie ionica all'interno di una soluzione elettrolitica. Quando si sottopone una soluzione elettrolitica ad un campo elettrico (ad esempio introducendo due lamine metalliche affacciate e applicando una differenza di potenziale) tutte le specie ioniche si mettono in moto ordinato lungo le linee di forza del campo elettrico. Naturalmente ioni di carica opposta si muovono nel verso opposto, per cui tutte le specie ioniche contribuiscono additivamente al trasporto di cariche elettriche, cioè all'intensità di corrente complessiva I . Ciascuna specie ionica dà però un contributo specifico che dipende dalla sua concentrazione, dalla sua carica e dalla sua mobilità. Il numero di trasporto t_i della specie ionica i -esima è definito come:

$$t_i = \frac{u_i |z_i| c_i}{\sum_j u_j |z_j| c_j} \quad (1.9)$$

e ha un valore compreso tra 0 e 1, mentre la somma dei numeri di trasporto di tutte le specie ioniche presenti in soluzione, vale ovviamente 1. Nel caso di un elettrolita binario, costituito cioè da una coppia di ioni (un catione e un anione), questi hanno sia carica uguale ed opposta che la stessa concentrazione; pertanto, i rispettivi numeri di trasporto tendono a valori vicini a 0.5, ma sono diversi in funzione delle rispettive mobilità ioniche. Solo nel caso di due ioni con la stessa mobilità (stesso raggio ionico dello ione solvatato), si otterrebbe un numero di trasporto pari a 0.5.

Un'altra causa di moto delle particelle è la possibile presenza di un gradiente di concentrazione che provoca la cosiddetta diffusione, sottostante alla prima legge di Fick:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (1.10)$$

dove D è il coefficiente di diffusione, c la concentrazione della soluzione e J il flusso della stessa nella direzione di diffusione x .

Nel caso di soluzioni diluite è possibile utilizzare sia per la migrazione sia per la diffusione lo stesso valore di u_i^* (mobilità assoluta dello ione i -esimo, si veda la formula 1.5) ottenendo l'equazione di Einstein che fornisce la relazione, valida per soluzioni diluite, tra coefficiente di diffusione e mobilità ionica:

$$\frac{D_i}{u_i} = \frac{RT}{|z_i| F} \quad (1.11)$$

Dove R è la costante dei gasⁱⁱⁱ, T la temperatura in Kelvin, F la costante di Faraday e z_i carica elettrica della specie i -esima.

Il flusso complessivo di una specie ionica in soluzione è dato dall'equazione di Nernst-Planck dove si considera anche il possibile contributo della convezione (in questo caso v rappresenta la velocità del moto della soluzione, lungo l'asse x):

$$J = -D \frac{dc}{dx} - \frac{zF}{RT} Dc \frac{d\phi}{dx} + cv \quad (1.12)$$

1.1.2 Modelli dell'interfaccia elettroica

Quando due fasi entrano in contatto la regione interfase risulta elettrificata.

Se consideriamo un punto dello spazio all'interno di una fase, immediatamente vicino all'interfaccia, ed un punto all'interno dell'altra fase, anch'esso vicino all'interfaccia, avremo una differenza di potenziale elettrico, dovuta alla elettrificazione interfase, che viene quantificata dal $\Delta\phi$ (differenza di potenziale interno o di Galvani), esprimibile come somma dei due contributi: $\Delta\psi$ (differenza di potenziale esterno o di Volta), dovuta agli eccessi di cariche elettriche che si accumulano nella regione interfase, e $\Delta\chi$ (differenza di potenziale superficiale), dovuta alla presenza dei due strati dipolari superficiali.

ⁱⁱⁱ $R = 8,314472 \text{ J/Kmol}$

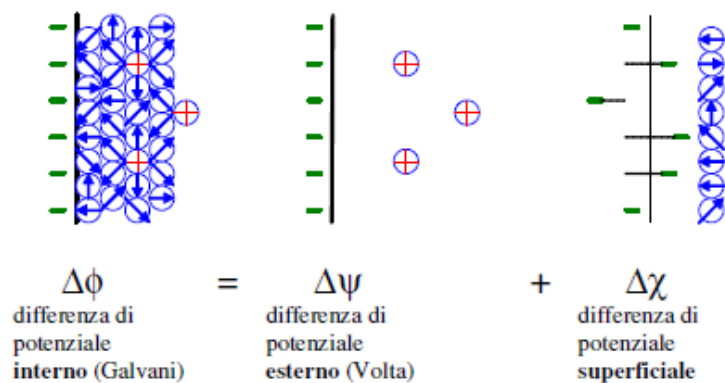


Figura 1.4: Composizione del potenziale dell'interfaccia elettrificata.

L'elettrificazione interfase riveste un'importanza enorme per tutti i fenomeni elettrochimici, che coinvolgono una varietà di situazioni estremamente vasta: dai processi biologici, in particolare quelli di membrana, alle elettrosintesi, dal funzionamento del sistema nervoso alla produzione di energia. Naturalmente la struttura delle interfasi elettrificate ha attratto l'attenzione degli elettrochimici, a partire dal caso più eclatante dell'interfaccia tra un metallo (nel quale ci sono elettroni liberi) ed una soluzione elettrolitica (nella quale ci sono ioni liberi).

1.1.2.1 Modello di Helmholtz

Il primo modello di interfase elettrificata si deve a Helmholtz (1879), che immaginò di avere i due eccessi di carica confinati su due piani paralleli: uno è la superficie del metallo (sulla quale sono concentrate le cariche in eccesso del metallo) e l'altro è un piano parallelo, luogo dei centri degli ioni in eccesso presenti dalla parte della soluzione elettrolitica. Tale secondo piano è noto come OHP (Outer Helmholtz Plane),

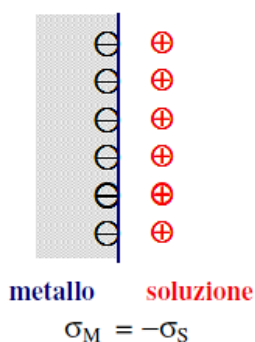


Figura 1.5: Interfaccia elettrificata.

il luogo dei centri degli ioni adsorbiti dalla superficie metallica è invece detto IHP (Inner Helmholtz Plane). Il modello è molto semplice, ma abbastanza aderente alla realtà e in grado di rappresentare la situazione, almeno in prima approssimazione, in molte condizioni sperimentali. Da questo modello la regione interfase prese il nome di doppio strato elettrico (double layer).

Secondo tale modello l'interfaccia dovrebbe comportarsi come un semplice condensatore di capacità C_d calcolabile

dalla permittività dell'elettrolita, dall'area dell'interfaccia e dalla distanza dell'OHP dalla superficie metallica d :

$$C_d = \frac{\partial \sigma}{\partial V} = \frac{\epsilon \epsilon_0}{d} \quad (1.13)$$

Le densità di carica superficiale (σ) del metallo e della soluzione sono uguali e sono calcolabili nel seguente modo:

$$\sigma = \frac{\epsilon \epsilon_0}{d} V \quad (1.14)$$

In realtà si verifica sperimentalmente che C_d (capacità differenziale di double layer) dipende dalla differenza di potenziale V , così come dalla temperatura T e dalla concentrazione degli ioni in soluzione c , per cui il modello di Helmholtz risulta non del tutto adeguato.

In effetti, mentre sul metallo le cariche sono confinate sulla superficie, nella soluzione si ha l'effetto del moto termico per cui la distribuzione delle cariche è un compromesso tra l'effetto del campo elettrico e quello dell'agitazione termica.

1.1.2.2 Modello di Gouy e Chapman

Allo scopo di ovviare al problema del modello di Helmholtz Gouy e Chapman hanno quindi sviluppato un modello che considera l'effetto dell'agitazione termica (1910-1913). In questo modello gli ioni sono considerati come cariche puntiformi, distribuite in parte sul piano parallelo alla superficie del metallo, come nel modello di Helmholtz, ma in parte nel resto della regione interfase a causa dell'agitazione termica: si ha quindi un doppio strato compatto tra i due

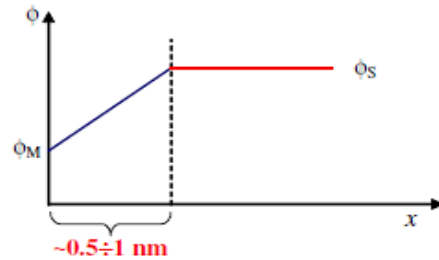


Figura 1.6: Grafico del potenziale ϕ in funzione della distanza dalla superficie dell'elettrodo x .

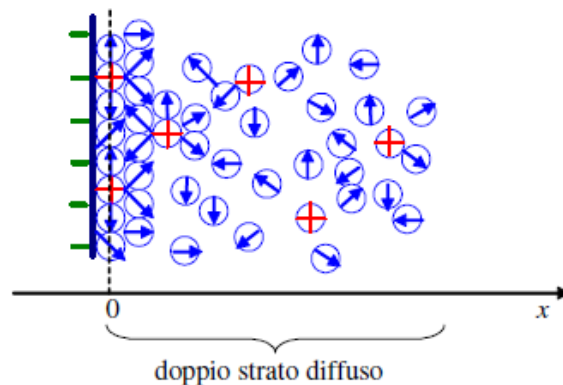


Figura 1.7: Rappresentazione della nuvola diffusa di ioni dietro al piano di Helmholtz ($x=0$).

piani paralleli (in cui le densità di carica del metallo e della soluzione si uguagliano $\sigma_M = \sigma_S$) e un doppio strato diffuso tra il piano di Helmholtz (OHP) e il bulk della soluzione.

La struttura del doppio strato può essere descritta in termini rigorosi, utilizzando l'equazione di Poisson per il potenziale elettrico ed utilizzando la legge di distribuzione di Boltzmann per gli ioni in soluzione. Dalla combinazione delle due si ha l'equazione di Poisson-Boltzmann che mette in relazione il potenziale elettrico con la densità di carica e , quindi, con la concentrazione degli ioni.

La soluzione dell'equazione differenziale porta ad esprimere la concentrazione degli ioni in funzione della distanza adimensionale dalla superficie del metallo x/x_{DL} , in relazione ad un parametro θ^0 , che dipende dalla differenza di potenziale interno $\phi^0 = \phi_M - \phi_S$. Tale parametro risulta dalla seguente equazione:

$$\theta^0 = \frac{ze\phi_0}{k_B T} \quad (1.15)$$

L'andamento delle concentrazioni risulta naturalmente diverso per le due specie ioniche presenti in soluzione, a seconda dell'eccesso di carica presente sulla superficie metallica: una specie sarà attratta e l'altra sarà repulsa (figura 1.8).

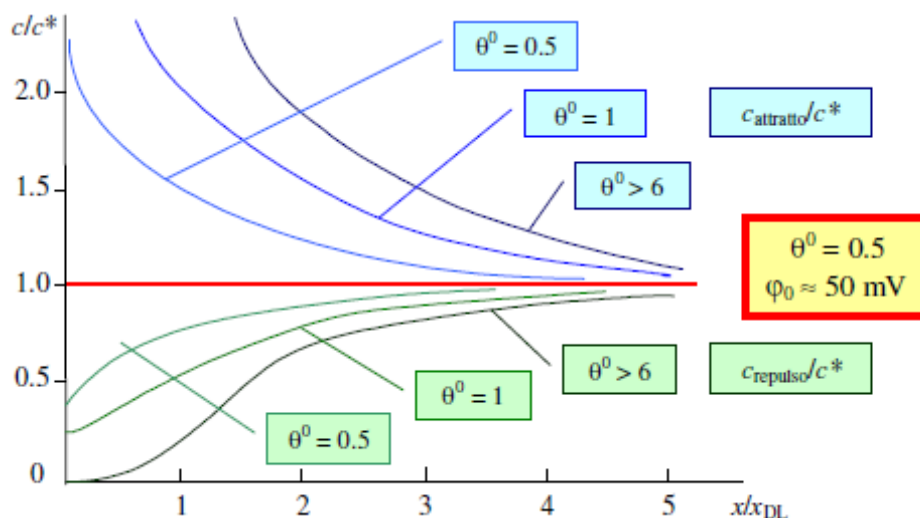


Figura 1.8: Rapporto della concentrazione ionica (c) con quella di bulk (c^*) in funzione della distanza adimensionale dalla superficie metallica per diversi valori del parametro θ^0 .

Il modello di Gouy-Chapman tiene conto della dipendenza di C_d dal potenziale V , dalla temperatura T e dalla concentrazione della soluzione c . L'assunzione che gli ioni siano cariche puntiformi, per cui lo strato diffuso viene considerato a partire da

$x = 0$, porta a delle approssimazioni sul valore della capacità del double layer, che generalmente viene sovrastimata.

1.1.2.3 Modello di Stern

Un'ulteriore evoluzione del modello sviluppato prima da Helmholtz e poi da Gouy e Chapman la si deve a Stern (1924).

In questo nuovo modello si tiene in considerazione il fatto che gli ioni hanno dimensioni finite e che le loro dimensioni in soluzione sono quelle degli ioni solvatati. Inoltre, si considera presente sulla superficie metallica uno strato di solvente che la separa dagli ioni in soluzione. Da ciò l'OHP diviene il piano dei centri degli ioni solvatati e lo strato diffuso non parte più da $x=0$.

Si ottiene quindi che:

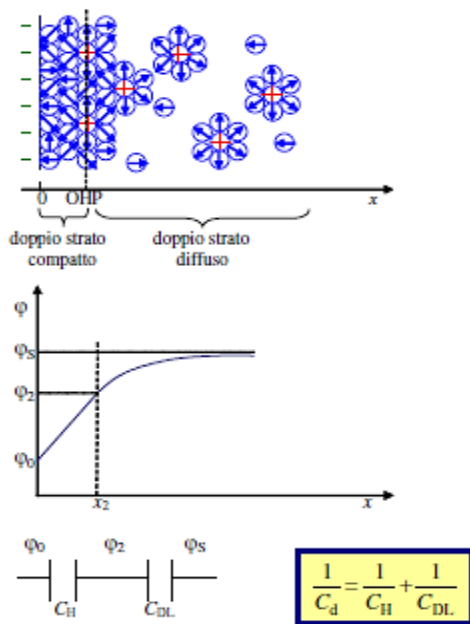


Figura 1.9: Rappresentazione schematica della distribuzione degli ioni solvatati sulla superficie elettroica ipotizzata da Stern (sopra). Grafico del potenziale in funzione della distanza dalla superficie elettroica

- Per $0 < x < x_{OHP}$ non ci sono cariche elettriche: vale il modello di Helmholtz (anche se $\sigma_{OHP} < \sigma_M$).
- Per $x \geq x_{OHP}$ si ha la distribuzione di Gouy Chapman che però parte da $x=x_{OHP}$ invece che da $x=0$.

C_d è la capacità differenziale totale, data dai due contributi: C_H che è la capacità di Helmholtz, cioè del doppio strato compatto, e C_{DL} che è la capacità del doppio strato diffuso. In tal modo Stern rettificò l'inconsistenza del modello di Gouy-Chapman combinando uno strato di ioni legati all'OHP con uno strato diffuso dietro di esso. La capacità di double layer C_d è dunque ottenuta dalla serie di quella di Helmholtz e di quella di Gouy-

Chapman. Per potenziali non oltre ai 50 mV ciò si traduce in un decadimento lineare del potenziale fino al OHP e circa esponenziale dopo di esso in direzione del bulk della soluzione.

Le capacità dei due modelli sono calcolabili dalle seguenti formule:

$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{OHP}} \quad (1.16)$$

$$C_{DL} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{L_D} \cosh \frac{zV_0}{2V_t} \quad (1.17)$$

con $L_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{2n^0 z^2 q}}$ lunghezza di Debye.

Dove $\varepsilon_0 \varepsilon_r$ è la permittività dielettrica dell'elettrolita e d_{OHP} è la distanza del *OHP* dall'elettrodo metallico, V_t è il potenziale termico mentre V_0 è il potenziale sulla superficie dell'elettrodo n^0 è il numero di ioni presenti nel bulk dell'elettrolita (in ioni su litro) mentre z è la loro valenza e q è la carica dell'elettrone. La lunghezza di Debye caratterizza il decadimento spaziale del potenziale e può essere vista come lo spessore caratteristico dello strato diffuso.

Per una specie chimica in grado di attraversare l'interfaccia tra due fasi, la condizione di equilibrio è espressa dall'uguaglianza del potenziale elettrochimico nelle due fasi, il che è sempre vero per gli elettroni.

Quindi l'interfaccia tra due metalli realizza sempre la condizione di equilibrio per gli elettroni, dato che essi, mediante l'elettrificazione delle due fasi, consentono di compensare la differenza di potenziale reale, cioè la differenza della rispettiva Funzione Lavoro Φ .

Anche nel caso di un elettrodo, cioè un'interfaccia tra un conduttore elettronico ed un conduttore ionico, deve essere rispettata la condizione di uguaglianza dei potenziali elettrochimici nonostante il fatto che gli elettroni, che possono attraversare l'interfaccia, non esistano liberi in entrambe le fasi, per cui non si possano confrontare i rispettivi potenziali elettrochimici.

All'elettrodo il trasferimento di elettroni è inevitabilmente accompagnato dal decorso di un processo chimico ossido riduttivo, che possiamo indicare in forma sintetica nel modo seguente: $Ox^{z+} + ne \rightleftharpoons R^{(z-n)+}$, dove ne indica n grammoelettroni^{iv}.

^{iv} numero di elettroni pari a n volte il numero di Avogadro, cioè pari a nF Coulomb

Per una tale interfaccia, la condizione di equilibrio implica innanzitutto che il trasferimento elettronico avvenga in entrambi i versi, ovvero sia che gli elettroni possano passare dal conduttore elettronico al conduttore ionico, cioè sulla specie Ox^{z+} , con il processo che decorre da sinistra a destra, ma contemporaneamente possano passare anche dal conduttore ionico, cioè dalla specie $R^{(z-n)+}$, al conduttore elettronico.

La capacità che si sviluppa all'interfaccia tra un metallo ed un elettrolita è stata discussa poco sopra ma da sola non è sufficiente a descrivere, da un punto di vista elettrico, tutti gli eventi che accadono all'interfaccia. Se a questa viene applicato un potenziale continuo vi potrebbe fluire una corrente sotto certe condizioni, il che fa supporre che sia importante considerare la presenza di una resistenza in parallelo alla capacità di cui si è precedentemente discusso. Come per l'elemento capacitivo questa resistenza può essere non lineare con il potenziale applicato. Dato che tale fenomeno si sviluppa in presenza di flusso netto di carica non nullo sarà necessario uscire dalla condizione di equilibrio elettrochimico per caratterizzarlo.

1.2 Cinetica elettrochimica

Quando un elettrolita viene messo in contatto con una superficie metallica ha inizio

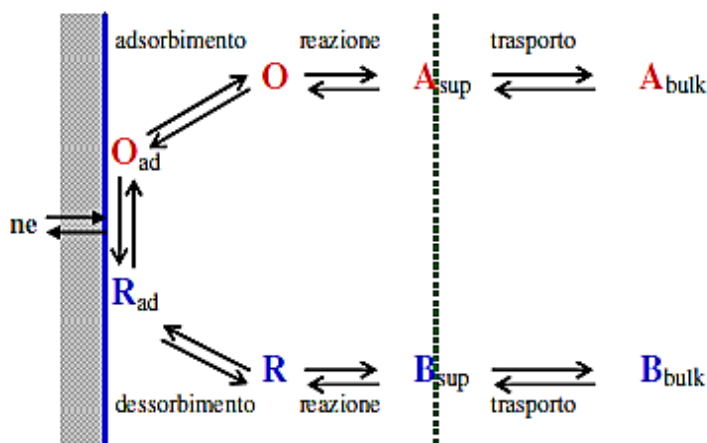


Figura 1.10: Schema dei processi che avvengono tra un elettrolita ed un conduttore elettronico posti in contatto. E' possibile distinguere le fasi di trasporto tra il bulk e l'interfase, quelle di ossidoriduzione in questa zona, quelle di adsorbimento e deadsorbimento sulla superficie del conduttore elettronico.

un processo elettrochimico le cui caratteristiche variano con il tempo.

La cinetica elettrochimica si occupa di studiare nel tempo i fenomeni che caratterizzano tale processo.

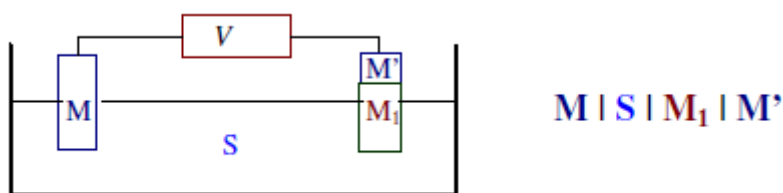
Un processo elettrochimico è l'insieme di una successione di diversi

“stadi”, di cui almeno uno di trasferimento di carica attraverso l'interfaccia: il

Trasferimento Elettronico. Scopo della cinetica elettrochimica è stabilire la natura e la velocità dei vari stadi. I vari processi consecutivi, benchè aventi natura diversa, sono fra loro interconnessi in quanto le condizioni iniziali di ciascuno sono determinate dalle condizioni finali del precedente e il contributo di ciascuno si somma a quello degli altri.

In un biosensore elettrochimico si ha la presenza di queste stesse fasi, dunque il loro studio è d'obbligo. Questo tipo di biosensore può essere modellizzato come una
 Per ricavare informazioni sulla cinetica del processo elettrochimico in esame sarebbe molto comodo poter misurare la differenza di potenziale all'interfaccia $\Delta\phi$. Purtroppo questo è impossibile sia per il suo valore assoluto (a causa della impossibilità di conoscere il $\Delta\chi$), che per quello relativo ad un $\Delta\phi$ di un interfaccia presa come riferimento.

Il sistema elettrochimico più semplice che si possa realizzare è in realtà costituito da almeno tre interfacce. Se si volesse infatti misurare il $\Delta\phi$ attraverso un'interfaccia I/II specie (M1|S), si dovrebbe utilizzare un voltmetro che è dotato di due terminali metallici (M, M'). Un terminale viene collegato al conduttore elettronico (realizzando un'interfaccia I/I specie, M'|M1), mentre l'altro terminale deve essere introdotto nel conduttore ionico, costituendo così un'altra interfaccia I/II specie (M|S), dunque un secondo elettrodo.



I tre $\Delta\phi$ non sono separabili in due contributi indipendenti, relativi cioè distintamente ai

Figura 1.11: Schema di una cella elettrochimica generica (catena galvanica regolarmente aperta)

due elettrodi.

La cella elettrochimica descritta può essere utilizzata per modellizzare efficacemente un biosensore elettrochimico. Nel modello M rappresenterebbe l'elettrodo, M1|M' il riferimento ed S la soluzione utilizzata per la misura (cfr. Capitolo 2)

Acclarato che non esiste alcuna possibilità di conoscere $\Delta\phi$, né una qualche altra grandezza elettrica collegata a $\Delta\phi$ si sa però che esistono alcune interfacce che godono della particolare proprietà di consentire il trasferimento elettronico attraverso

l'interfaccia con elevata velocità (tendenzialmente infinita), per cui vengono classificate come interfacce impolarizzabili.

La loro caratteristica è che il $\Delta\phi$ è costante e dipende solo dalla struttura dell'interfaccia, cioè dalle due fasi che la costituiscono, ma è indipendente dal particolare sistema nel quale tale interfaccia si trova inserita.

Viceversa, un'interfaccia alla quale il trasferimento elettronico sia molto difficile (cioè non avvenga affatto), viene definita interfaccia polarizzabile.

Un'interfaccia tra due metalli è senz'altro impolarizzabile, dato che gli elettroni la possono attraversare con estrema facilità in entrambi i versi, per cui ci si trova nelle condizioni di $R \approx 0$. Peraltro esistono anche alcuni elettrodi che si comportano come interfacce sufficientemente impolarizzabili, quando la costante cinetica del processo catodico k_+ (cioè della reazione da sinistra a destra) e quella del processo anodico k_- (cioè della reazione da destra a sinistra) sono molto elevate.

Allora, nel sistema elettrochimico descritto l'interfaccia $M'|M_1$ è senz'altro impolarizzabile. Supponendo che lo sia anche l'interfaccia $M|S$, allora sarà possibile misurare le variazioni di $\Delta\phi$ attraverso l'interfaccia $M|S$, rispetto, ad esempio, alla condizione di equilibrio, e ricavare importanti informazioni sulla cinetica del processo elettrochimico in esame.

Si supponga di avere a disposizione un'interfaccia $M|S$ impolarizzabile e di poter accoppiare con questa stessa interfaccia tutta una serie di interfacce $M_i|S$ (immaginando per semplicità che utilizzino tutte la stessa soluzione S).

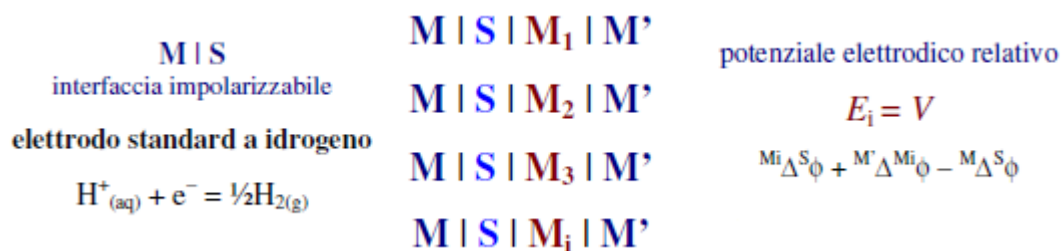


Figura 1.12: Schema delle interfacce si cui si misura il potenziale V con la reazione del relativo elettrodo di riferimento (H_2/H^+) e ipotesi sull'interfaccia $M|S$.

Il valore sperimentale che si misura per ciascuno di questi sistemi elettrochimici E_i , viene definito potenziale elettrodo relativo all'interfaccia usata come riferimento^[3]. Come interfaccia di riferimento è stata scelta l'interfaccia impolarizzabile alla quale avviene il processo relativo alla coppia redox H^+/H_2 , con ciascuna specie chimica nel corrispondente stato standard (elettrodo standard ad idrogeno).

Il valore del potenziale elettrodico relativo non riflette però il valore relativo del $\Delta\phi$ a causa della presenza di tre interfacce. Dal punto di vista termodinamico, in condizioni di equilibrio elettrochimico il dato sperimentale E_i viene definito forza elettromotrice del sistema elettrochimico ed è collegato alla variazione di energia chimica libera del processo di riduzione ΔrG del processo chimico complessivo, che però non è la somma dei due processi redox che avvengono alle due interfacce.

Esiste una relazione matematica molto importante tra il valore del potenziale elettrodico E e le attività delle specie chimiche che partecipano al processo redox che avviene all'interfaccia in condizioni di equilibrio elettrochimico. Essa è nota come equazione di Nernst:

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{Ox}}{a_R} \right) \quad (1.18)$$

1.2.1 Polarizzazione di una cella elettrochimica

A circuito aperto una cella elettrochimica eroga una forza elettromotrice corrispondente alla variazione di energia libera della reazione globale. Quando passa corrente non si è più in condizioni di equilibrio e si hanno modificazioni in prossimità dell'elettrodo e/o all'elettrodo stesso. Tale fenomeno si definisce polarizzazione.

A ciascuna superficie elettrodica si ha un processo di trasferimento elettronico del tipo schematizzato nella generica di ossidoriduzione:



Si ha una corrente anodica se il processo decorre nel verso di ossidazione, mentre si ha una corrente catodica per il verso di riduzione della reazione. La differenza tra la somma delle correnti di tutti i processi di ossidazione (considerate positive) e la somma di tutte le correnti dei processi di riduzione (considerate negative) e la corrente esterna, cioè quella che viene misurata sperimentalmente per l'elettrodo in questione. Questa può assumere anche valore zero quando il potenziale dell'elettrodo è uguale al valore di equilibrio.

In entrambi i casi il potenziale dell'elettrodo è diverso da quello di equilibrio e la differenza si chiama sovratensione (η). Con un'adeguata strumentazione può essere misurato il suo potenziale, sia in condizioni di equilibrio (E_{eq}), cioè quando non si ha passaggio di corrente attraverso l'interfaccia elettrodica, che in condizioni di non equilibrio (E), cioè quando si ha il passaggio di corrente elettrica attraverso l'interfaccia. Si può quindi misurare la sovratensione per l'elettrodo in esame:

$$\eta = E - E_{eq} \quad (1.20)$$

Il valore complessivo della sovratensione di un singolo elettrodo è frutto di una serie di contributi che possono essere classificati a seconda della tipologia dei vari processi che li determinano:

- di barriera, o attivazione, o trasferimento elettronico: relativa allo stadio di TE attraverso l'interfaccia elettrodo-soluzione, η_t
- di reazione: quando il processo elettrochimico coinvolge reazioni chimiche antecedenti il TE o successive al TE, η_r
- di trasporto di materia, generalmente di diffusione: quando il rifornimento di A all'elettrodo (o lo smaltimento di B) è lento, η_d
- di trasporto di carica: quando si ha scambio di atomi metallici con i corrispondenti ioni in soluzione, η_c .

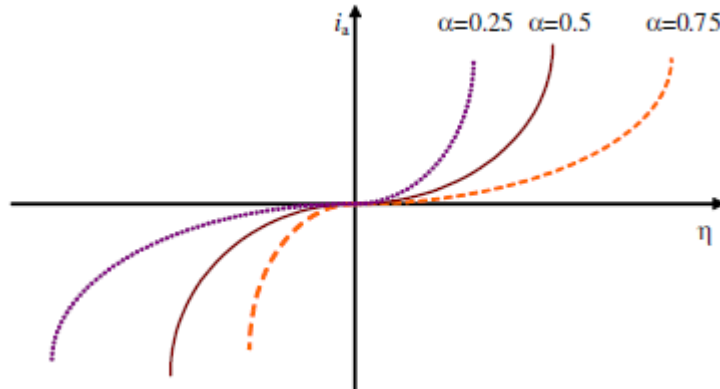
Si ha quindi che la sovratensione è data da:

$$\eta = \eta_t + \eta_r + \eta_d + \eta_c \quad (1.21)$$

Da ciò, dato un potenziale eccedente la condizione di equilibrio si può immaginare la presenza di tre correnti parallele in serie con quella di diffusione. Per un elettrodo con potenziale vicino a quello di equilibrio la sovratensione di trasferimento elettronico (η_t) tende a dominare gli altri contributi, mentre se si spinge il potenziale troppo lontano da quello di equilibrio la diffusione dei reagenti può diventare un fattore limitante rendendo la sovratensione di diffusione (η_d) dominante.

Per la gran parte delle applicazioni pratiche gli altri due fattori di sovratensione sono poco significanti, in particolare per tutte le applicazioni di tipo biologico.

Per un elettrodo in equilibrio le reazioni di ossidazione e riduzione producono



correnti uguali ed opposte che danno luogo ad un trasferimento netto di carica paria a zero. Il valore assoluto di tali correnti, per unità di superficie è detto densità di corrente di

Figura 1.13: Diagramma della corrente i in funzione della sovratensione η per diversi valori del parametro α .

scambio (i_0). Tale grandezza viene determinata sperimentalmente sottoponendo l'elettrodo a potenziali prossimi a quello di equilibrio che rendono possibile l'applicazione dell'equazione di Butler-Volmer:

$$i = i_0 \left[e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF\eta}{RT}\right)} - e^{\left(\frac{(\alpha nF\eta)}{RT}\right)} \right] \quad (1.22)$$

Dove α è un parametro detto coefficiente di simmetria di barriera anodica, η è la sovratensione, n il numero di elettroni scambiati nelle reazioni di ossido-riduzione, F è la costante di Faraday, R quella dei gas e T è la temperatura in gradi Kelvin.

Viene misurata la corrente (i) e i parametri sono tutti noti in base al tipo di elettrolita utilizzato. La densità della corrente di scambio dipende molto dal tipo di materiale di cui è composto l'elettrodo, dunque la sua scelta è molto importante dato che cercare correnti elevate applicando tensioni più alte può provocare reazioni elettrochimiche e la generazione di gas all'interfaccia. E' sempre preferibile limitare quanto più possibile l'escursione della tensione dal punto di equilibrio.

1.2.2 Limite di linearità di Schwan

Nell'ambito della cinetica elettrochimica una trattazione molto importante è stata quella di Schwan negli anni '60 [8]. Essa sottolinea le differenze che intercorrono nel comportamento di elettrodi metallici in condizioni di corrente continua (DC) e

alternata (AC) e stabilisce un limite di corrente sopra al quale questi sistemi assumono comportamento non lineare.

Ciò che si intende è che la misura dell'impedenza in sistemi biologici è influenzata dall'elettrodo dipendentemente dalle condizioni in cui si effettua la misura in termini di frequenza e di valore assoluto della corrente applicata.

Elettrodi che hanno una buona polarizzazione^v AC spesso non dimostrano altrettanto in regime DC e viceversa.

La risposta degli elettrodi può essere caratterizzata dalla loro impedenza di polarizzazione, misurata applicando una corrente sinusoidale e misurando la relativa tensione prodotta ai capi dell'elettrodo. Tipicamente tale risposta è modellizzabile con una serie RC dove sia la resistenza che la capacità variano il loro valore in funzione della frequenza della corrente in ingresso (cfr. Paragrafo 4.2).

L'impedenza di polarizzazione dell'elettrodo è indipendente dalla corrente AC applicata finché questa ha valori di densità sufficientemente bassi. Il fulcro del lavoro di Schwan è la definizione di un limite di corrente sopra al quale questa linearità viene a perdersi in modo da saper distinguere nelle misure di impedenza su campioni biologici gli effetti dovuti all'elettrodo da quelli legati al campione in esame. Tale lavoro ha una enorme importanza poiché molti dispositivi basati sull'erogazione di alte densità di corrente sono utilizzati in campo medico a contatto con tessuti biologici, si pensi ad esempio ai peacemaker.

Per definire il limite di linearità Schwan ha condotto diversi esperimenti con elettrodi planari circolari di diversi metalli. In questi esperimenti è stato utilizzato come elettrolita una soluzione di *KCl* di conduttività nota inserita in un cilindro con alle estremità gli elettrodi in questione.

Il risultato di queste prove è stato il decrescere dell'impedenza di sopra un certo livello di densità di corrente (la capacità di polarizzazione (C_p) cresce mentre la resistenza (R_p) decresce).

^v Con buona polarizzazione si intende la capacità di un elettrodo di comportarsi in modo faradico, senza presentare dunque effetti capacitivi, nel regime di tensione e corrente in cui viene mantenuto per eseguire la misura.

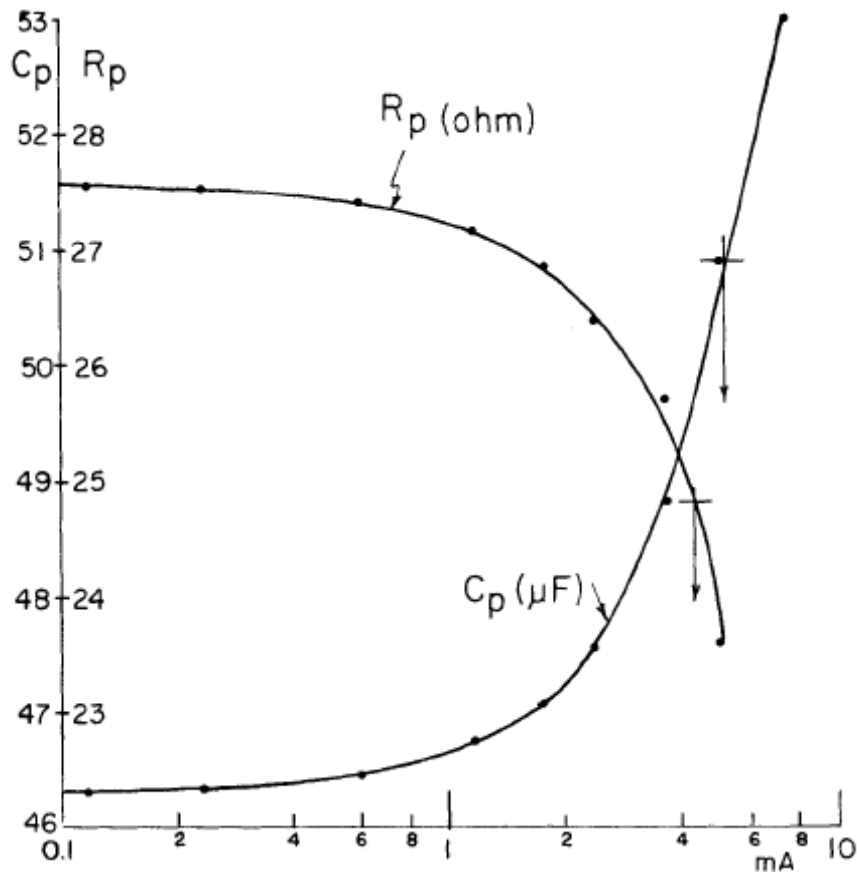


Figura 1.14: Grafico della resistenza e della capacit  di polarizzazione in funzione della corrente applicata all'elettrodo. Le frecce indicano il limite di linearit  per la resistenza e per la capacit  di polarizzazione.

Il limite di linearit    stato dunque definito come quel valore di densit  di corrente in corrispondenza del quale C_p e R_p hanno una variazione superiore al 10% del loro valore a bassa densit  di corrente (indicati dalle frecce per la resistenza e per la capacit  di polarizzazione in figura 1.12).

Un altro merito del lavoro di Schwan   quello di definire dei metodi di correzione dell'impedenza misurata imponendo valori di corrente sopra il limite di linearit  per l'elettrodo utilizzato:

- **Tecnica di sostituzione:** si sostituisce il campione di cui si vuole determinare l'impedenza con uno di impedenza nota. Da quanto misurato si riuscir  dunque ad isolare l'impedenza di polarizzazione dell'elettrodo e ad ottenere l'impedenza del campione biologico per sottrazione.

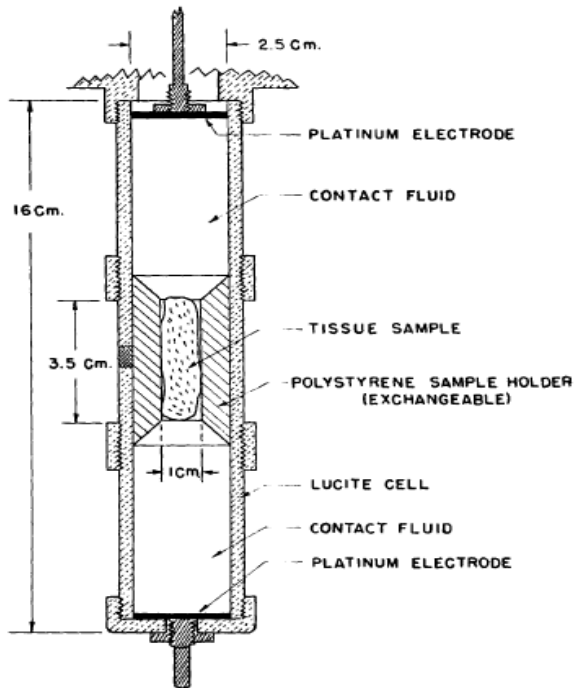


Figura 1.15: Cella elettrochimica utilizzata da Schwan per le misure di impedenza sui campioni biologici.

- Tecnica di variazione della distanza dell'elettrodo: se è possibile variare la distanza tra gli elettrodi o la geometria del campione tra di essi allora per le due celle con le diverse proprietà geometriche si avrà la stessa impedenza di polarizzazione sommata ad una diversa impedenza del campione biologico:

$$Z_1 = Z_p + Z_{camp1} \quad (1.23)$$

$$Z_2 = Z_p + Z_{camp2} \quad (1.24)$$

A questo punto sottraendo le due impedenze misurate se ne otterrà una indipendente da quella di polarizzazione:

$$Z_1 - Z_2 = Z_{camp2} - Z_{camp1} \quad (1.25)$$

- Tecnica della variazione in frequenza: se non è possibile variare le caratteristiche della cella elettrochimica utilizzata allora si distinguerà il contributo dell'impedenza di polarizzazione dell'elettrodo studiando l'impedenza misurata in frequenza. In tal modo è possibile estrapolare, a frequenze in corrispondenza delle quali sono dominanti, i diversi termini e per sottrazione eliminare i contributi indesiderati anche alle altre frequenze.

- Tecnica dei quattro elettrodi: l'utilizzo di un setup sperimentale a quattro elettrodi rende possibile la misura del potenziale tra due degli elettrodi utilizzando un voltmetro ad alta impedenza di ingresso, senza iniettare corrente nel sistema (Figura 1.16). Questo rende la misura insensibile alla polarizzazione degli elettrodi in quanto questa è proporzionale alla corrente che li attraversa. Il rapporto tra il potenziale misurato e la corrente che passa attraverso il campione è identica all'impedenza del campione ed indipendente dall'impedenza di polarizzazione degli elettrodi attraverso i quali scorre la corrente.

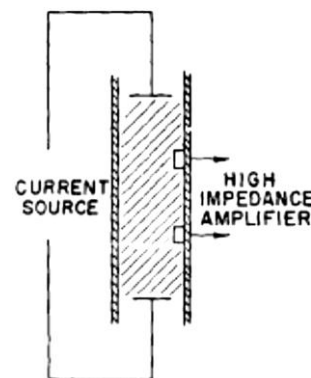


Figura 1.16: Schema di funzionamento della tecnica a 4 elettrodi.

1.2.3 Tipi di elettrodi

Gli elettrodi sono classificati in base al tipo di processo redox che “governa” il potenziale elettrodico. Naturalmente il potenziale elettrodico è dato dall’equazione di Nernst relativa al processo redox che avviene, a condizioni che il processo avvenga in modo reversibile e che l’elettrodo sia in condizioni di equilibrio. Ciò significa che il trasferimento elettronico può avvenire in entrambi i versi (dal conduttore elettronico a quello ionico e viceversa) con una velocità abbastanza elevata (reversibilità elettrochimica significa appunto questo: trasferimento elettronico in entrambi i versi con elevata velocità) e, in condizioni di equilibrio, non si ha alcun trasferimento elettronico netto attraverso l’interfaccia. In molti casi il conduttore elettronico è un metallo che partecipa al predetto processo redox che governa il potenziale elettrodico.

1.2.3.1 Elettrodi di I specie

Il processo redox in questo tipo di elettrodi è del tipo:



si tratta di un elettrodo costituito da un metallo M immerso in una soluzione che contiene i suoi ioni M^{n+} , cioè un sale costituito dal catione M^{n+} e da un qualche anione, che è ininfluente dal punto di vista elettrochimico. In questo caso il metallo M svolge il ruolo di conduttore elettronico, cioè di serbatoio di elettroni (che possono andare e venire dal relativo livello Fermi), ma è anche la forma ridotta della coppia redox, cioè partecipa al trasferimento elettronico.

Normalmente il metallo M utilizzato è puro, per cui si trova nel proprio stato termodinamico standard (che è definito proprio in questo modo: l'elemento puro nel proprio stato naturale alla temperatura in esame). Ciò significa che $a_M = 1$, per cui l'equazione di Nernst viene espressa normalmente in forma semplificata:

$$E = E_{M^{n+}/M}^\theta + \frac{RT}{nF} \ln(a_{M^{n+}}) \quad (1.27)$$

Naturalmente, se il metallo M non fosse puro (ad esempio una sua lega) $a_M < 1$, per cui il suo valore andrebbe inserito nell'equazione di Nernst.

Esistono molti esempi di elettrodi di I specie. Ad esempio un filo di Cu in una soluzione di solfato di rame $CuSO_4$, un filo di Ag in una soluzione di nitrato di argento $AgNO_3$, una lamina di Cd in una soluzione di cloruro di cadmio $CdCl_2$, e così via.

1.2.3.2 Elettrodi di II specie

Un elettrodo di II specie è costituito da un metallo (che ha sempre il doppio ruolo, di conduttore elettronico e di specie ridotta del processo redox), in presenza di un suo sale poco solubile. Questo è posto a contatto con una soluzione che contiene un sale solubile formato dallo stesso anione del sale insolubile e da un altro catione, che è



$$E = E_{Ag^+/Ag}^\theta + \frac{RT}{F} \ln(a_{Ag^+}) \quad (1.29)$$

indifferente.

Uno degli esempi più noti è l'elettrodo ad argento-argento cloruro $Ag/AgCl$. Il processo redox in questo tipo di elettrodi è ancora dello stesso tipo di quello degli elettrodi di I specie, ovverosia il trasferimento elettronico coinvolge anche in questo caso il metallo elettrodico e gli ioni metallici in soluzione. Pertanto per l'elettrodo in esame avremo:

In questo caso però, l'attività dell' Ag^+ non è indipendente, cioè non può essere fissata arbitrariamente, ma dipende dall'attività degli ioni Cl^- attraverso il prodotto di solubilità di $AgCl$ ($K_{PS} = a_{Ag^+} \cdot a_{Cl^-}$). Per cui, nell'equazione di Nernst si può sostituire a_{Ag^+} con K_{PS}/a_{Cl^-} , per cui si ha:

$$\begin{aligned} E &= E_{Ag^+/Ag}^\theta + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{K_{PS}}{a_{Cl^-}} \right) = E_{Ag^+/Ag}^\theta + \frac{RT}{F} (\ln K_{PS} - \ln a_{Cl^-}) = \\ &= E_{AgCl^+/Ag,Cl^-}^\theta + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{1}{a_{Cl^-}} \right) \end{aligned} \quad (1.30)$$

Come si vede dall'espressione finale dell'equazione di Nernst, il potenziale elettrodico dipende dalla attività (concentrazione) del cloruro, per cui si usa dire che questo elettrodo è "reversibile" ai cloruri.

Un modo, largamente utilizzato, per realizzare un tale elettrodo consiste nel prendere un filo di Ag (puro), ricoprirlo di $AgCl$ solido, che si può fare facilmente per via elettrochimica (elettrolizzando il filo in una soluzione di HCl). Una volta ricoperto l'argento di uno strato di $AgCl$, si introduce in una soluzione di cloruri (KCl) e l'elettrodo è costituito.

Gli elettrodi di seconda specie sono molto stabili e altamente reversibili, per cui costituiscono delle ottime interfacce impolarizzabili. Per tale motivo vengono usati come elettrodi di riferimento nelle misure sperimentali.

Quasi sempre si utilizza una soluzione satura di KCl , cioè in presenza di un eccesso di KCl , il che garantisce che la concentrazione e, quindi, l'attività degli ioni Cl^- rimangano costanti nel tempo, per cui anche il potenziale elettrodico è costante, come si richiede per un buon riferimento. Naturalmente esistono anche molti casi di elettrodi per i quali il conduttore elettronico svolge solo il compito di serbatoio di elettroni, mentre le specie chimiche che partecipano al processo redox sono presenti nel conduttore ionico (soluzione elettrolitica o altro). In questo caso, il conduttore elettronico deve essere assolutamente inerte dal punto di vista chimico, rispetto a

tutte le specie coinvolte nel processo redox. Per tale motivo, si usa molto spesso il *Pt*, che è tra i metalli più inerti, oppure conduttori a base di carbonio (carbonio vetroso o grafite).

L'elettrodo Ag/AgCl ha alcune importanti caratteristiche che lo hanno reso uno tra i più comuni elettrodi utilizzati in elettrochimica:

- Possiede un potenziale elettrodico basso e stabile;
- Ha una ridotta impedenza di interfaccia;
- E' caratterizzato da un basso valore di resistenza al trasferimento di carica e può dunque essere considerato non polarizzabile.

Come discusso nel paragrafo 1.2, per ottenere informazioni su un elettrodo è necessario "accoppiarlo" con un secondo, costituendo in questo modo una cella elettrochimica. Nel caso in cui il conduttore ionico sia lo stesso per i due elettrodi (la medesima soluzione elettrolitica) non persistono problemi di collegamento elettrica.

Molto spesso però i due conduttori ionici sono diversi e devono essere mantenuti separati per evitare reazioni chimiche dirette tra i componenti degli stessi (ad esempio due soluzioni elettrolitiche che non possono essere mescolate). In questo caso il contatto elettrico tra i due conduttori ionici deve essere realizzato in modo tale da garantire il veloce trasporto di cariche elettriche, che deve essere però reversibile. Se abbiamo a che fare con due soluzioni elettrolitiche non si può pensare di mettere un filo metallico come contatto, non solo perché si costituirebbero due nuove interfacce, che renderebbero il sistema elettrochimico affatto diverso da quello originario, ma anche perché difficilmente il trasferimento di carica potrebbe essere reversibile.

Un modo molto diffuso di realizzazione del contatto elettrico tra due soluzioni elettrolitiche è quello di frapporre un setto poroso. Il setto poroso, normalmente di vetro sinterizzato, è dotato di pori sufficientemente larghi da lasciar passare facilmente gli ioni e garantire quindi un buon contatto elettrico, senz'altro reversibile, dato che gli ioni possono muoversi senza difficoltà in entrambe le direzioni. D'altra parte il setto impedisce il mescolamento delle due soluzioni, salvo la lenta diffusione attraverso i pori, che però è generalmente più lenta del tempo necessario per le indagini.

Bibliografia

1. Encyclopedia of Electrochemistry, (Malestrom).
2. D. A. Borkholder, "Cell Based Biosensors using Microelectrodes", Stanford University, 1998.
3. Peter Gründler, "Chemical Sensors An Introduction for Scientists and Engineers", Ed. Springer, 2007.
4. L. Calligaro, A. Mantovani, "Chimica per ingegneria", Ed. Libreria Cortina, 1989.
5. A. Post Baracchi, A. Tagliabue, "Chimica Progetto Modulare", Ed. Lattes, 2005.
6. A. Baracca, M. Fischetti, R. Rigatti, "Fisica e Realtà 2 Forze, Campi, Movimento", Ed. Cappelli, 1999.
7. H. Saechtling, Manuale delle materie plastiche, Ed. Tecniche nuove, 2006
8. H. P. Schwan, "Electrode polarization impedance and measurements in biological materials", Annals of the New York Academy of Sciences, 1968 - Wiley Online Library.
9. E. T. McAdarns, A. Lackermeier, J. A. McLaughlin, D. Macken, J. Jossinet, "The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface", Biosensors and Bioelectronics Volume 10, Issues 1-2, 1995, Pages 67-74.

CAPITOLO 2: BIOSENSORI

2.1 Definizione e classificazione^{[1][2]}

Un sensore chimico è un dispositivo integrato capace di fornire un'informazione quantitativa o semiquantitativa sulla presenza di un determinato composto chimico, detto substrato o analita, in un certo ambiente. Questa capacità deriva dall'abilità di trasdurre informazioni legate alla concentrazione di substrato risultante da una reazione chimica, in un segnale misurabile, sia esso elettrico o di altra forma. Ciò richiede, normalmente, la presenza di un "riconoscitore" chimico (recettore), che subisce una qualche modificazione chimica in presenza del substrato, ed un trasduttore chimico-fisico, che trasforma la modificazione chimica del recettore in un segnale di natura differente. Un sensore elettrochimico è un sensore che utilizza un elettrodo (cfr. Paragrafo 1.2.3) come trasduttore dei fenomeni chimici, per cui il segnale risultante è di forma elettrica come un potenziale, una corrente oppure un'impedenza. I sensori elettrochimici sono caratterizzati in genere da elevata sensibilità, semplicità d'uso e basso costo. Essi fanno uso di elettrodi modificati chimicamente, la cui superficie viene cioè funzionalizzata, in generale mediante adsorbimento chimico, con una qualche specie capace di interagire con l'analita desiderato. Naturalmente tale specie deve rispondere al requisito di selettività del sensore, cioè deve reagire unicamente con l'analita di interesse, per cui lo sforzo di progettazione è anche orientato all'individuazione di un opportuno recettore e del modo per depositarlo sulla superficie dell'elettrodo, garantendo la presenza di un cammino conduttivo.

Un biosensore è un sensore (chimico o elettrochimico) nel quale il recettore utilizza un meccanismo biochimico, per sua intrinseca natura molto selettivo. Il segnale dell'attività del processo biochimico viene trasdotto in un'altra forma chimica oppure in forma elettrica grazie ad un elettrodo. In questo caso il sensore viene detto biosensore elettrochimico.

Un biosensore elettrochimico è un sensore che utilizza come elemento riconoscitore un composto biologico (recettore biochimico), che è in diretto contatto fisico con un trasduttore elettrochimico. Per tale motivo il reagente biospecifico viene immobilizzato su un opportuno elettrodo, capace di dare un responso elettrochimico correlato all'azione del recettore biochimico.

Si tratta quindi di realizzare degli elettrodi chimicamente modificati, in grado di “ospitare” adeguatamente il recettore biochimico; ciò significa poter depositare sulla

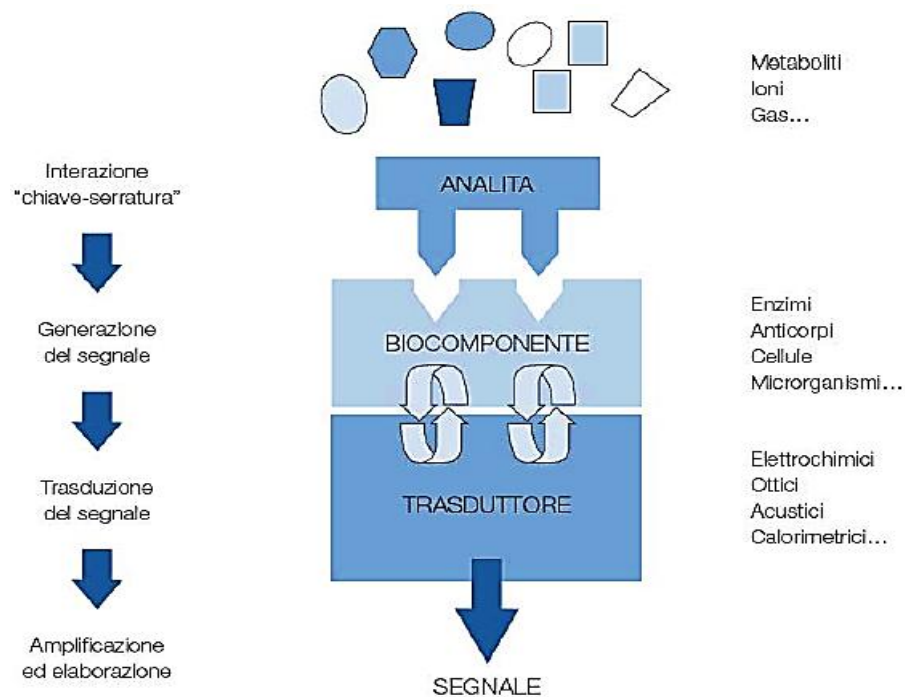


Figura 2.1: Schema descrittivo della struttura di un generico biosensore in cui la presenza e concentrazione dell'analita viene rilevata tra le altre sostanze grazie alla biocomponente immobilizzata sulla superficie del sensore. Tale legame chimico viene trasdotto in un segnale elettronico in uscita che verrà poi elaborato.

superficie elettrodica una qualche sostanza in grado di garantire la comunicazione elettrica e di fissare il recettore, garantendone l’attività naturale. La tendenza è quella di realizzare biosensori facili da usare e possibilmente poco costosi, perché possano essere realizzati anche nella forma monouso.

La tecnologia dei biosensori utilizza principalmente due metodologie di rilevazione:

1. Riconoscimento biocatalitico

È basato su una reazione chimica catalizzata da una macromolecola biologica. Il substrato viene consumato continuamente dal biocatalizzatore incorporato nel sensore e questo processo viene monitorato da un detector integrato. I più frequenti biocatalizzatori sono enzimi, cellule integrali e tessuti.

Generalmente il substrato reagisce con qualche altra sostanza chimica per azione del biocatalizzatore, producendo uno o più prodotti: il trasduttore può

essere sensibile al consumo del co-substrato^{vi}, ad uno dei prodotti della reazione o anche al possibile trasferimento elettronico tra il sito attivo di un enzima redox e l'elettrodo.

2. *Riconoscimento per bioaffinità*

In questo caso si ha un'interazione diretta tra il substrato e la macromolecola biologica catalizzatrice per cui si raggiunge la condizione di equilibrio e non si ha consumo del substrato. Le interazioni possono essere del tipo anticorpo-antigene o del tipo recettore-antagonista-agonista.

La classificazione dei sensori elettrochimici può essere fatta in modi diversi, a seconda dell'aspetto che viene considerato: il tipo di analita, il tipo di misura elettrochimica (o più in generale chimico-fisica) o il tipo di recettore nonché la tipologia di componente biologica utilizzata ed il metodo di immobilizzazione utilizzato.

2.1.1 *Metodo di rilevazione*

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

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

^{vi} Co-substrato: sostanza che reagisce con il substrato grazie alla componente biologica che ne consente o ne accelera la reazione. Il suo consumo è direttamente legato a quello del substrato.

- Altri biosensori basati prevalentemente su emissione o assorbimento di radiazioni.

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

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

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

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

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

2.1.2 Componente biologica

Nel caso dei biosensori, un'importante classificazione può essere fatta in base alla componente biologica utilizzata. Infatti è possibile utilizzare diverse componenti quali:

- Enzimi
- Microorganismi
- Tessuti
- Anticorpi
- Acidi nucleici

Ci si concentrerà in particolar modo sui biosensori ad enzimi (cfr. Paragrafo 3.1) che per lo più sfruttano il meccanismo del riconoscimento biocatalitico (cfr. Paragrafo 2.2).

2.1.3 Performance

Per valutare la performance di un biosensore è necessaria la definizione di alcuni criteri, in grado di evolversi insieme alle tecnologie con cui questi dispositivi vengono realizzati, ma comunque in grado di consentire il confronto tra di essi. I più importanti tra questi parametri sono i seguenti:

1. Selettività

Consiste nell'abilità del sensore di discriminare tra diversi substrati. È l'essenza stessa di un biosensore ed è definita dal tipo di materiale biologico utilizzato (enzimi, anticorpi o acidi nucleici) anche se spesso il trasduttore contribuisce ad essa.

2. Range di sensitività

Ogni tecnica analitica necessita della specificazione del range di concentrazioni del substrato in grado di poter essere rilevate. Di particolare importanza è il range in cui la risposta è lineare. Il limite inferiore del range è il limite di detection.

Solitamente si ha l'esigenza che il limite di detection sia sub-millimolare (10^{-5} M) ma in casi particolari si può avere l'esigenza che sia anche femtomolare.

3. *Riproducibilità*

Questo fattore è collegato principalmente alla difficoltà di riprodurre la qualità delle preparazioni biologiche, compito molto più complesso che con le ordinarie sostanze chimiche.

I controlli di qualità effettuati da fabbricanti e fornitori del materiale biologico utilizzato (enzimi, cellule, microorganismi, anticorpi, DNA) danno un'idea abbastanza precisa del numero di unità funzionali presenti nelle loro preparazioni ma sfortunatamente la gran parte di queste sono instabili e tendono a perdere la loro funzionalità dopo brevi periodi di tempo.

Esattamente per questo motivo la realizzazione di un biosensore non può prescindere da una accurata caratterizzazione della componente biologica ivi immobilizzata.

Ogni biosensore dovrebbe garantire una riproducibilità almeno del 5-10% tra caratterizzazioni successive per essere considerato valido e affidabile.

4. *Tempo di risposta e di recupero*

Il tempo di risposta dei biosensori di norma è maggiore di quello dei sensori chimici, anche a causa della quasi assenza di preparazione del campione da analizzare.

Il tempo di recupero è definito come il tempo necessario prima che il biosensore sia in grado di analizzare il campione successivo.

5. *Durata (periodo di vita)*

Ogni composto biologico si degrada con il tempo, in particolare se estrapolato dal suo ambiente naturale. Questo implica che uno dei maggiori svantaggi dei biosensori è che la loro componente biologica ha una vita media piuttosto breve e necessita di essere sostituita. Tutti gli studi sui biosensori sono corredati da grafici che mostrano la variazione delle risposte in funzione del tempo.

2.1.4 Metodo di immobilizzazione

Come già spiegato sopra, per realizzare un buon biosensore la componente biologica deve essere attaccata correttamente sul trasduttore (immobilizzazione). Di seguito descriviamo i metodi utilizzati a questo scopo. Le tecniche normalmente utilizzate sono cinque:

1. Adsorbimento

E' il metodo più semplice e necessita di una preparazione minima.

Molte sostanze sono in grado di adsorbire enzimi sulla loro superficie, non sono necessari reagenti ne fasi di pulizia e non si ha una eccessiva degradazione degli enzimi. Questa tecnica può essere suddivisa in due classi: L'adsorbimento fisico e quello chimico. Il primo è caratterizzato da legami di van der Waals e ad idrogeno, essendo dunque più debole del secondo, caratterizzato invece da legami covalenti.

L'equazione più utilizzata per modellare tale processo è l'isoterma di adsorbimento di Langmuir che lega la frazione di superficie ricoperta (θ) con i parametri cinetici. Essa definisce le velocità di adsorbimento (v_a) e di deadsorbimento (v_d) in questo modo:

$$v_a = k_a p_a N(1 - \theta) \quad v_d = k_d N\theta \quad (2.1)$$

All'equilibrio le due velocità si uguagliano dunque la frazione di superficie ricoperta sarà:

$$\theta = \frac{K p_a}{(1 + K p_a)} \quad (2.2)$$

Dove p_a è la pressione dell'adsorbente, k_a è la costante di velocità dell'adsorbimento e k_d del deadsorbimento.

I materiali adsorbiti sono molto sensibili a variazioni di pH, di temperatura, di forza ionica e di substrato.

2. Microincapsulamento

In questo metodo, tipico dei primi biosensori per il glucosio, viene utilizzata una membrana inerte per intrappolare il biomateriale sul trasduttore. I principali tipi di membrane utilizzate sono quelle in acetato di cellulosa (membrane per dialisi), quelle in policarbonato, quelle di collagene, quelle in Teflon e quelle in Nafion o in poliuretano.

I vantaggi di questa tecnica sono insiti nella sua adattabilità ed affidabilità. Inoltre, l'affidabilità dell'enzima è mantenuta aumentandone la stabilità nei confronti di variazioni delle condizioni del substrato e proteggendolo da contaminazioni e biodegradazione. Con questa tecnica poi, in caso di contatto con il paziente la membrana impedisce infezioni, mantenendo la possibilità di legare trasduttore e componente biologica attraverso molecole in grado di condurre elettroni come il polipirrolo.

3. *Intrappolamento*

Viene effettuato preparando un gel polimerico in una soluzione contenente il biomateriale. L'enzima viene dunque intrappolato nella matrice del gel. Il polimero più utilizzato è la poliacrilammide. I problemi più grossi di questa tecnica sono la formazione di grandi barriere che inibiscono la diffusione del substrato, questo rallenta la reazione e quindi aumenta il tempo di risposta dell'elettrodo. Il secondo problema è la perdita di attività dell'enzima attraverso i pori del gel, il che può essere risolto mediante cross-linking.

4. *Cross-linking*

Questo metodo utilizza agenti bifunzionali per legare il biomateriale ad un supporto solido ed è un buon metodo per stabilizzare gli enzimi adsorbiti. Gli svantaggi derivano dal fatto che questi legami danneggiano gli enzimi e limitano la diffusione del substrato. Inoltre questa tecnica offre una scarsa forza meccanica.

5. *Legame covalente*

Alcuni gruppi funzionali dell'enzima, non essenziali per l'attività catalitica, possono essere legati covalentemente alla matrice di supporto (trasduttore o membrana). Il vantaggio principale è che l'enzima non viene rilasciato durante l'utilizzo e che è nota la sua orientazione spaziale.

Nella pratica è raro che si utilizzi solo uno di questi metodi, molto più spesso ne viene utilizzata una combinazione.

2.2 Biosensori a riconoscimento biocatalitico

L'uso di enzimi come recettori è legato alla presenza nel corpo umano di alcune migliaia di enzimi che servono a catalizzare specifiche bioreazioni con una elevata selettività, per cui possono essere eccellenti componenti di biosensori.

In generale un enzima è una macromolecola complessa composta in larga parte da proteine e che solitamente contiene un sito attivo (cfr. Paragrafo 3.1).

Nella gran parte degli enzimi ed in particolare in quelli utilizzati nei biosensori il meccanismo di catalisi è il seguente:



Dove S è il substrato, E l'enzima, ES il complesso enzima-substrato e P i prodotti della catalisi. Si indicherà inoltre con k_1 e k_{-1} le velocità di formazione e distruzione di ES e con k_2 quella di catalisi (da ES a $E+P$). La trattazione che segue fa riferimento agli studi di cinetica enzimatica di Michaelis e Menten (cfr. Paragrafo 3.1.3) ed è volta ad ottenere un'indicazione sul tempo che occorre al biosensore per ottenere un risultato di rilevazione.

Introducendo l'approssimazione di stato stazionario^{vii} al sistema enzima-substrato si avrà che le velocità di formazione e di rottura di ES si uguagliano, ottenendo dunque che

$$k_1[S][E] - k_{-1}[ES] = k_2[ES] \quad (2.4)$$

Da ciò, considerando la concentrazione totale di enzima $[E_0]$ (che è nota) piuttosto di quella parziale $[E]$ si avrà:

^{vii} Stato stazionario: stato in cui il numero di complessi ES formati è uguale a quello dei complessi ES rotti.

$$k_1[S][E_0] - k_1[S][ES] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (2.5)$$

Risolvendo l'equazione rispetto ad $[ES]$ e ponendo $k_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ (detta costante di Michaelis) si ottiene:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{k_M + [S]} \quad (2.6)$$

da cui la velocità di reazione (formazione dei prodotti) è $v = k_2[ES]$.

In base al rapporto tra la concentrazione del substrato e la costante di Michaelis per il particolare sistema in esame è quindi possibile determinare la velocità di reazione.

Dalla velocità di reazione è quindi possibile determinare il tempo minimo necessario al biosensore per fornire un risultato affidabile e misurare il segnale del trasduttore a transiente ultimato.

Quando si utilizzano enzimi come recettori si devono considerare due questioni particolarmente importanti:

- l'immobilizzazione dell'enzima sulla superficie elettrodica;
- il trasferimento elettronico tra elettrodo ed il cuore redox dell'enzima.

L'adsorbimento dell'enzima sulla superficie elettrodica è solo uno dei metodi possibili per l'immobilizzazione di questo ma richiedendo un protocollo molto semplice (la sola deposizione dell'enzima in soluzione sulla superficie elettrodica per un determinato periodo di tempo) viene spesso utilizzata.

Questa tecnica spesso non garantisce la necessaria stabilità dell'enzima immobilizzato e neppure la sua orientazione, di conseguenza non si riesce ad ottenere l'ottimale esposizione dei siti redox al substrato. Inoltre il contatto diretto con il metallo può provocare la denaturazione dell'enzima nel giro di pochi minuti. A questo scopo spesso si modifica preventivamente la superficie elettrodica ricoprendola con uno strato di molecole organiche che preservi l'enzima dal contatto con il metallo e dalla conseguente denaturazione.

2.2 Generazioni di biosensori

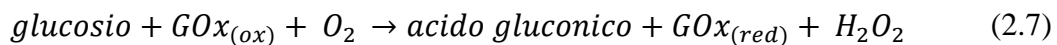
I biosensori elettrochimici ad enzimi si sono sviluppati nel tempo in tre generazioni, diverse per le modalità con cui si ottiene il trasferimento elettronico tra l'elettrodo e la reazione redox prodotta dall'effetto biocatalitico dell'enzima.

2.2.1.1 Biosensori di I generazione

I biosensori della I generazione funzionano in modo indiretto, ossia l'enzima reagisce con il substrato producendo una specie chimica secondaria che è in grado di interagire con l'elettrodo. L'elettrodo quindi interagisce con questo prodotto secondario, misurando la corrente che è correlata alla concentrazione del composto secondario, legata a quella del substrato. Questo sistema ha però due limiti: da una parte l'efficienza della produzione della specie secondaria potrebbe non essere sempre ottimale, il che influisce negativamente sulla sensibilità; dall'altra, generalmente più limitante, il fatto che il processo elettrodico (specialmente se di tipo amperometrico) non è molto selettivo, dunque potrebbero esserci anche altre specie chimiche in grado di interagire contemporaneamente alla specie secondaria e l'elettrodo non è in grado di discriminare il dato che non è specifico per la specie secondaria ma è un generico conduttore elettronico.

Il primo biosensore a base di enzima fu realizzato per la determinazione del glucosio nel sangue, dato di enorme importanza per la diagnosi e la terapia del diabete.

L'enzima tutt'ora utilizzato per questa applicazione è la glucosio ossidasi (GOx), che ossida il glucosio ad acido gluconico e, in presenza di ossigeno, produce acqua ossigenata (H_2O_2). In questo caso viene monitorata amperometricamente l'acqua ossigenata che viene ossidata su un elettrodo di platino e in questo modo viene misurata la corrente di ossidazione.



Per quanto riguarda questi sensori ad esempio, nei liquidi biologici nei quali si effettua l'analisi, si ha molto spesso presenza di acido ascorbico o acido urico, che

possono essere ossidati dall'elettrodo insieme all'acqua ossigenata, inficiando in questo modo la misura indiretta del glucosio.

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

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

2.2.1.2 Biosensori di II generazione

I biosensori di II generazione si basano su una diversa interazione dell'elettrodo con

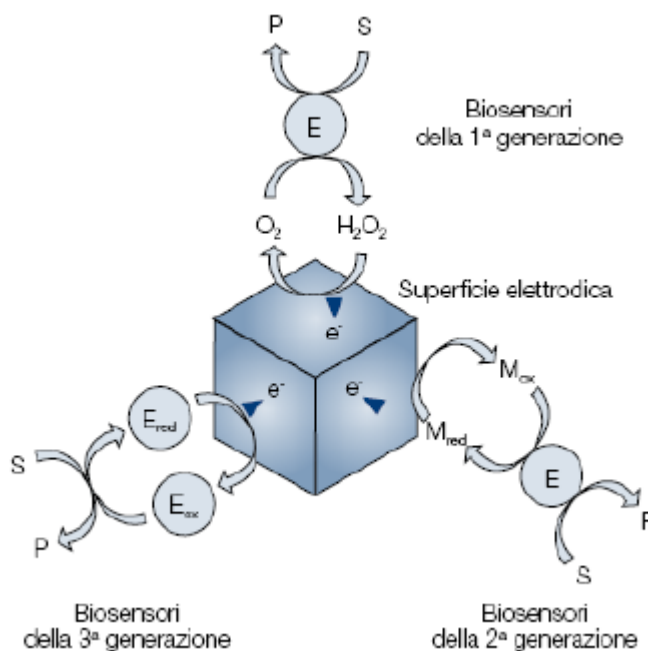


Figura 2.2: Schema del funzionamento e delle principali differenze tra biosensori di prima, seconda e terza specie. Il cubo centrale rappresenta nei tre casi la superficie elettrodica, E è l'enzima, S il substrato e P il prodotto della reazione catalizzata. Con M_{ox} ed M_{red} si intendono le versioni ossidata e ridotta di un mediatore redox.

il sistema recettore rispetto a quelli di I generazione. E' chiaro che, per sfruttare la elevata selettività del biorecettore, bisognerebbe che l'elettrodo potesse interagire direttamente con lo stesso biorecettore, avvertendo il suo cambiamento chimico che avviene in seguito alla reazione con il substrato. Negli enzimi del tipo ossido-ridutasi è difficile avere il trasferimento elettronico tra il centro redox e la superficie elettrodica, in quanto tale

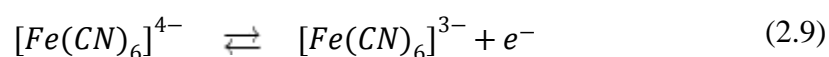
trasferimento avviene per tunneling, dato che la proteina non è in grado di condurre elettroni lungo i legami.

Purtroppo le dimensioni degli enzimi sono troppo elevate per consentire tunneling, possibile solo per distanze molto piccole, tra il cuore redox dell'enzima e l'elettrodo.

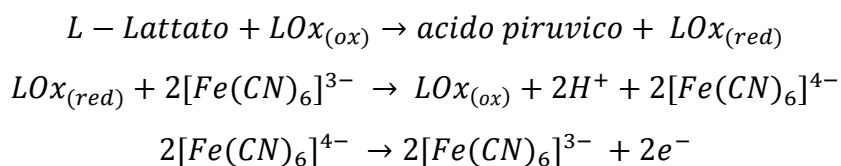
In questo caso si rende conduttore l'enzima introducendo dei mediatori redox capaci di diffondere all'interno dell'involucro enzimatico, in modo da ridurre il salto elettronico tra un centro e l'altro, fino al cuore dell'enzima. Tali mediatori dunque, collegando direttamente elettrodo ed enzima dal punto di vista elettrico aumentano la specificità del biosensore in quanto questo non subirà più i disturbi legati alla misura di una specie secondaria, come negli elettrodi di prima generazione.

Come mediatori si utilizzano diversi composti redox organici o organometallici come ad esempio metilferrocene, tetratiafulvalene, o tetracianochinodimetano.

Ad esempio nel caso del ferrocianuro si segue la seguente reazione di ossido-riduzione:



In questo modo è possibile anche evitare l'impegno dell'ossigeno dato che la forma ridotta dell'enzima viene ossidata dal mediatore che una volta ridotto viene riossidato dall'elettrodo. In questa situazione si ha quindi un trasferimento elettronico tra l'enzima (ridotto dal substrato) ed il mediatore, dopodiché la forma ridotta del mediatore viene ossidata dall'elettrodo e si completa così il ciclo. Poiché la forma ridotta del mediatore può essere prodotta solo da quella dell'enzima, a sua volta producibile solo dall'ossidazione del substrato, è chiaro che la corrente di ossidazione della forma ridotta del mediatore corrisponde direttamente all'ossidazione del substrato. Nel caso del lattato ossidasi (LOx) utilizzando come mediatore il ferrocianuro ($[Fe(CN)_6]^{4-}$) il processo è quello descritto dalla seguente sequenza:



2.2.1.3 Biosensori di III generazione

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

Nel primo caso si è passati dall'uso di un mediatore diffuso in cosubstrato (ossigeno o mediatore sintetico) ad un sistema in cui enzima e mediatore, essendo coimmobilizzati sulla superficie elettrodica, rendono il componente di bioriconoscimento parte integrante dell'elettrodo trasduttore ^[6].

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

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

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

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

Grazie alla loro peculiare costruzione i biosensori di terza generazione sono adatti per misurazioni immediate e ripetute del campione di elemento biologico, senza la necessità di aggiungere mediatori in soluzione per il trasporto degli elettroni dalla reazione redox enzimatica a quella elettrodica ^[6].

In generale i principali vantaggi nell'utilizzo di enzimi come componenti biologiche dei biosensori sono la loro elevata selettività, la loro attività catalitica che aumenta la sensibilità del sensore, la loro velocità di azione ed il fatto che non vengono consumati dalla reazione a cui prendono parte. Nonostante ciò esistono anche alcuni svantaggi, principalmente legati agli elevati costi di isolamento e purificazione ed alla loro perdita di funzionalità, relativamente veloce quando vengono immobilizzati su di un trasduttore.

Proprio per cercare di porre rimedio a quest'ultimo loro grande difetto sono in fase di studio sistemi per rendere la superficie elettrodica il più possibile simile all'ambiente biologico, habitat naturale degli enzimi. Questa ricerca sfocia nella creazione di elettrodi sempre più biocompatibili e performanti in grado di incrementare la vita degli enzimi su di essi immobilizzati e dunque la durata del biosensore.

Una valida alternativa agli enzimi, almeno in taluni casi, è rappresentata dall'utilizzo di materiali cellulari come tessuti vegetali o cellule batteriche.

Generalmente i tessuti contengono una molteplicità di enzimi dunque potrebbero non essere tanto selettivi quanto gli enzimi isolati, nonostante questo però, gli enzimi tissutali vivendo nel loro ambiente sono meno soggetti alla degradazione, prolungando la vita del biosensore. Oltre a ciò tessuti e microorganismi proteggono gli enzimi in essi contenuti dagli effetti di pH, temperatura e soluti nel substrato.

La maggior quantità di materiale biologico può dare comunque problemi rallentando la risposta del biosensore, dato che il substrato impiega maggior tempo a diffondere nel tessuto. Inoltre può anche diluire l'effetto degli enzimi in esso contenuti.

Un esempio interessante sono i tessuti di banana, che contengono polifenolo ossidasi. Essi, impastati con carbone, realizzano un sensore sensibile alla dopamina, che di fatto funziona come un elettrodo ad enzima, solo che non si usa un enzima isolato ma il molto meno costoso tessuto.

In poche parole tali biosensori consentono di ottenere vantaggi notevoli relativamente a durata di vita del sensore, stabilità degli enzimi e costi ma perdono molto in selettività e in tempo di risposta.

2.3 Biosensori ad affinità

I sensori ad affinità sfruttano la capacità selettiva di alcune molecole di legare determinate specie chimiche. Ad esempio molecole come anticorpi o polinucleotidi

sono in grado di legare specificatamente determinate molecole, con un processo di associazione altamente selettivo.

Una possibilità è quella di sfruttare la reazione tra un anticorpo ed un antigene per formare il complesso anticorpo/antigene.

Un anticorpo è una proteina globulare prodotta da un organismo per legare una molecola estranea e marcarla perché venga eliminata dall'organismo.

I biosensori ad affinità, detti anche immunosensori, utilizzano degli anticorpi o degli antigeni, marcati con un enzima in grado di reagire con il substrato per trasformarlo in un qualche prodotto. Esistono due diverse versioni: gli immunosensori sandwich e quelli diretti. I primi hanno gli anticorpi attaccati alla superficie elettrodica, ricoperta da un'opportuna membrana; tali anticorpi legano gli antigeni i quali a loro volta, legano degli anticorpi marcati con gli opportuni enzimi. A questo punto gli elettrodi vengono introdotti nell'ambiente contenente il substrato e la reazione enzimatica, che trasforma il substrato in prodotto, viene monitorata elettrochimicamente.

Negli immunosensori diretti invece vengono marcati gli antigeni con l'enzima e monitorata sempre l'attività enzimatica di trasformazione del substrato in prodotto.

2.4 Altri tipi di biosensori

In parallelo allo sviluppo dei biosensori c'è stato uno sviluppo dei cosiddetti elettrodi modificati. In generale tali modifiche consistono nel rivestimento (spesso con materiali polimerici) degli stessi. Nel seguito se ne vedranno alcuni esempi cercando di fare una panoramica su quelle che sono le nuove frontiere del settore.

2.4.1 Nanoparticelle d'oro

Lo sviluppo di nanoparticelle ha avuto un grande impulso grazie alle proprietà dell'oro di formare con facilità nanoparticelle di notevole stabilità.

Le proprietà fisiche e chimiche di nanoparticelle metalliche di diametro tra 1-10 nm sono notevolmente diverse da quelle del metallo massivo, ma anche da quelle del singolo atomo e sono fortemente dipendenti dalle dimensioni delle nanoparticelle e dalla natura del guscio protettivo, necessario per stabilizzarle ed impedirne la coagulazione.

La preparazione di nanoparticelle di oro (AuNPs) è stata realizzata più di cinquant'anni fa per semplice riduzione dell'acido cloroaurico con citrato di sodio in

acqua. Per renderle stabili è però necessario aggiungere anche un tiolo, che ha la capacità di attaccarsi alla superficie di Au metallico formando un guscio di molecole che ricopre totalmente la superficie con un monostrato molto compatto (SAM).

La sintesi di Brust-Schiffin consente di preparare le AuNPs con vari gruppi funzionali legati ai tioli, che possono svolgere diverse funzioni. In particolare è possibile introdurre dei gruppi funzionali che ancorino le AuNPs su specifiche superfici (elettrodiche) e che fungano da recettori per biosensori. Un'altra interessante possibilità nel campo della sensoristica è quella di realizzare dei dendrimeri^{viii} attaccando alla nanoparticella, sempre mediante tioli, dendrimeri con gruppi funzionali in grado di svolgere specifiche funzioni. Si sono realizzate, ad esempio, AuNPs con attaccati fino a 180 gruppi ferrocenile. Grazie a queste potenzialità, mediante AuNPs è possibile ottenere riconoscimento e titolazione molecolare con tecniche di ciclovoltammetria, come è già stato fatto per l'ATP (adenosinatrifosfato), e anche mediante elettrocatalisi.

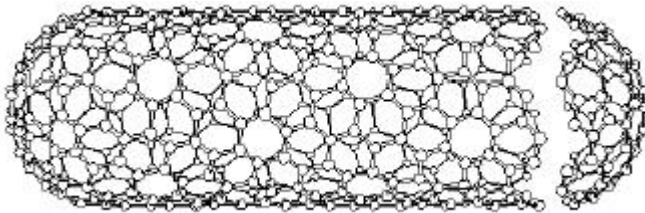
Un aspetto di notevole importanza è legato alla possibilità di legare alle AuNPs delle sequenze di DNA (oligonucleotidi) funzionalizzate con un tiolo terminale. Queste possono essere utilizzate per due diverse finalità: da una parte la capacità degli oligonucleotidi di ibridizzare con il DNA complementare, consente di accoppiare le AuNPs con una sequenza complementare di DNA realizzando così un nanocristallo, cioè una distribuzione di particelle d'oro in modo perfettamente ordinato secondo la struttura del DNA o degli oligonucleotidi utilizzati come telaio.

Dall'altra parte le AuNPs possono riconoscere, sempre grazie al meccanismo di ibridazione con la sequenza complementare, una specifica sequenza del DNA, il che le rende dei biosensori per l'analisi del DNA. Questa potenzialità è alla base dello sviluppo di biosensori per la diagnosi di malattie che introducono modificazioni del DNA, come ad esempio i tumori.

^{viii} I **dendrimeri** sono una classe di composti macromolecolari polimerici che formano delle strutture iper-ramificate di forma globulare e costruite in modo iterativo. Questa, che è la caratteristica principale, porta alla crescita non lineare del composto in cui, il numero delle unità monomeriche aggiunte ad ogni iterazione è doppia o tripla.

2.4.2 Nanotubi di carbonio

Un'altra realtà che, come la precedente, sta irrompendo nella ricerca scientifica di questi ultimi anni, coinvolgendo molteplici aspetti e grandi potenzialità è quella dei nanotubi di carbonio (CNT).



Un nanotubo di carbonio è un piano di grafite che si avvolge a cilindro saldando le due estremità lungo le quali gli atomi di carbonio sono

reattivi, avendo un elettrone spaiato.

Esistono modi diversi di arrotolamento del piano di grafite per cui la struttura dei nanotubi risulta diversa e, conseguentemente, risultano diverse le proprietà chimico-fisiche.

Poiché gli atomi terminali che si hanno in un nanotubo aperto, hanno proprietà chimiche molto interessanti, si provvede a tagliare i nanotubi in modo da realizzare dei tubi aperti per le svariate applicazioni nelle quali vengono impiegati.

Esistono nanotubi con diversa composizione:

- CNTs formati da un unico piano di grafite (SWNT);
- CNTs costituiti da più tubi concentrici (MWNT).

Si sono realizzati elettrodi chimicamente modificati con CNTs, ad esempio utilizzando il Nafion per solubilizzare i CNTs e confinarli sulla superficie elettrodica ottenendo da essi una forte attività elettrocatalitica. Questa attività elettrocatalitica è stata sfruttata per realizzare biosensori con l'immobilizzazione di enzimi ossidasi (come GOx) con elevata stabilità e riproducibilità.

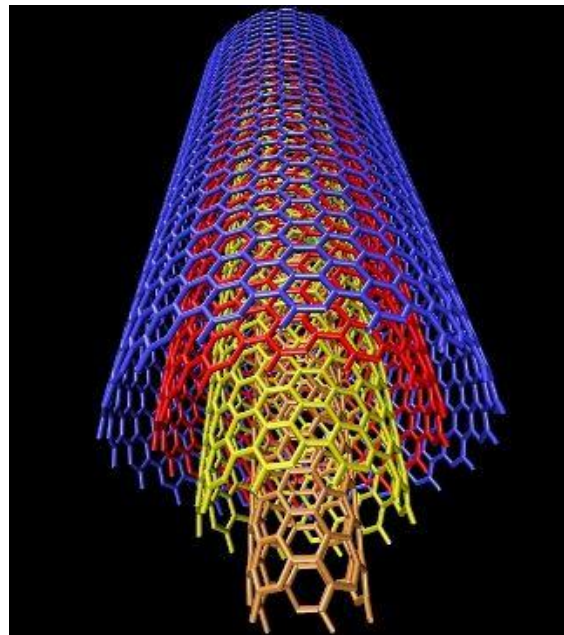


Figura 2.3: Sezione di una ricostruzione della struttura di un MWNT costituito da 4 nanotubi di carbonio concentrici.

Una tecnica molto diffusa per preparare elettrodi a base di CNTs è quella sol-gel che consente di preparare dei Ceramic-Carbon Nanotube Nanocomposites Electrodes (CCNNEs), facendo indurire i CNTs in matrici di gel di silice. Tali elettrodi possono essere utilizzati per lo sviluppo di biosensori, mediante intrappolamento di enzimi o altre proteine nei nanocompositi, grazie all'eccellente biocompatibilità della matrice sol-gel e le ottime proprietà elettrochimiche dei CNTs.

Sui CNTs è possibile integrare anche biomateriali come proteine, enzimi, antigeni, anticorpi o DNA. Si realizzano così dei sistemi ibridi che sfruttano le proprietà conduttrici o semiconduttrici dei CNTs accoppiate con le proprietà catalizzatrici o riconoscitrici dei biomateriali. In particolare la cavità interna o la superficie esterna costituiscono una opportuna piattaforma per ospitare le biomolecole e realizzare così dei nanodispositivi bioelettronici.

Bibliografia

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

CAPITOLO 3: ASPETTI BIOLOGICI DEL BIOSENSORE

3.1 Enzimi

3.1.1 Definizione e cenni storici

La parola enzima deriva dal greco ἐν ζύμῳ (*en zýmō, nel lievito*). Un enzima è una proteina (sequenza di amminoacidi organizzata in una struttura ben definita) in grado di catalizzare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità. Esistono anche frammenti di RNA dotati di questa capacità detti ribozimi. Chimicamente si parla di catalizzatori biologici.

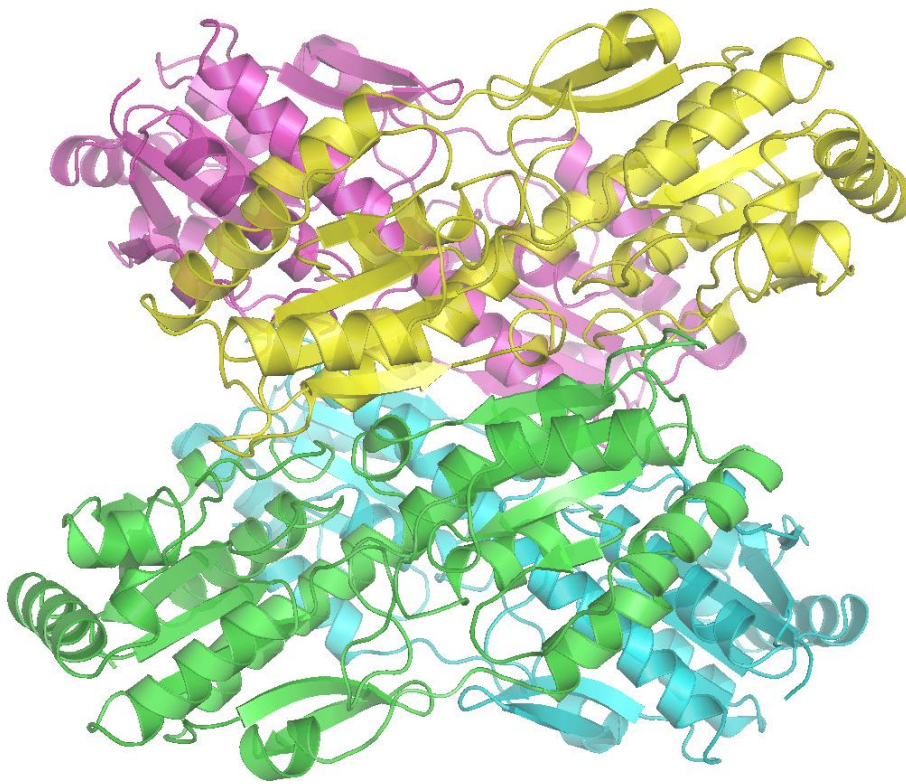


Figura 3.4: Immagine ricostruita al computer dell'enzima fosfofruttochinasi.

Il processo di catalisi indotto da un enzima (come da un qualsiasi altro catalizzatore) consiste in una accelerazione della velocità della reazione e quindi in un più rapido raggiungimento dello stato di equilibrio termodinamico. Un enzima accelera unicamente le velocità delle reazioni chimiche, diretta ed inversa (dal composto A al composto B e viceversa), senza intervenire sui processi che ne regolano la spontaneità.

Il suo ruolo consiste nel facilitare le reazioni attraverso l'interazione tra il substrato (la molecola o le molecole che partecipano alla reazione) ed il proprio sito attivo (la parte di enzima in cui avvengono le reazioni), formando

un complesso. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per iniziarne una nuova. L'enzima infatti non viene consumato durante la reazione.

La differenza principale degli enzimi dagli altri catalizzatori chimici è la loro estrema specificità di substrato. Essi infatti sono in grado di catalizzare solo una reazione o pochissime reazioni simili, poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico (è sensibile anche a piccolissime differenze della struttura tridimensionale).

L'attività enzimatica può essere influenzata da altre molecole. Esistono infatti molecole in grado di inibire tale attività (molti farmaci e veleni sono inibitori enzimatici). Sono note anche molecole attivatrici dell'enzima, in grado di aumentarne l'attività. L'attività può essere anche influenzata dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione di substrato.

Alcuni enzimi sono utilizzati per fini industriali, ad esempio la sintesi chimica di numerosi farmaci è portata a termine attraverso l'utilizzo di enzimi. Anche diversi prodotti di uso domestico fanno ampio uso di enzimi, tra questi molti detersivi li contengono per velocizzare la degradazione delle proteine e dei lipidi che compongono le macchie. La papaina, enzima estratto dalla papaia, è invece utilizzato in numerosi prodotti per le sue caratteristiche proteolitiche: dall'intenerimento della carne, processo noto già agli indigeni americani, all'utilizzo in applicazioni topiche sulle ferite e sulle cicatrici.

Gli uomini primitivi trovandosi nella necessità di conservare il più a lungo possibile il latte cominciarono a produrre il formaggio: per caso o per osservazione dei visceri di animali macellati scoprirono che lo stomaco dei vitelli e delle giovani capre cagliava il latte. Solo molte centinaia di anni dopo si comprese che il caglio altro non era se non un enzima.^[5] Fino alla fine del XVII secolo processi come la digestione della carne ad opera dei secreti gastrici^[6] o la conversione di amido a zucchero attraverso la saliva erano ampiamente noti. Gli esatti meccanismi attraverso cui questi eventi avessero luogo, invece, erano del tutto sconosciuti.^[2]

Nel XIX secolo, Louis Pasteur suggerì che fosse la presenza di entità da lui chiamate fermenti, contenute all'interno delle cellule di lievito, e prive di ogni funzione all'esterno delle cellule, a far avvenire questi processi. Scrisse che la fermentazione alcolica è un processo correlato con la vita e l'organizzazione delle cellule di lievito, e non con la morte e la putrefazione delle cellule stesse.^[2]

La parola enzima fu utilizzata per la prima volta nel 1878 dal fisiologo Wilhelm Kühne. Egli scelse tale parola proprio perché si riteneva che entità del genere potessero trovarsi solo all'interno di cellule di lievito.



Figura 3.5: Louis Pasteur (Dole, 27 dicembre 1822 – Marnes-la-Coquette, 28 settembre 1895)

Nel 1897 Eduard Buchner iniziò a studiare la capacità degli estratti di lievito di



Figura 3.6: Eduard Buchner (Monaco di Baviera, 20 maggio 1860 – Monaco di Baviera, 12 agosto 1917)

portare a termine le fermentazione di zuccheri, anche in assenza di cellule di lievito integre. Gli esperimenti che portò a termine presso l'Università di Berlino gli permisero di determinare che tali fermentazioni avvengono anche in assenza di cellule vive di lievito. Egli chiamò zimasi l'enzima che aveva portato a termine la fermentazione del saccarosio. Nel 1907 Buchner ricevette il Premio Nobel per la Chimica per le ricerche biochimiche e la scoperta della fermentazione indipendente dalla cellula.

In seguito alla dimostrazione del funzionamento degli enzimi indipendentemente da una cellula vivente, la ricerca si focalizzò sulla natura chimica degli enzimi stessi. Numerose evidenze mostravano la stretta associazione tra proteine ed attività enzimatica, ma una parte influente della comunità scientifica del primo Novecento (tra cui il Premio Nobel Richard Willstätter) sosteneva che le proteine non fossero altro che semplici trasportatori degli enzimi. Lo scienziato affermava che gli enzimi fossero formati da una parte colloidale proteica, chiamata apoenzima o apofermento, e da un

gruppo attivo chiamato coenzima o cofermento. I cofermenti determinerebbero la specificità dell'azione degli enzimi.

Nel 1926, in ogni caso, James Sumner mostrò come l'enzima ureasi fosse una proteina vera e propria cristallizzandolo. Nel 1937 Sumner dimostrò lo stesso per la catalasi. Furono comunque i lavori di Northrop e Stanley sugli enzimi digestivi pepsina, tripsina e chimotripsina a confermare definitivamente le ipotesi di Sumner. I tre ricercatori furono premiati con il Premio Nobel nel 1946.

La scoperta che gli enzimi fossero cristallizzabili diede il via ad una corsa tesa alla definizione delle strutture tridimensionali degli enzimi attraverso tecniche come la cristallografia. La prima macromolecola ad essere definita con questa tecnica fu il lisozima, enzima deputato alla digestione della parete batterica e contenuto nelle lacrime, nella saliva, nell'albume. La cristallizzazione del lisozima fu portata a termine dal gruppo coordinato da David Chilton Phillips nel 1965^[4] e segnò di fatto l'inizio della biologia strutturale.

3.1.2 Tipologie e modelli

A partire dalla zimasia caratterizzata da Buchner, tutti gli enzimi sono stati denominati utilizzando il suffisso -asi. Comunemente, il nome dell'enzima viene composto dalla fusione del substrato con il suffisso. Ad esempio la lattasi è in grado di scindere la molecola di lattosio, la DNA polimerasi è coinvolta nella formazione di polimeri di DNA.

Esistono in ogni caso delle norme precise per la definizione del nome degli enzimi, messe a punto dalla International Union of Biochemistry and Molecular Biology attraverso la Enzyme Commission, costituita nel 1955. La classificazione degli enzimi si basa sui numeri EC: ad ogni enzima viene associato un codice composto di quattro numeri ed un nome sistematico a seconda della reazione catalizzata.

Esistono sei differenti classi di enzimi.^[5]

- *Ossidoreduttasi*: catalizzano reazioni di ossidoriduzione;
- *Transferasi*: catalizzano il trasferimento di un gruppo funzionale;
- *Idrolasi*: catalizzano l'idrolisi di vari tipi di legame chimico;

- *Liasi*: catalizzano la rottura di legami covalenti attraverso metodi alternativi all'idrolisi o all'ossidoriduzione;
- *Isomerasi*: catalizzano le isomerizzazioni all'interno di una molecola; catalizzano la riorganizzazione intramolecolare
- *Ligasi*: catalizzano il legame tra due molecole attraverso un legame covalente.

L'attività degli enzimi è determinata dalla struttura quaternaria^[6] (ovvero l'arrangiamento spaziale delle subunità) e dalla struttura terziaria (ovvero la conformazione tridimensionale) degli enzimi stessi. La maggior parte degli enzimi presenta dimensioni decisamente maggiori dei substrati su cui agiscono. Solitamente la regione dell'enzima coinvolta nell'attività catalitica è molto ridotta (conta spesso solo 3-4 amminoacidi). La regione contenente questi residui catalitici, nota come sito attivo, si occupa di prendere contatto con il substrato e di portare a termine la reazione. Gli enzimi possono anche contenere regioni che legano cofattori necessari per la catalisi. Alcuni enzimi presentano anche siti di legame per piccole molecole, spesso prodotti diretti o indiretti della reazione catalizzata. Tale legame può incrementare o ridurre l'attività dell'enzima, attraverso una regolazione a feedback negativo.

La maggior parte degli enzimi presenta una notevolissima specificità per la reazione catalizzata e per i substrati coinvolti. Tale specificità è legata a diversi fattori che caratterizzano l'associazione tra il substrato ed il sito attivo, come la complementarità dal punto di vista strutturale, le cariche elettriche, la natura idrofila o idrofoba. Gli enzimi mostrano spesso livelli elevatissimi di stereospecificità, regioselettività e chemoselettività.^[7]

Esistono in ogni caso anche diversi enzimi caratterizzati da una specificità relativamente più bassa. Diversi enzimi sono infatti in grado di agire su un numero ampio di substrati. Una possibile spiegazione di questa evidenza è legata al fatto che, dal punto di vista evolutivo, essa permetterebbe la costituzione di nuovi pathways metabolici.^[8]

Il primo modello ad essere stato messo a punto per spiegare la specificità degli enzimi è quello suggerito da Hermann Emil Fischer nel 1894, secondo il quale l'enzima ed il substrato possiedono una forma esattamente complementare che ne permette un incastro perfetto.^[9] Tale modello è spesso definito come chiave-

serratura. In ogni caso tale modello esplica bene la specificità degli enzimi, ma è decisamente meno affidabile nello spiegare la stabilizzazione dello stato di transizione che l'enzima raggiunge durante il legame con il substrato.

Nel 1958 Daniel Koshland propose una modifica del modello chiave-serratura: dal momento che gli enzimi sono strutture relativamente flessibili, egli suggerì che il sito attivo potesse continuamente modellarsi in base alla presenza o meno del substrato.^[10]

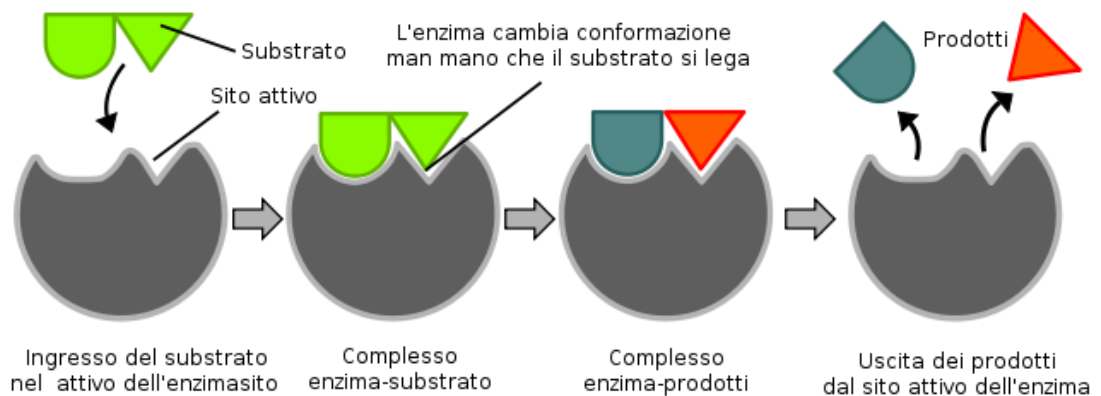


Figura 3.7: Schema del modello dell'adattamento indotto

Come risultato, il substrato non si lega semplicemente ad un sito attivo rigido, ma genera un rimodellamento del sito stesso, che lo porta ad un legame più stabile in modo da portare correttamente a termine la sua attività catalitica,^[11] come succede ad esempio per la esochinasi^[29] e per altri enzimi glicolitici. In alcuni casi, come avviene per le glicosidasi, anche il substrato può cambiare leggermente la propria forma all'ingresso nel sito attivo.^[3]

Alcuni enzimi sono provvisti, oltre che del sito attivo, anche di cosiddetti siti allosterici, che funzionano come degli interruttori, potendo bloccare o attivare l'enzima. Quando una molecola particolare fa infatti da substrato per questi siti, la struttura dell'enzima viene completamente modificata, al punto che esso può non funzionare più. Al contrario, può avvenire che la deformazione metta in funzione l'enzima. Molto spesso la deformazione consiste in un riorientamento dei domini che compongono l'enzima in modo da rendere il sito attivo più accessibile (attivatori) o meno accessibile (inibitori). Queste molecole che regolano l'attività enzimatica sono dette effettori allosterici o modulatori allosterici.

Il sito allosterico può essere anche lo stesso sito attivo dell'enzima: in questo caso, in genere, gli attivatori sono gli stessi reagenti, mentre gli inibitori allosterici saranno i prodotti.

Come per tutti i catalizzatori, gli enzimi non modificano l'equilibrio chimico della reazione. Solitamente, in presenza di un enzima, la reazione si svolge nella stessa

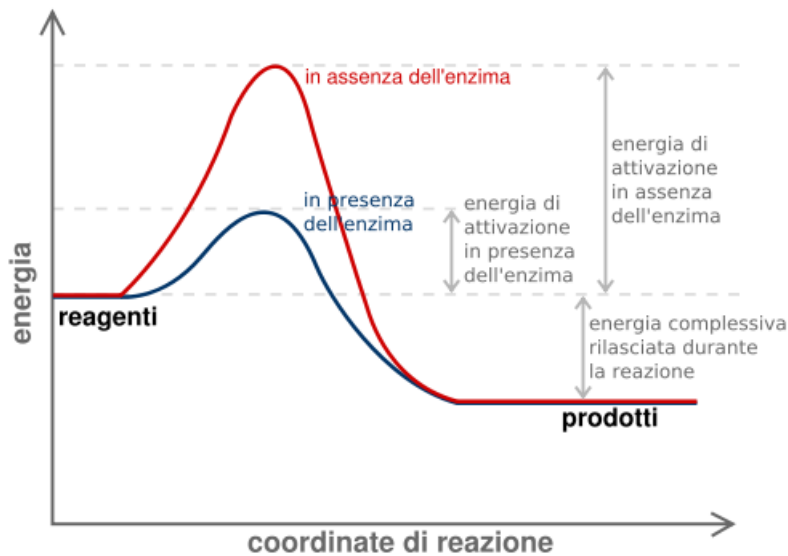


Figura 3.8: Diagramma di una reazione catalitica che mostra l'energia richiesta a vari stadi lungo l'asse del tempo (coordinate di reazione). I substrati normalmente necessitano di una notevole quantità di energia (picco rosso) per giungere allo stato di transizione, onde reagire per formare il prodotto. L'enzima crea un microambiente nel quale i substrati possono raggiungere lo stato di transizione (picco blu) più facilmente, riducendo così la quantità d'energia richiesta. Essendo più facile arrivare a uno stato energetico minore la reazione può avere luogo più frequentemente e di conseguenza la velocità di reazione sarà maggiore.

direzione in cui si svolgerebbe senza. L'unica differenza è la velocità della reazione. Di conseguenza, gli enzimi possono catalizzare in modo equivalente sia la reazione diretta che quella inversa.

In ogni caso, se l'equilibrio è decisamente spostato in una direzione (in caso ad esempio di una reazione esoergonica), la

reazione diventa irreversibile, e l'enzima si trova de facto a poter catalizzare la reazione solo in quella direzione.

Sebbene l'unica differenza tra la presenza e l'assenza di un enzima sia la velocità di reazione, a volte l'assenza dell'enzima può dare il via allo sviluppo di altre reazioni non catalizzate, che conducono alla formazione di diversi substrati. In assenza di catalizzatori, infatti, possono subentrare reazioni differenti, caratterizzate da una minore energia di attivazione.

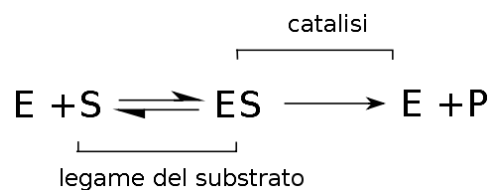
La presenza degli enzimi, inoltre, può permettere l'accoppiamento di due o più reazioni, in modo che una reazione favorita dal punto di vista termodinamico possa essere sfruttata per portarne a termine una sfavorita.

3.1.3 Cinetica enzimatica

La cinetica enzimatica si occupa in modo particolare degli aspetti cinetici (cioè legati al fattore tempo) del legame enzima-substrato e della conseguente generazione di un prodotto. I dati di velocità utilizzati nelle analisi cinetiche sono ottenuti da saggi enzimatici. Nel 1913 Leonor Michaelis e Maud Menten proposero una teoria quantitativa della cinetica enzimatica, che è tuttora nota come cinetica di Michaelis-Menten.^[12] Il loro lavoro è stato ulteriormente ampliato nel 1925 da George Edward Briggs e John Burdon Sanderson Haldane, che hanno messo a punto le equazioni cinetiche utilizzate comunemente ancora oggi.^[13]

3.1.3.1 Cinetica di Michaelis-Menten

Il maggior contributo di Michaelis e Menten fu quello di suddividere idealmente l'azione degli enzimi in due fasi. Nella prima fase, il substrato si lega reversibilmente all'enzima, formando il complesso enzima-substrato (ES), a volte chiamato complesso di Michaelis-Menten in loro onore. La fase successiva è la vera e propria conversione del substrato a prodotto.



Gli enzimi sono in grado di catalizzare alcuni milioni di reazioni al secondo. Per esempio, la reazione catalizzata dalla orotidina-5-fosfato decarbossilasi impiega circa 25 millisecondi per processare la stessa quantità di substrato che, in assenza dell'enzima, verrebbe convertita in 78 milioni di anni.^[14]

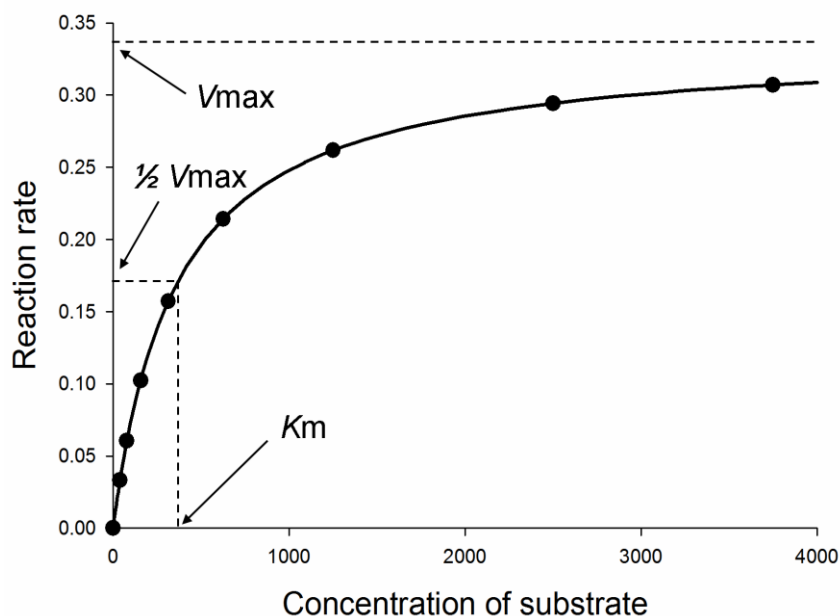


Figura 3.9: Diagramma della velocità di reazione in relazione alla concentrazione del substrato ed indicazione del significato dei parametri caratteristici V_{max} e K_m

La velocità enzimatica dipende dalle condizioni della soluzione e dalla concentrazione del substrato. Condizioni denaturanti, come le alte temperature, pH lontani dalla neutralità o alte concentrazioni saline riducono l'attività enzimatica. Alte concentrazioni di substrato, invece, tendono ad incrementare l'attività.

La velocità massima di una reazione enzimatica è individuabile incrementando la concentrazione di substrato fino a raggiungere un livello a cui la velocità stessa rimane costante (nella curva di saturazione, è il livello indicato in alto a destra). La saturazione ha luogo perché, all'aumentare della concentrazione di substrato, una quantità sempre maggiore di enzima libero è convertita nella forma ES. Alla velocità massima (definita V_{max}) dell'enzima, tutti i siti attivi dell'enzima sono saturi di substrato, e l'ammontare del complesso ES è pari a quello dell'enzima stesso.

La V_{max} è solo una delle costanti cinetiche che caratterizzano gli enzimi. Un'altra molto usata fornisce informazioni sulla quantità di substrato necessaria per raggiungere una determinata velocità di reazione. Si tratta della costante di Michaelis-Menten (abbreviata comunemente come K_m), definita come la concentrazione di substrato necessaria per raggiungere la metà della V_{max} . Ogni enzima presenta una K_m caratteristica relativamente ad ogni diverso substrato.

Altra costante molto utilizzata è la k_{cat} (o numero di turnover), definita come il numero di molecole di substrato convertite per secondo.

L'efficienza dell'enzima può essere espressa come rapporto tra k_{cat} e K_m . Tale rapporto è anche definito costante di specificità. Dal momento che tale costante incorpora sia l'affinità che l'abilità catalitica, spesso si utilizza per confrontare l'efficienza di diversi enzimi o quella di un unico enzima con differenti substrati. Il massimo teorico per la costante di specificità è chiamato limite di diffusione ed è compreso tra 10^8 e $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In questo intervallo, ogni collisione tra enzima e substrato ha come effetto la produzione di un prodotto, e la velocità di formazione del prodotto non è limitata dalla velocità di reazione ma dal limite di diffusione. Enzimi che presentano una tale proprietà sono detti enzimi cataliticamente perfetti o cineticamente perfetti.

La cinetica di Michaelis Menten si basa sulle costanti di velocità di reazione k_{-1} , k_1 e k_2 .

Queste sono relative ai processi illustrati nella schema seguente:



ES è un intermedio di reazione il cui basso valore di energia permette di fare avvenire una specifica reazione, catalizzata da una specifica classe di enzimi, in modo molto favorevole (effetto catalitico). Quando ES in seguito al raggiungimento di uno stato di equilibrio dinamico assume un valore di concentrazione che si mantiene costante nel tempo, si dice che è stato raggiunto lo stato stazionario (steady state).^[1]

In condizioni stazionarie (allo stato stazionario) la velocità di formazione del complesso enzima-substrato eguaglia la velocità di scomposizione:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.2)$$

dove le parentesi quadre indicano la concentrazione molare.

La concentrazione totale dell'enzima, $[E]_0$ è eguale alla somma della concentrazione dell'enzima legato con la concentrazione dell'enzima libero: $[E] + [ES] = [E]_0$

Ricavando la concentrazione dell'enzima libero, [E], da questa relazione e sostituendola nella espressione cinetica dello stato stazionario, precedentemente descritta, si ricava:

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.3)$$

dalla quale, eseguendo i prodotti, è possibile ottenere la concentrazione del complesso enzima-substrato, [ES], in funzione delle concentrazioni di substrato ed enzima totale:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (3.4)$$

La velocità di formazione del prodotto è data dalla quantità di complesso enzima-substrato che si scompone nell'unità di tempo:

$$V = -\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] = k_2 \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (3.5)$$

Dividendo numeratore e denominatore del rapporto, per il termine K_1 , si ottiene la nota equazione di Michaelis-Menten:

$$V = \frac{k_2[E]_0[S]}{k_M + [S]} \quad (3.6)$$

dove K_M è la costante di Michaelis-Menten e rappresenta un termine che ingloba altri valori costanti. Inoltre, visto che una volta raggiunto lo stato stazionario il valore della velocità massima, V_{max} , è dato dal prodotto $V_{max} = k_2 [E]_0$ l'equazione di Michaelis-Menten può anche essere espressa nella forma alternativa:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{k_M + [S]} \quad (3.7)$$

L'equazione di Michaelis e Menten mette quindi in relazione la velocità di formazione del prodotto V con la concentrazione del substrato $[S]$.

La costante di Michaelis-Menten, K_M , rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima.

Essa equivale al seguente rapporto:

$$k_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.8)$$

La costante di Michaelis-Menten è una grandezza caratteristica di ciascun enzima. Essa è un termine che indica quantitativamente l'affinità tra un enzima e il suo substrato: più basso è il valore di K_M e più bassa sarà la concentrazione di substrato che permette di raggiungere un valore di velocità di reazione pari alla metà della velocità massima, il che indica una alta affinità dell'enzima per il substrato. Viceversa un alto valore di K_M indica che sarà necessario più substrato per raggiungere una velocità di reazione pari alla metà della velocità massima, il che significa una minore affinità dell'enzima per il substrato.

Riportando su un diagramma cartesiano l'andamento della velocità di reazione, dedotta secondo la cinetica di Michaelis-Menten, in funzione della concentrazione di substrato si ottiene graficamente un ramo di iperbole (figura 4.6). Risultano di ovvia deduzione le seguenti considerazioni:

- a basse concentrazioni di substrato la reazione è praticamente del primo ordine, crescendo la velocità proporzionalmente ad $[S]$ (essendo l'enzima in forte eccesso rispetto al substrato, la sua concentrazione può considerarsi costante);
- ad alte concentrazioni di substrato la velocità tende ad assumere un valore massimo che diviene costante. Ciò è dovuto alla completa saturazione dell'enzima che annulla l'effetto dovuto all'ulteriore aumento della concentrazione di substrato (non è presente più enzima disponibile). Una tale cinetica di reazione è di ordine zero e in questo caso risulta $V_{\max} = K_2 [E]^0$.

Riportando l'equazione di Michaelis-Menten nella forma

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.9)$$

è possibile ottenere il grafico dei doppi reciproci (o di Lineweaver-Burk), rappresentando graficamente l'andamento di $1/V$ in funzione di $1/[S]$. In tal modo si ottiene una retta con intercetta sull'asse delle ascisse nel punto $-1/K_M$, sull'asse delle ordinate nel punto $1/V_{max}$ e con coefficiente angolare pari al rapporto K_M/V_{max} .

3.1.3.2 Inibitori e cofattori

Gli inibitori enzimatici sono sostanze in grado di diminuire o annullare l'azione catalitica di un enzima. Possono agire legandosi al sito attivo competitivamente al substrato (inibizione competitiva) o legandosi ad un sito allosterico. L'inibizione può essere reversibile, rendendo possibile il ripristino della funzione catalitica dell'enzima tramite aumento della concentrazione del substrato rispetto all'inibitore; o irreversibile con l'impossibilità di potere ripristinare l'attività catalitica.

I meccanismi di inibizione esistenti sono:

- *Inibizione reversibile*: caratterizzata da molecole che si legano non covalentemente all'enzima motivo per cui dopo la loro rimozione l'enzima torna ad essere funzionante.
- *Inibizione competitiva*: viene occupato il sito di legame del substrato, impedendo al substrato di legarsi correttamente (formazione di un complesso EI al posto di uno ES). Se però si verifica prima il legame enzima-substrato, l'inibitore competitivo perde di efficacia. La consistenza dell'inibizione dipende dunque sia dalla concentrazione di inibitore che da quella di substrato. Spesso gli inibitori competitivi mimano in modo notevole la forma dei substrati di cui inibiscono il legame. All'aumentare della concentrazione di inibitore la k_m app aumenta la velocità della reazione. Asintoticamente però la velocità tende ancora a V_{max} per cui l'effetto dell'inibitore può essere annullato aumentando la concentrazione di substrato.

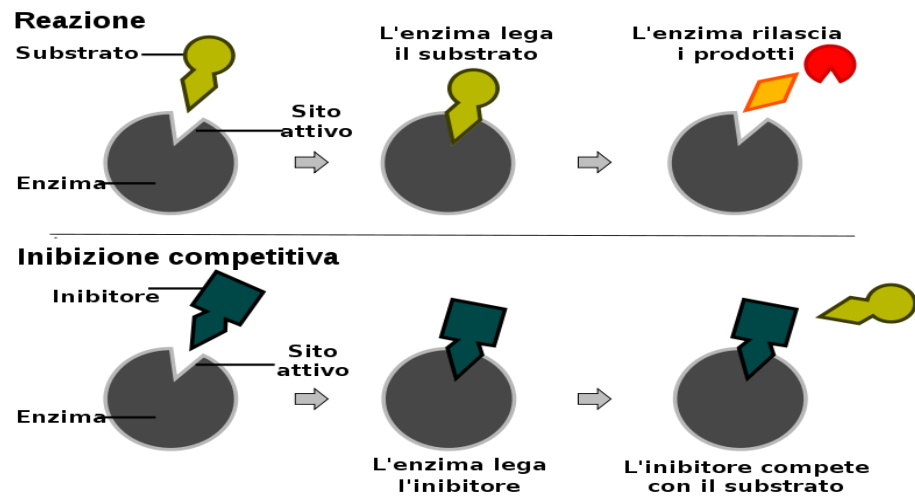


Figura 3.10: Schema di comparazione tra la reazione normale ed il meccanismo di inibizione competitiva.

- *Inibizione non competitiva*: tali inibitori sono in grado di legare siti differenti dal sito attivo. Essi sono dunque in grado di legare sia l'enzima libero, sia in configurazione ES. Il loro legame all'enzima genera un cambiamento conformazionale dell'enzima stesso, che può avere come conseguenza l'inibizione del legame tra enzima e substrato. Non essendoci dunque competizione tra inibitore e substrato, l'importanza dell'inibizione dipende esclusivamente dalla concentrazione dell'inibitore stesso.



Figura 3.8: Schema di comparazione tra la reazione normale ed il meccanismo di inibizione non competitiva.

L'inibitore causa una diminuzione della V_{max} ma non modifica la k_m .

- *Inibizione acompetitiva*: l'inibitore si lega a un sito diverso da quello del substrato, presente solamente nel complesso ES: interagisce solo con ES e non con E.

V_{\max} e k_m diminuiscono di uno stesso fattore all'aumentare della concentrazione di inibitore: V_{\max}/k_m è costante.

- *Inibizione mista*: In realtà non si verifica un'inibizione puramente non competitiva, ma un'inibizione di tipo misto in cui variano sia V_{\max} che k_m in modo diverso.

In pratica l'inibizione acompetitiva e l'inibizione mista avvengono solo negli enzimi con due o più substrati

- *Inibizione irreversibile*: svolta da inibitori in grado di reagire con l'enzima e formare un legame covalente. L'inattivazione così indotta è irreversibile. Esistono diversi composti di questo tipo: una classe importante è quella dei cosiddetti inibitori suicidi, che contano al loro interno la penicillina ed i suoi derivati. Gli antibiotici di questa classe vengono legati dal sito attivo dell'enzima bersaglio (le transpeptidasi) e vengono convertiti in un intermedio che reagisce in modo irreversibile con alcuni residui presenti nel sito attivo.

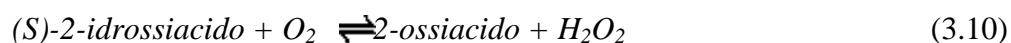
I cofattori invece sono delle sostanze che legandosi all'enzima in particolari siti consentono alla catalisi di avvenire correttamente o la velocizzano ulteriormente fungendo quindi da attivatori degli enzimi.

3.1.4 Un esempio notevole: l'enzima lattato ossidasi

3.1.4.1 Definizione

Con il termine lattato ossidasi si possono intendere più enzimi diversi. Ad esempio, sotto questo nome è possibile individuare un enzima il cui vero nome è lattato 2-monoossigenasi o anche l'enzima (S)-2-idrossiacido ossidasi^{ix}. Quest'ultimo enzima è quello sul quale si concentrerà l'attenzione e che d'ora in avanti verrà chiamato lattato ossidasi, eliminando ogni possibile ambiguità.

L'enzima lattato ossidasi, appartiene alla categoria delle ossido-reduttasi (cfr. Paragrafo 3.1.2) e catalizza la seguente reazione:



^{ix} Codice EC: 1.1.3.15

Gli idrossiacidi sono una classe chimica di composti costituiti da acidi carbossilici^x con un gruppo idrossilico sostituito al carbonio adiacente. Questi composti possono essere di origine naturale o sintetica e sono molto utilizzati nell'industria cosmetica. Molti idrossiacidi sono elementi di base in diversi processi biologici, come ad esempio l'acido glicolico, l'acido lattico e l'acido citrico.

3.1.4.2 Isolamento

Uno stesso enzima può essere ottenuto seguendo strade diverse. La procedura di isolamento, purificazione e analisi di un enzima può essere molto lunga e complessa, a seconda del tipo di enzima della e dall'organismo dal quale esso viene estratto, ovvero dalla sua localizzazione all'interno dell'organismo.

A seconda dell'organismo dal quale viene estratto l'enzima avrà caratteristiche diverse, pur possedendo numerosi tratti in comune con gli altri enzimi dello stesso tipo, estratti da altri organismi.

Identificare la funzione di un enzima, quindi la reazione da esso catalizzata, unicamente dal nome dell'enzima stesso è impossibile. E' necessario possedere anche l'informazione relativa all'organismo dal quale è stato isolato e purificato.

Per lo stesso motivo è molto difficile calcolare con esattezza il peso molecolare degli enzimi in quanto questo varia in base alla provenienza dell'enzima.

Per quanto riguarda la lattato ossidasi gli organismi dai quali essa è ottenibile sono molti, se ne citano alcuni di rilevanti:

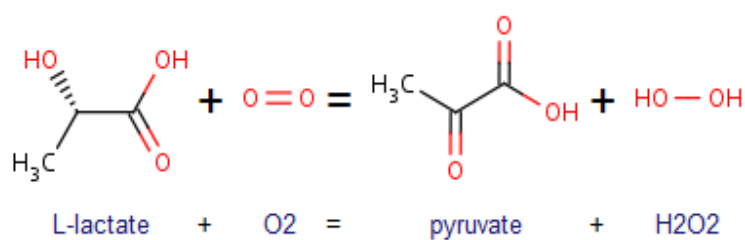
- *Aerococcus viridians*;
- *Lactobacillus lactis*;
- *Mycobacterium smegmatis*;
- *Pediococcus*;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Rattus norvegicus*.

^x Acidi organici caratterizzati dalla presenza di almeno un gruppo carbossilico (-COOH). Essi sono caratteristicamente dei donatori di protoni e costituiscono il tipo più comune di acidi organici.

Particolare attenzione sarà volta all'enzima purificato da *Pediococcus*, un batterio appartenente alla famiglia dei Lactobacilli ampiamente utilizzato nei processi di fermentazione nell'industria alimentare.

3.1.4.3 Reazioni catalizzate

Prendendo in considerazione la lattato ossidasi ottenuta da *Pediococcus*, questa reagisce naturalmente alla presenza di L-lattato (cfr. Paragrafo 3.2.1) catalizzandone



la reazione con l'ossigeno molecolare e formando acido piruvico, detto anche piruvato e perossido di idrogeno, detto

Figura 3.9: reazione catalizzata dall'enzima lattato ossidasi, isolato da *Pediococcus*

anche acqua ossigenata.

Su questo particolare enzima sono stati fatti diversi studi riguardo al suo grado di funzionalità ma anche alle proprietà meccaniche del suo adsorbimento su superfici d'oro o di mica.^[30]

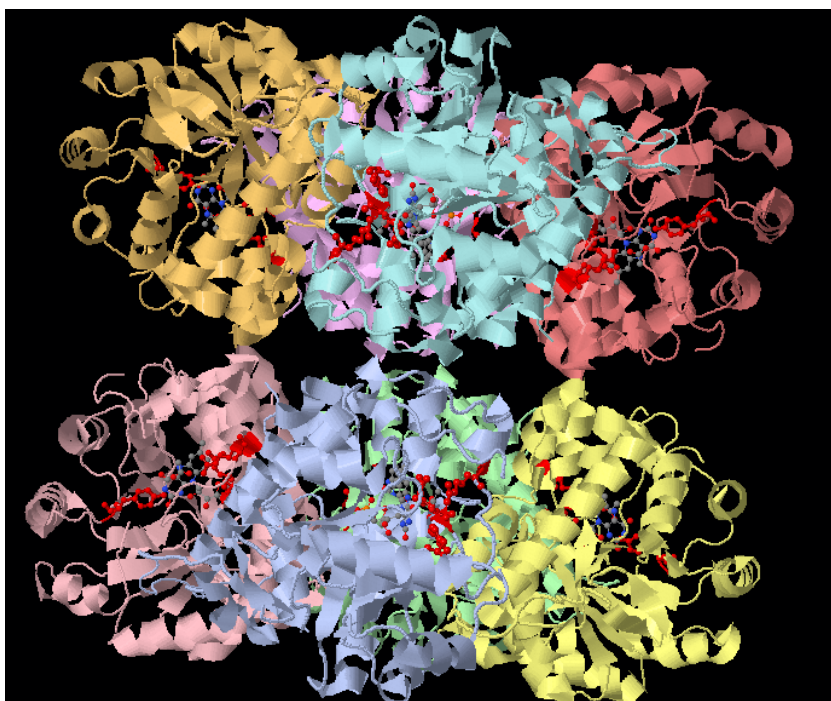


Figura 3.10: Struttura tridimensionale dell'enzima lattato ossidasi purificato da *Rattus norvegicus*. In figura sono rappresentati in rosso e blu i siti attivi ai quali si lega il substrato.

Enzimi lattato ossidasi, purificati da altri organismi catalizzano reazioni anche del D-lattato (cfr. Paragrafo 3.2.1) o di entrambe le forme di lattato.

La maggior parte degli studi sulle caratteristiche della lattato ossidasi sono stati portati avanti su enzimi purificati da *Aerococcus Viridians* e da *Rattus*, ottenendo la definizione per essi di cofattori ed inibitori, nonché delle costanti di Michaelis-Menten (cfr. Paragrafo 3.1.3.1) in diverse condizioni sperimentali. Ad esempio per l'enzima isolato da *Aerococcus Viridians* un importante inibitore competitivo (cfr. Paragrafo) è il D-lattato, mentre il substrato che viene catalizzato è L-lattato. Da ciò, in presenza di entrambi (miscela ad eccesso enantiomerico^{xi} noto), il risultato della catalisi è strettamente determinato dal fattore tempo e dunque dalle costanti di Michaelis-Menten della catalisi e del meccanismo di inibizione.

3.2-Acido lattico

3.2.1-Definizione

L'acido lattico è un composto chimico presente in molti processi biologici e fu isolato per la prima volta nel 1780

dal chimico svedese Carl Wilhelm Scheele. L'acido lattico è un acido carbossilico e la sua formula chimica grezza è $C_3H_6O_3$.

In soluzione l'acido lattico può perdere un protone dal gruppo acido producendo così lo ione lattato come si può vedere in figura 3.10.

La molecola di questo composto inoltre è chirale e possiede dunque due

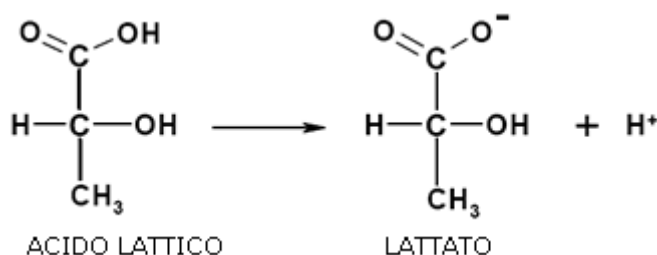
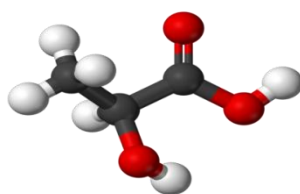


Figura 3. 12: Deprotonazione dell'acido lattico in lattato.



Sfere grigie: carbonio (C)
Sfere rosse: ossigeno (O)
Sfere bianche: idrogeno

Figura 3.11: Rappresentazione della struttura molecolare dell'acido L-Lattico.

enantiomeri^{xiii}, uno di questi è noto come acido L-(+)-lattico o S-lattico e l'altro come acido D-(-)-lattico o R-lattico. Il primo è largamente presente in una

^{xi} Eccesso enantiomerico (e.e.): quantità percentuale di un enantiomero rispetto a quella dell'altro presente nella soluzione. Ad esempio e.e. del 100% indica miscela racema (quantità uguali dei due enantiomeri in soluzione).

^{xiii} Molecole identiche per formula chimica ma con una struttura diverse che le rende non sovrapponibili tridimensionalmente. Composti con questa caratteristica vengono appunto detti chirali.

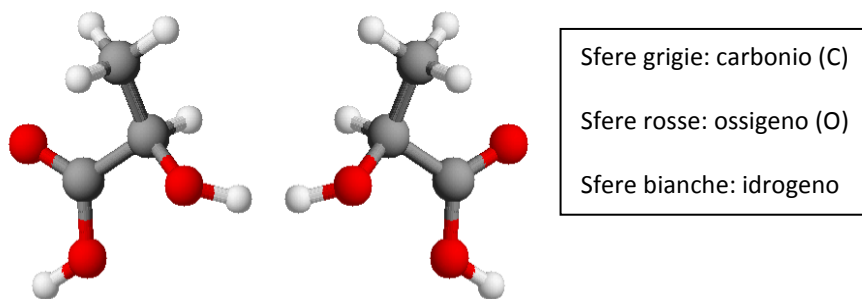


Figura 3.13: Rappresentazione dei due enantiomeri dell'acido lattico, rispettivamente da destra acido L-lattico e D-lattico.

serie di processi biologici negli animali mentre il secondo negli stessi è assente. E' invece presente in alcuni processi di fermentazione tipici di alcune specie di batteri e in altri organismi.

3.2.2-Rilevanza dell'acido lattico

3.2.2.1 Presenza nell'uomo

Nell'uomo l'unica forma di acido lattico presente in condizioni normali è l'acido

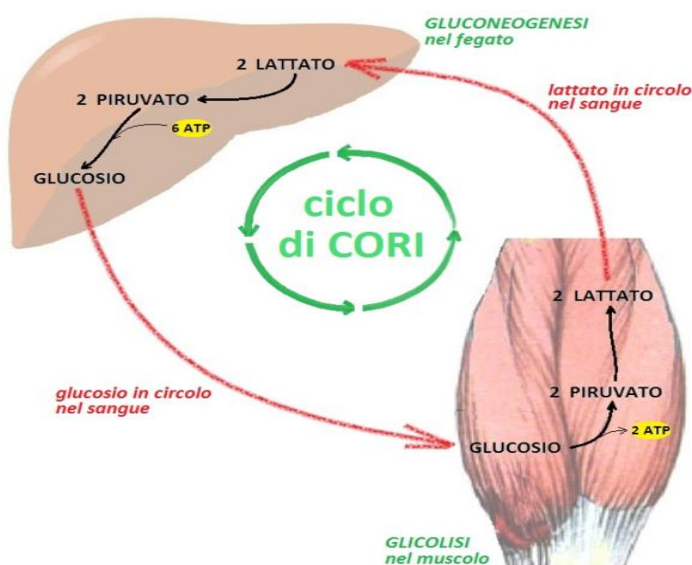


Figura 3.14: Schema descrittivo del ciclo di Cori in cui all'interruzione del ciclo di formazione dell'ATP nel muscolo per la mancanza di O₂ si sopprime con la produzione di lattato e la sua riconversione epatica in glucosio.

L-(+)-lattico.

Nel normale metabolismo e durante l'esercizio fisico l'acido L-lattico viene costantemente prodotto dal piruvato^{xiii} ad opera dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) attraverso i processi di fermentazione^{xiv}, come fu scoperto nel 1808 da Jöns Jacob Berzelius.

La concentrazione di L-Lattato nel sangue umano

è di circa 1-2 mmol/L^[25] ma può arrivare fino a 20 mmol/L durante intenso esercizio

^{xiii} Acido organico di fondamentale importanza in molti processi metabolici. L'acido piruvico o piruvato può essere ricavato dal glucosio per glicolisi.

^{xiv} Processo di estrazione di energia dall'ossidazione di composti organici come ad esempio carboidrati.

fisico. Infatti, se all'organismo è richiesto uno sforzo muscolare può accadere che la bassa concentrazione di ossigeno presente nei muscoli si esaurisca, il che comporterebbe l'arresto del processo di glicolisi grazie al quale viene prodotta l'ATP^{xv}. A sua volta ciò causerebbe l'interruzione di ogni attività muscolare. Per evitare questo le cellule del muscolo scheletrico adottano il meccanismo del ciclo di Cori, un ciclo metabolico che lega fegato e muscolo scheletrico attraverso la circolazione sanguigna. Il ciclo prende il nome da Carl e Gerty Cori, i due ricercatori che per primi lo hanno descritto.

In questo processo metabolico le cellule del muscolo scheletrico rispondono al bisogno di energia in condizioni anaerobiche (in mancanza di ossigeno) con la produzione di lattato. Questo viene trasportato fino al fegato dal flusso sanguigno e ivi riossidato dalla LDH a piruvato, a sua volta convertito in glucosio. A questo punto il glucosio prodotto dal fegato torna al muscolo, sempre attraverso il sistema circolatorio dove può essere sottoposto ad un nuovo ciclo glicolitico portando al muscolo l'energia di cui aveva bisogno.

Lo svantaggio principale di questo sistema è dato dal fatto che lo ione lattato è tossico per la cellula muscolare, portando alla diminuzione dell'efficienza dei sistemi tampone nel sangue e, con l'aumento dell'acidità, a crampi muscolari e a relativo affaticamento.

Questi effetti vengono compensati dall'iperventilazione che fa diminuire l'acidità dell'organismo provocando però un "debito di ossigeno" che viene soddisfatto solo quando tutto il lattato viene riconvertito in glucosio dal fegato, qualche minuto dopo la fine dello sforzo fisico.

Contrariamente ad una diffusa credenza popolare l'acido lattico non è il responsabile dei dolori muscolari ritardati, noti come DOMS^{xvi} che si avvertono nei giorni seguenti intensi esercizi fisici.^{[15][16]}

Un altro importante ruolo del lattato è quello di principale fonte di energia per il cervello in diverse specie di mammiferi come topi, ratti e l'uomo.^{[17][18]}

Secondo alcuni recenti studi infatti i neuroni metabolizzerebbero preferenzialmente il lattato, appositamente trasformato dal glucosio ad opera delle cellule gliali ad essi vicine.^{[19][20]} A causa di questa attività metabolica delle cellule gliali il fluido

^{xv} Adenosina trifosfato, è la molecola che il corpo umano utilizza come trasportatore di energia e che quindi consente il movimento dei muscoli.

^{xvi} Delayed Onset Muscle Soreness

extracellulare nelle immediate vicinanze dei neuroni avrebbe una concentrazione di lattato molto diversa rispetto a quella ematica o del fluido cerebrospinale. Ciò è stato provato attraverso degli studi di microdialisi.^[17]

Questi studi sono stati confermati dal lavoro del gruppo di Zilberter^[21] sul metabolismo del cervello di topi neonati che dimostra come il glucosio sia insufficiente a sostenere dal punto di vista energetico intense attività sinaptiche e come lattato e piruvato siano substrati migliori a questo scopo. Tale lavoro è stato commentato positivamente anche dal gruppo di Kasischke nel 2011^[22].

3.2.2.2 Utilizzo nell'industria

Il primo organismo identificato come produttore di acido lattico fu il *Lactobacillus*, scoperto da Louis Pasteur nel 1856. Qualche anno più tardi si cominciò a produrlo commercialmente e nel 2006 la produzione globale di acido lattico ha raggiunto le 300.000 tonnellate con una crescita media annua del 10%.^[23]

L'acido L-(+)-lattico trova applicazioni in numerose attività industriali: nei bagni di colorazione, come mordente nella stampa dei tessuti di lana, come solvente per coloranti insolubili in acqua, nella preparazione e confezione di formaggi, di bibite, nel trattamento di alcuni lieviti e dei pellami, come plastificante, come catalizzatore nella preparazione di resine alla fenolaldeide, nella saldatura dolce. Inoltre viene impiegato in medicina come antisettico e antifermentativo intestinale e per irrigare i tessuti.

La produzione di acido lattico sfrutta l'attività di fermentazione di batteri dell'acido lattico, molto simile a quella svolta da questi batteri nelle cavità orali, alla base della formazione delle carie.

Nell'industria alimentare l'acido lattico viene utilizzato normalmente come antiossidante, regolatore di acidità e come conservante. Principalmente lo si trova nei prodotti acidi derivati del latte come gli yoghurt e diversi tipi di formaggi. L'acido lattico viene anche utilizzato per diminuire il pH nella produzione della birra ed in un processo di fermentazione per ridurre la quantità di acido malico nella produzione del vino.

Nell'ultimo decennio l'acido lattico ha guadagnato importanza anche nell'industria dei detersivi grazie alle sue proprietà di agente antibatterico e alle sue capacità di rimuovere la schiuma e di disincrostare.

Recentemente è nato un nuovo importante impiego di questo composto. Da esso è infatti possibile ottenere il cosiddetto PLA (Acido Polilattico). Il PLA è un poliestere biodegradabile termoplastico sul quale si stanno conducendo molti studi e che si sta rivelando particolarmente interessante anche in campo medico.

Data la natura chirale dell'acido lattico esiste sia il PLLA (Acido Poli L-Lattico) che il PDLA (Acido Poli D-Lattico). Esiste anche il PDLLA (Acido Poli DL-Lattico) ottenuto da una miscela racemo di acido D- ed L-lattico. Proprio quest'ultimo, grazie alle sue buone proprietà fisico-chimiche ed al suo essere biodegradabile, è utilizzato nell'ingegneria tissutale e nella produzione di suture, stents e dispositivi per la dialisi in campo medico.

Questo composto è uno dei migliori esempi di plastiche rinnovabili, riciclabili e sostenibili di origine biologica (bioplastiche), ponendo di fatto un'alternativa ai prodotti derivati dal petrolio.

3.2.3-Importanza della rilevazione

La rilevazione dell'acido lattico si divide in due grandi rami, dipendentemente dall'oggetto del test. Infatti la rilevazione della presenza e della concentrazione di lattato può essere orientata a diagnosticare una patologia o a prevenirne l'insorgenza nel settore sanitario o a verificare la qualità dei cibi e dei confezionamenti nel settore agroalimentare.

Negli ultimi anni la ricerca in questo campo è volta prevalentemente a riuscire a rilevare la concentrazione più piccola possibile di lattato. Finora si è riusciti ad arrivare alla misura di concentrazioni nell'ordine della decina di micromoli su litro.

Di pari passo con la progressiva diminuzione del limite di rilevazione ci si sta spingendo verso una sempre maggiore sensibilità nella misura della concentrazione, in modo da incrementare la precisione nella determinazione della concentrazione di lattato.

Un altro parametro di fondamentale importanza in questo tipo di misure è l'intervallo in cui la grandezza misurata (una corrente nel caso dei biosensori amperometrici) dipende linearmente dalla concentrazione di lattato che si vuole misurare.

Tali parametri dipendono da molte caratteristiche chimico-fisiche del biosensore che sarà ottimizzato a seconda dell'ambito in cui verrà impiegato.

3.2.3.1-Settore sanitario

Nel settore sanitario la maggioranza di biosensori disponibili in commercio sono in grado di rilevare unicamente la concentrazione di acido L-lattico. Ciò non costituisce una limitazione in quanto nell'essere umano è presente solo questo enantiomero dell'acido lattico. Proprio basandosi su questo concetto è stata recentemente studiata l'utilità di un biosensore specifico per l'acido D-lattico per identificare la presenza di quei batteri che lo producono, all'interno del corpo umano.

Sembra che tale approccio permetta di prevenire i casi di appendicite acuta, provocata dagli stessi batteri produttori dell'enantiomero destrogiro (acido D-lattico).^{[24][28]}

Aumento della concentrazione di lattato rispetto a quelle ematiche standard può essere sintomatico di diverse cause. Tra queste si identificano le seguenti:

- Ipossia, mancanza di ossigeno a tessuti o cellule. Gli effetti sull'organismo sono principalmente depressione dell'attività mentale, con possibile sopraggiunta di coma, riduzione della capacità di lavoro muscolare e nei casi più gravi morte delle cellule in tutto l'organismo;
- Shock, nelle tre forme di cardiogeno, ipovolemico o settico;
- Avvelenamento da monossido di carbonio;
- Insufficienza Epatica;
- Carenza vitamina B12.

Ad oggi numerosi studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra i livelli di lattato, il grado di acidosi e la mortalità dei pazienti critici in stato di shock ed è stato peraltro ipotizzato che tale correlazione possa essere tempo-dipendente. Tale ipotesi è stata formulata in quanto si è verificato che una rapida normalizzazione (nel giro di 24 ore) dell'iperlattacidemia riduce la mortalità, mentre la sua persistenza si associa ad una mortalità superiore al 75% dei casi^[26]. Inoltre nei pazienti colpiti da shock circolatorio, si è notata una stretta correlazione fra l'eccessiva l'iperlattacidemia e la mortalità: infatti la probabilità di decesso si attestava al 60% quando il lattato ematico eccedeva i 2 mmol/l e addirittura all'80% quanto superava i 4 mmol/l ^[27].

Per i motivi sopraelencati il monitoraggio continuo dell'acidemia lattica nei reparti di terapia intensiva è una realtà in crescita e necessita di biosensori con tempi di risposta brevi, adeguate performance di misura e buon rapporto costo-durata.

La misura della concentrazione di acido lattico, dato il suo utilizzo nel ciclo di Cori (cfr. Paragrafo 3.2.2.1), è molto utile anche in medicina dello sport, consentendo di costruire allenamenti personalizzati e mirati a mantenere la concentrazione di lattato il più vicino possibile al cosiddetto "maxlass" (maximum lactate steady state), concentrazione che è mediamente di 4mmoli/L.

Per definire tale valore individuale si predispose uno "step test", ovvero delle misure della concentrazione ematica di lattato in conseguenza ad una serie di sforzi di intensità gradualmente crescente. Forma e direzione della curva ottenuta vengono utilizzate per definire il tipo di allenamento.

La ripetizione del test dopo alcune settimane rivela se gli allenamenti hanno fatto effetto incrementando il livello di sforzo necessario per far aumentare la concentrazione di lattato agli stessi livelli del test precedente.

Quanto visto per la medicina dello sport può essere inserito anche nel settore veterinario con concentrazioni di riferimento ovviamente diversi per ogni specie animale.

Un ambito ambito di crescente interesse in cui si trasporta quanto riportato per la medicina dello sport è quello della riabilitazione e della fisioterapia nelle quali la rilevazione del lattato consente di pianificare con precisione gli esercizi giusti e di valutare quantitativamente i progressi ottenuti dai pazienti con le terapie personalizzate.

3.2.3.2-Settore agroalimentare

La presenza di acido lattico in quantità considerevoli può essere un indice di scarsa qualità degli alimenti o dei loro confezionamenti. Infatti la rilevazione di acido lattico in questi casi implica la presenza di microorganismi produttori dello stesso e di norma di tipo batterico. Ad esempio, nel caso dei prodotti caseari ed in particolare del latte, la concentrazione di poche ppm di acido lattico tende ad aumentare in relazione all'attività microbica. L'acido lattico viene prodotto in entrambi i suoi enantiomeri (L-lattico e D-lattico). Biosensori amperometrici ad enzimi per tali

applicazioni sono già stati realizzati e validati^[29] ma è comunque importante continuare a migliorarne le performance ed il loro rapporto qualità-prezzo.

In questo campo, come nel settore sanitario uno dei principali fattori di performance è il tempo di risposta del biosensore oltre che il suo intervallo di risposta lineare.

L'acido lattico è un composto molto utilizzato nell'industria alimentare come additivo. La rilevazione della sua concentrazione nei cibi può consentire di stabilire se i limiti imposti dagli enti competenti sono stati rispettati nel processo di produzione e di conservazione degli alimenti.

Bibliografia

1. Smith AD (Ed) *et. al.* (1997) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* Oxford University Press ISBN 0-19-854768-4
2. Williams, H. S. (1904) *A History of Science: in Five Volumes. Volume IV: Modern Development of the Chemical and Biological Sciences* Harper and Brothers (New York) Accessed 04 April 2007
3. Dubos J. (1951). *Louis Pasteur: Free Lance of Science*, Gollancz. Quoted in Manchester K. L. (1995) *Louis Pasteur (1822-1895)--chance and the prepared mind.. Trends Biotechnol 13 (12): 511-515. PMID 8595136.*
4. Blake CC, Koenig DF, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR. (1965). *Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution.. Nature 22 (206): 757-761. PMID 5891407.*
5. La nomenclatura completa può essere visualizzata presso il sito della International Union of Biochemistry and Molecular Biology
6. Anfinsen C.B. (1973). *Principles that Govern the Folding of Protein Chains. Science: 223-230. PMID 4124164.*
7. Jaeger KE, Eggert T. (2004). *Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. Curr Opin Biotechnol. 15(4): 305-313. PMID 15358000.*
8. Richard Firn. *The Screening Hypothesis - a new explanation of secondary product diversity and function. URL consultato il 11 ottobre 2006.*
9. Fischer E. (1894). *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Ber. Dt. Chem. Ges. 27: 2985-2993.*
10. Koshland D. E. (1958). *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 44 (2): 98-104. PMID 16590179.*
11. Rodney Boyer, 6 in *Concepts in Biochemistry, 2nd ed. (in English), New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto., John Wiley & Sons, Inc. [2002], pp. 137-138. ISBN 0-470-00379-0 URL consultato il 21 aprile 2007.*
12. Michaelis L., Menten M. (1913). *Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49: 333-369. English translation Accessed 6 April 2007*

13. Briggs G. E., Haldane J. B. S. (1925). *A note on the kinetics of enzyme action. Biochem. J. 19: 339-339.* PMID 16743508.
14. Radzicka A, Wolfenden R. (1995). *A proficient enzyme.. Science 6 (267): 90-931.* PMID 7809611.
15. Robergs, RA; Ghiasvand, F; Parker, D (2004). "Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* PMID 15308499.
16. Lindinger, M. I. (2004). "Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
17. Zilberter Y, Zilberter T, Bregestovski P (September 2010). "Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: the role of energy homeostasis". *Trends Pharmacol. Sci.* PMID 20633934.
18. Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B (May 2011). "In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source". *J. Neurosci.* PMID 21593331.
19. Gladden LB (July 2004). "Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium". *J. Physiol. (Lond.)* PMID 15131240.
20. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, *et al.*(September 2007). "Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update". PMID 17659524.
21. Ivanov A., Mukhtarov M., Bregestovski P., Zilberter Y.-"Lactate effectively covers energy demands during neuronal network activity in neonatal hippocampal slices". *Frontiers in Neuroenergetics*, 2010.
22. Kasischke K.-"Lactate fuels the neonatal brain". *Frontiers in Neuroenergetics*, 2011.
23. "Factsheet on Lactic Acid"- NNFCC UK's national centre for Biorenewable energy, fuels and materials, 2011.
24. Duzgun A.P., Bugdayci G., Sayin B., Ozmen M.M., Ozer M.V., Coskun F.-"Serum D-lactate: a useful diagnostic marker for acute appendicitis", 2007. PMID: 17708281
25. S. Adamanti, *Dati di laboratorio (valori normali)*, Casa editrice scientifica internazionale, 1992.

26. Paul L. Marino, The ICU book, Terapia Intensiva: Principi fondamentali, Ed. Masson, 2007
27. B. Andreoni, O. Chiara, D. Coen, S. Vesconi, Diagnosi e Trattamento delle emergenze medico-chirurgiche, Ed. Masson, 2010
28. Havva Sahin Kavakli, Yunsur Cevik, Sinan Becel, Fatih Tanriverdi-
“Diagnostic value of lactate levels in acute appendicitis”. Journal of Pakistan Medical Association.
29. Lodi R., Cecchi L., Brasca M., Morandi S., Todesco R., Mendolia D.;
“Impiego di biosensori per la determinazione dell’acido D-L lattico nel controllo dei processi fermentativi nel settore lattiero-caseario”; CNR-Istituto di scienze delle produzioni alimentari.
30. Parra A., Casero E., Lorenzo E., Pariente F., Vázquez L.; “Nanomechanical properties of globular proteins: lactate oxidase”. Langmuir, 2007.

CAPITOLO 4: TECNICHE DI MISURA

4.1 Caratterizzazione di un biosensore

Per un biosensore qualsiasi, le tecniche di misura utilizzabili per la sua caratterizzazione sono molte e dipendono sia dalla componente biologica sia dal tipo di trasduttore che dalla particolare dinamica che si desidera indagare. La caratterizzazione della componente biologica può essere compiuta utilizzando tecniche chimiche per determinarne composizione, tipi di legame, loro stabilità e molte altre caratteristiche. Altre tecniche sono quelle di microscopia a bassa energia, che consentono di osservare da vicino tale componente senza danneggiarla.

Per quanto riguarda la caratterizzazione del trasduttore, anche in questo caso esiste una vasta molteplicità di tecniche a seconda che il trasduttore sia ottico, elettronico o di altra natura. Di seguito ci si concentrerà sulle tecniche di misura comunemente utilizzate nel caso di biosensori elettrochimici ad enzimi in particolare sulla spettroscopia elettrochimica di impedenza (electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) e sulla voltammetria ciclica (Cyclic Voltammetry, CVM).

4.1.1 Componente biologica

Qualsiasi sia il tipo di segnale che ci si aspetta di misurare da un biosensore, questo non ha alcuna validità se prima e dopo della sua rilevazione non viene caratterizzata la componente biologica immobilizzata sul trasduttore.

Come già detto precedentemente, la componente biologica è quella più problematica relativamente alla riproducibilità del biosensore in quanto, nonostante i controlli di qualità di fabbricanti e distributori, la sua adesione al trasduttore e la sua funzionalità è delicata e dipende da molti fattori sperimentali, spesso non facilmente gestibili o riproducibili. Per questo motivo qualsiasi studio su un biosensore non può prescindere dal caratterizzare questa componente dello stesso ed in particolare dal tipo e dalla solidità del legame tra di essa ed il trasduttore.

4.1.2-Trasduttore

Per quanto riguarda il trasduttore in un biosensore elettrochimico, esso viene caratterizzato tramite misure impedimetriche, amperometriche, coulometriche e

potenziometriche. Tutte queste misure consentono di definire e modellizzare con precisione tale componente del biosensore.

Il trasduttore deve essere dapprima caratterizzato in assenza della componente biologica immobilizzata su di esso, in modo da ottenerne un modello elettrico equivalente che lo descriva singolarmente. Solo successivamente si passa alla caratterizzazione dello stesso funzionalizzato, ricavando allo stesso tempo informazioni sulla bontà della funzionalizzazione e sulle nuove caratteristiche del trasduttore.

4.1.3-Rilevazione

Una volta caratterizzato il trasduttore funzionalizzato in assenza dell'analita in esame è possibile passare a definirne le proprietà quando questo viene in contatto con il substrato di interesse definendo le grandezze necessarie alla valutazione della performance del biosensore (cfr. Capitolo 2).

E' altresì auspicabile studiare e definire gli effetti di altre sostanze sulla risposta del biosensore stesso in modo da comprovare la selettività del biosensore, una delle sue caratteristiche più importanti.

4.2 Spettroscopia elettrochimica di impedenza

Questa tecnica, benchè sia stata sviluppata per essere applicata a sistemi elettrochimici, può produrre informazioni attendibili sui processi che vi si svolgono solo quando essi soddisfano alcune fondamentali condizioni. Questa necessità trae origine dalla complessità di questi sistemi, sarà quindi necessario porre alcune ipotesi di base.

4.2.1 Definizione

La spettroscopia di impedenza si basa sul classico metodo della funzione di trasferimento (Transfer Function, TF). Il sistema sotto indagine viene perturbato con un'onda sinusoidale in ingresso e ne viene misurata la risposta in uscita. Se il sistema è lineare la risposta è anch'essa sinusoidale con la stessa frequenza ma ampiezza e fase diverse. Il rapporto tra il segnale in uscita e quello in ingresso determinano il coefficiente di trasferimento complesso alla corrispondente frequenza. La

dipendenza di questo coefficiente dalla frequenza definisce la funzione di trasferimento del sistema.

Se determinata in un range di frequenze sufficientemente ampio la funzione di trasferimento descrive interamente le proprietà dinamiche del sistema lineare. Definita in tal modo, la TF rappresenta le proprietà tanto del sistema in stato stazionario che in stato non stazionario. Se il sistema è in stato stazionario allora lo è anche la sua risposta alla perturbazione.

4.2.1.2 *Ipotesi di applicabilità*^[11]

L'applicazione diretta del metodo della funzione di trasferimento ai sistemi elettrochimici è impossibile a causa del loro comportamento non lineare. La soluzione al problema consiste nell'applicazione di un piccolo segnale come perturbazione in ingresso, in tal modo la risposta può essere considerata lineare. Se come segnale in ingresso si applica una corrente e si misura in uscita una tensione, allora la funzione di trasferimento rappresenta un'impedenza ($Z(i\omega)$), viceversa si ha un'ammettenza ($Y(i\omega)$).

L'interpretazione della EIS come una TF la rende una descrizione lineare completa del sistema elettrochimico in stato stazionario sotto esame.

Nella realtà i sistemi elettrochimici sono caratterizzati da processi di trasferimento di massa ed energia che possono avvenire anche durante la misura, modificando la struttura ed i parametri del sistema. Questo può dunque mostrare caratteristiche non lineari, non stazionarie e isteretiche. L'analisi di tali sistemi mediante EIS necessita dunque di una serie di semplificazioni che possono essere generalizzate in un certo numero di ipotesi sperimentali:

- *Ipotesi concernenti l'analisi di sistemi:*
 1. Linearità;
 2. Stazionarietà;
 3. Valori finiti (parti reale e immaginaria non infinite);
 4. Singoli Input/Output (parametri e condizioni sperimentali costanti);
 5. Assenza di memoria;
 6. Osservabilità (fenomeni indagati nel range di frequenze misurato).
- *Ipotesi concernenti i sistemi elettrochimici:*

1. Addittività (della corrente faradica e di quella di carica di double layer);
2. Elettroneutralità (della soluzione elettrolitica);
3. Assenza di migrazione e convezione;
4. Assenza di flussi laterali di massa/carica.

Tali ipotesi possono anche essere viste come limitazioni agli esperimenti che possono essere condotti. Per questo motivo negli ultimi anni la tendenza è quella di cercare di eliminare le restrizioni imposte da ognuna di queste ipotesi.

4.2.1.2 Tipo di caratterizzazione^[11]

Tutta l'informazione ottenuta mediante EIS è contenuta nella funzione impedenza o ammettenza. Esse hanno la possibilità di separare la cinetica dei diversi passi coinvolti nel processo sotto indagine dato che come funzione di trasferimento danno una descrizione completa, locale e lineare del sistema. D'altra parte tali informazioni debbono essere estratte dai dati. L'impedenza misurata non è una realtà fisica ma qualcosa che descrive le proprietà ed i processi in atto nel sistema, per interpretarla correttamente è necessario costruire un modello fisico del sistema stesso. Tale modello deve costituire una presentazione razionale dei fenomeni esistenti e della conoscenza preliminare che si ha del sistema.

Costruito il modello, i dati vi vengono fatti aderire attraverso una normale procedura di identificazione, che può far prendere all'esperimento da diverse vie:

- Conferma del modello ipotetico costruito preliminarmente (approccio teorico);
- Derivazione del modello dai dati ottenuti (approccio sperimentale).

Nel primo caso l'identificazione è solo parametrica mentre nel secondo è anche strutturale.

L'approccio teorico è anche detto modellizzazione classica, essenzialmente deriva un'espressione teorica per l'impedenza dell'oggetto sotto esame basandosi su alcune considerazioni sui processi che avvengono all'interfaccia dell'elettrodo.

La modellizzazione strutturale, tipica dell'approccio sperimentale, assume che il modello matematico dell'impedenza possa essere direttamente rappresentato nel

domino della frequenza, come una costruzione di diversi elementi interconnessi secondo alcune leggi, in accordo con il reale comportamento del sistema sotto indagine.

Ogni elemento dovrebbe descrivere un singolo processo fisico nell'oggetto di cui si misura l'impedenza, quindi il modello completo può essere costruito come un circuito elettrico corrispondente ad un certo meccanismo. Un vantaggio di tali modelli è il ridotto numero di parametri che li rende completamente identificabili oltre alla loro facilità di manipolazione.

4.2.1.3 Fasi dell'analisi dei dati^[11]

L'analisi dei dati si compone, prima di tutto, di una fase di pre-processing nella quale si stimano e si correggono, per quanto possibile, gli errori sperimentali. Tale fase include diverse procedure:

- *Visualizzazione dei dati:* vista la tridimensionalità dei dati, che sono a valori complessi, per visualizzare i dati si utilizzano due rappresentazioni: quella cartesiana ($Z(i\omega_i) = Re_i + iIm_i$) che porta al diagramma di Nyquist, e quella in coordinate polari ($Z(i\omega_i) = |Z|e^{i\varphi_i}$) che sfocia nei diagrammi di Bode.
- *Calibrazione della cella di misura e degli strumenti:* la cella di misura contenente l'oggetto sotto esame e le relative connessioni a questo tramite l'interfaccia elettrochimica deve essere di tipo planare o cilindrica coassiale per rispettare l'ipotesi di assenza di flussi laterali. Purtroppo anche con una geometria perfetta la cella presenta degli elementi parassiti, soprattutto alle alte frequenze, che possono deteriorare l'accuratezza delle misure. Il più semplice tra questi elementi ed anche quello dominante nel caso di oggetti a bassa impedenza è l'autoinduttanza della cella stessa (L_p). Questa deve essere tenuta in considerazione e, se possibile, misurata e compensata. Per farlo solitamente si fanno delle misure di calibrazione:
 - Misure in corto circuito per valutare impedenza ed induttanza dei cavi;
 - Misure su un oggetto di prova ad elevata conduttanza per valutarne l'autoinduttanza.

- *Filtraggio*: lo scopo di questo passo è quello di individuare ed eliminare i dati pesantemente affetti da errori, il cui utilizzo per l'identificazione del modello farebbe solo decrescere la precisione dell'analisi. Tale procedura solitamente si concentra a frequenze prossime a quelle dell'alimentazione (50Hz), potendo arrivare anche fino ai 250Hz, è noto infatti che in questo range si hanno spesso dati erranei.

Altri punti che devono essere filtrati sono i cosiddetti “wild points”, cioè quelli che non rispettano il comportamento generale di un dato insieme di altri punti. La classificazione di questi punti è delicata e può essere fatta analizzando lo spettro locale di Taylor degli insiemi reali e complessi dei dati.

- *Qualità dei dati*: questa procedura serve a valutare velocemente e direttamente la qualità dei dati allo scopo di filtrarli o di pesarli adeguatamente durante l'identificazione del modello. Un modo possibile per effettuare tale valutazione è quello di sfruttare la proprietà delle impedenze degli oggetti elettrochimici di essere sistemi privi di risonanza ed a frequenza continua. Dunque parte reale ed immaginaria dell'impedenza in funzione del logaritmo della frequenza dovrebbero avere un comportamento abbastanza “smooth” e la presenza di deviazioni rapide può essere considerata come dovuta alla presenza di dati erranei.

La valutazione della qualità è anche basata sull'analisi dello spettro di Taylor.

A questo punto, solitamente, si hanno abbastanza dati per poter verificare la validità delle ipotesi sperimentali descritte poco sopra. Quando il sistema esaminato è lineare l'impedenza dovrebbe essere indipendente dall'ampiezza del segnale in ingresso, quindi sarà sufficiente ripetere le misure su tutto il range di frequenze considerate con ampiezza del segnale in ingresso crescente. La media della differenza pesata tra due serie di misure consecutive viene utilizzata come una misura diretta della validità dell'ipotesi di linearità.

L'ipotesi di stazionarietà può essere testata sperimentalmente ripetendo due esperimenti consecutivi con gli stessi parametri e nelle stesse condizioni. In questo modo la media della differenza pesata dei dati dei due esperimenti può essere ancora una volta utilizzata come misura diretta della stazionarietà del processo allo studio.

I sistemi elettrochimici sono a priori molto sensibili agli effetti di memoria che traggono origine in loro dalla connessione esistente tra trasporto di carica e di massa. Nella pratica, per testare tale effetto si possono condurre due esperimenti consecutivi il cui unico parametro diverso sia la direzione di misura in frequenza (per frequenze crescenti o decrescenti). In tal modo l'apparire di un'isteresi evidente è indice sperimentale della presenza di memoria nel sistema. Anche in questo caso è comodo utilizzare la media delle differenze pesate dei due insiemi di misure.

Terminata la validazione delle ipotesi sperimentali si passa alla parte principale dell'analisi dei dati, l'identificazione dei parametri. Solitamente il modello viene presentato con una matrice M , composta da una sotto matrice S (matrice di struttura) e dal vettore dei relativi parametri. La matrice di struttura è a sua volta definita dalla matrice degli elementi E e da quella delle rispettive connessioni C .

Nell'approccio teorico si assume nota la struttura del modello, quindi l'identificazione in questo caso è solo parametrica. Una volta eseguita l'identificazione è necessario validarla, ciò include alcuni passi:

- *Simulazione del modello*: l'impedenza del modello può essere ottenuta per simulazione dato che modello e relativi parametri sono ora noti. Si viene dunque in possesso del comportamento dell'impedenza del modello.
- *Selezione del criterio di prossimità*: solitamente il criterio utilizzato è la differenza o la differenza pesata dei dati ottenuti da quelli sperimentali ma nulla vieta di utilizzare anche funzioni più sofisticate.
- *Analisi dei residui*: fornisce informazioni sull'adeguatezza del modello scelto a priori. Questa analisi è volta a dimostrare che tutti i residui hanno proprietà di rumore Gaussiano bianco (nel caso ideale). Nel caso non fosse così il modello non è adeguato a descrivere l'oggetto.

Dopo aver testato una serie di modelli possibili per il sistema sotto esame, deve essere scelto il migliore. Esso corrisponde al miglior fit e viene selezionato utilizzando una procedura ai minimi quadrati, eventualmente pesati.

Nel caso generale l'identificazione parametrica richiede la soluzione di complesse equazioni differenziali non lineari, queste vengono risolte numericamente, spesso basandosi sul metodo di Newton-Marqueward.

Il problema principale dell'approccio classico sopra descritto è che esso necessita della conoscenza di un modello a priori del sistema sotto analisi. Esistono situazioni, come quella dell'indagine di un nuovo oggetto del quale non si conosce nulla, che non rispettano questa esigenza. La discrepanza tra la tecnica di misura della spettroscopia elettrochimica di impedenza, in grado di fornire misure precise e dell'interpretazione dei dati da essa forniti è ciò che sta guidando lo sviluppo di questa tecnica verso nuovi approcci di identificazione strutturale.

4.2.2 Modelli elettrici equivalenti^[11]

Di seguito si introdurranno le strutture e gli elementi di base utilizzati nei modelli. Nel capitolo relativo all'interfaccia si è introdotto un modello particolare che verrà visto anche qui ma nella descrizione di questa tecnica di misura si è preferito attenersi al caso generale descrivendo strutture ed elementi di cui sono composti la gran parte dei modelli utilizzati nella letteratura. Per quanto riguarda le strutture, esse sono tre:

- *La struttura di Maxwell:* costituita dal parallelo degli elementi in essa contenuti nella quale dunque, le correnti che scorrono lungo i diversi rami della struttura sono additive. L'ammettenza di questa struttura, utilizzate per modellizzare i processi paralleli, viene calcolata come somma delle ammettenze dei rami che la compongono.
- *La struttura di Voigt:* composta dalla serie di sottocircuiti, la cui impedenza è dunque calcolata come la somma delle loro impedenze. La corrente per ciascuno di questi sottocircuiti è la stessa ed i fenomeni da essi modellati iniziano nello stesso istante, con velocità che dipendono solo dalle loro rispettive costanti di tempo.

Questa struttura è utilizzata principalmente per modellizzare campioni con bulk allo stato solido.

- *La struttura ladder:* è caratterizzata da una serie di nuclei corrispondenti ai fenomeni da loro modellati che si susseguono in modo sequenziale. Questa struttura ha il tipico aspetto di una scala a pioli, da cui il nome.

4.2.2.1 Elementi

Gli elementi che possono comporre tali strutture (noti come elementi strutturali) sono divisibili in due gruppi: quelli singoli, tipici dell'ingegneria elettrica (resistenze, condensatori ed induttanze), capaci di descrivere solo sistemi omogenei e quelli dipendenti dalla frequenza in grado di rappresentare le nonlinearità in frequenza tipiche di diversi processi elettrochimici. Di seguito si riportano tali elementi strutturali:

- *Resistenza (R)*: la sua impedenza è

$$Z_R(i\omega) = R \quad (4.1)$$

Dunque la sua parte immaginaria è sempre nulla. Fisicamente, questo elemento rappresenta le perdite e le dissipazioni di energia, le barriere di potenziale, la conduzione elettronica o quella ionica con portatori di carica veloci. Dal punto di vista matematico esprime una relazione lineare tra i parametri di stato.

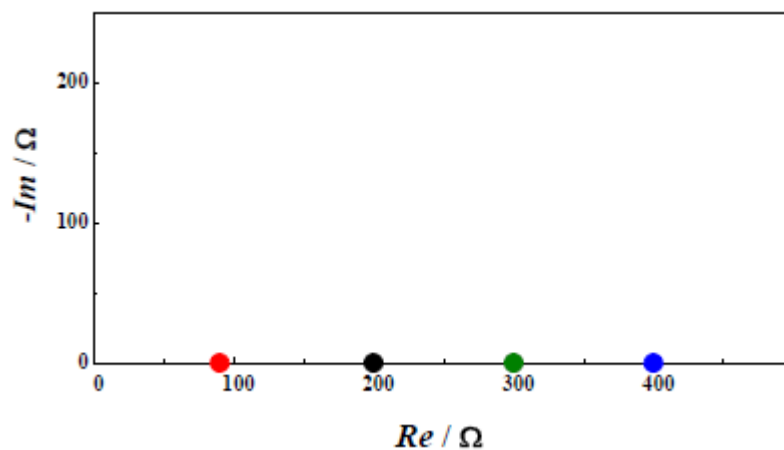


Figura 4.11: simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da una sola resistenza (R = 100, 200, 300, 400 Ω).

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

parametro non è in alcun modo affetto dalle trasformazioni chimiche che avvengono sulla superficie elettrodica.

L'altra componente, R_{et} , dipende invece dalle caratteristiche dielettriche e isolanti all'interfaccia elettrodo/elettrolita. Tale resistenza descrive il ritardo nella cinetica del trasferimento elettronico sulla superficie introdotto da strati isolanti dovuti a eventuali modifiche effettuate sulla superficie elettrodica. Se ci si pone nell'ipotesi che lo strato di modifica superficiale dell'elettrodo sia omogeneo e occupi tutta la superficie elettrodica, tale resistenza consta di due componenti serie $R_{et} = R_{Au} + R_{mod}$ ove R_{Au} è la componente costante di trasferimento elettronico legata all'elettrodo non modificato (la specifica rispetto all'elettrodo d'oro è stata fatta in quanto elettrodo di interesse per lo studio del biosensore) mentre R_{mod} è la componente variabile legata alle modifiche della superficie elettrodica. È doveroso inserire tale ipotesi in quanto nel caso in cui la modifica non occupi la totalità della superficie, ci sarebbero delle aree in diretto contatto con la soluzione elettrolitica e tale relazione quindi non sarebbe più valida^[13].

- *Capacità (C)*: la sua impedenza è

$$Z_C(i\omega) = (i\omega C)^{-1} \quad (4.2)$$

Essendo quindi puramente immaginaria ha parte reale sempre nulla. Il significato fisico della capacità è l'accumulazione di energia elettrostatica o

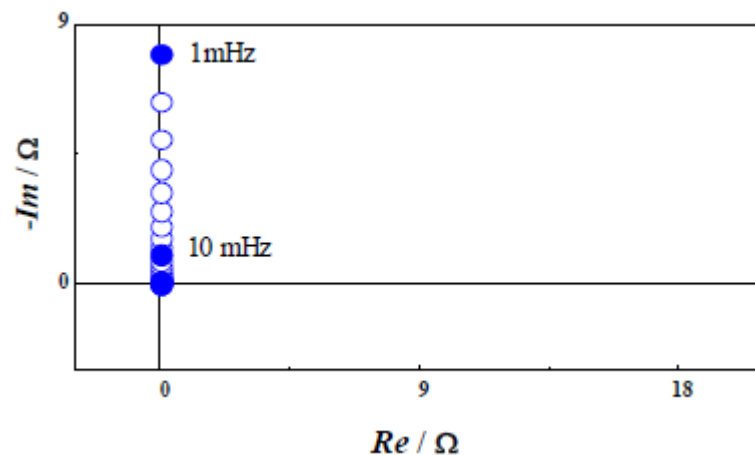


Figura 4.12: simulazione del diagramma di Nyquist per un circuito costituito da un solo condensatore nell'intervallo di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz ($C = 1$ mF).

di portatori di carica. Matematicamente rappresenta una relazione integrale tra le variabili di stato.

- *Induttanza (L)*: la sua impedenza è:

$$Z_L(i\omega) = i\omega L \quad (4.3)$$

Anch'essa ha parte reale sempre nulla ma è, a differenza della capacità, direttamente proporzionale alla frequenza.

Dal punto di vista fisica questo elemento rappresenta l'accumulazione di energia magnetica nonché l'autoinduttanza di flussi di corrente o di portatori di carica. Matematicamente esprime una relazione di derivazione tra le variabili di stato.

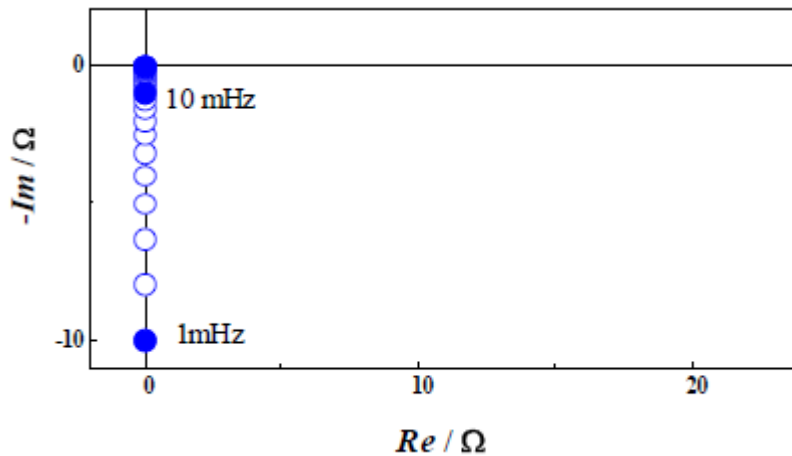


Figura 4.3: Diagramma di Nyquist dell'impedenza di un induttanza simulate nell'intervallo di frequenze $10^3 \div 10^{-3}$ Hz ($L = 1E-3$ H).

- *Elemento di Warburg (W)*: è stato introdotto per descrivere la diffusione lineare semi-infinita, regolata dalla seconda legge di Fick. La sua impedenza è

$$Z_W(i\omega) = \sigma\sqrt{i\omega} \quad (4.4)$$

Dove σ è noto come parametro di Warburg ed è espresso in $\Omega/s^{1/2}$.

La parte reale quella immaginaria sono uguali il che comporta uno sfasamento di 45° costante in frequenza.

- *Elemento di Warburg limitato (BW)*: è stato introdotto per descrivere la diffusione lineare in uno strato omogeneo di spessore finito e una reazione Faradica idealmente reversibile alla fine dello strato. La sua impedenza è

$$Z_{BW}(i\omega) = \sqrt{i\omega} \tanh \sqrt{\frac{i\omega R_0^2}{\sigma}} \quad (4.5)$$

Dove σ e R_0 sono due parametri strutturali indipendenti determinabili dell'analisi dell'impedenza.

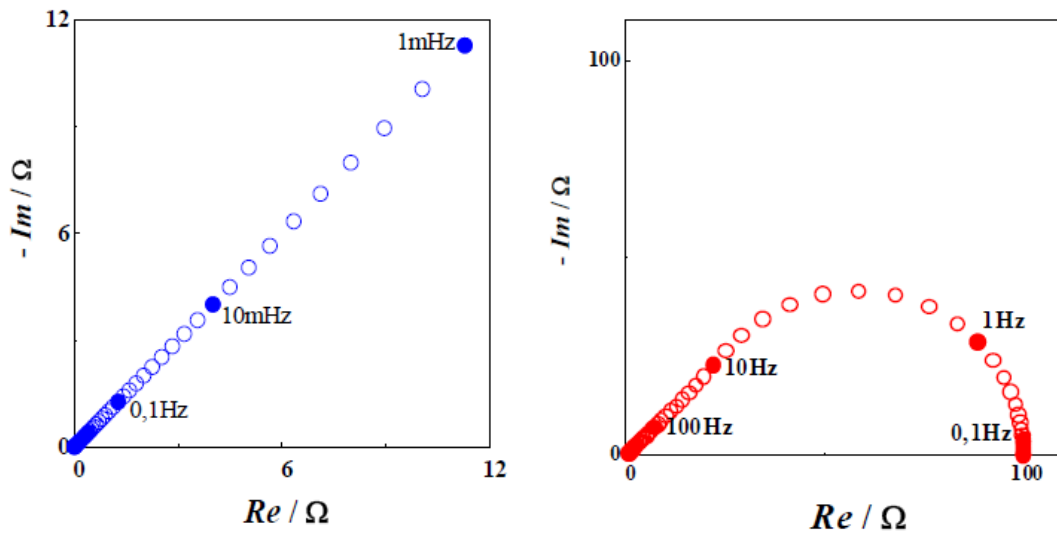


Figura 4.13: simulazione del diagramma di Nyquist nel range di frequenze $10^{-3} - 10^3$ Hz per l'impedenza dell'elemento di Warburg ideale (grafico blu, $\sigma = 400 \Omega / s^{1/2}$) e per l'elemento di Warburg limitato (grafico rosso, $\sigma = 0.01 \Omega / s^{1/2}$, $R_0 = 100 \Omega$).

- *Elemento a fase costante (CPE)*: è stato introdotto per descrivere la dipendenza dalla frequenza causata dalla ruvidità della superficie o dalle distribuzioni non uniformi delle proprietà delle superfici irregolari dell'elettrodo. La sua impedenza è data da:

$$Z_{CPE}(i\omega) = \frac{1}{A (i\omega)^n} \quad (4.6)$$

Dove A è un fattore di proporzionalità e n è l'esponente del CPE, che caratterizza lo sfasamento. CPE è un elemento generico dato che può modellare R, C, L, W come anche delle distorsioni di questi che abbiano un

certo tipo di dipendenza dalla frequenza. Fisicamente rappresenta una distribuzione esponenziale di costanti di tempo.

- *Elemento a fase costante limitato (BCPE)*: rappresenta l'impedenza di uno strato omogeneo limitato con un comportamento di tipo CPE della conduttività nel volume elementare e con conduttività finita in corrente continua. La sua impedenza è:

$$Z_{BCP}(i\omega) = \frac{\tanh [R_0 A (i\omega)^n]}{A (i\omega)^n} \quad (4.7)$$

Dove A, n, R₀ sono i parametri strutturali dell'elemento.

Questo elemento è il modello più generale per gli strati omogenei in quanto può rappresentare tutti gli elementi visti precedentemente per opportuni valori dei suoi parametri. A frequenze sufficientemente alte il suo comportamento tende al CPE.

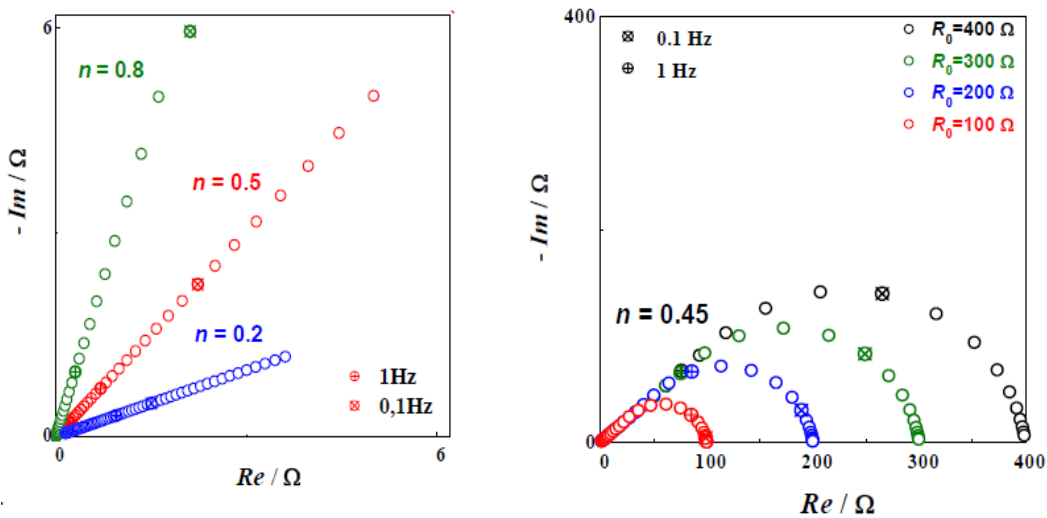


Figura 4.14: diagramma di Nyquist nel range di frequenze 10⁻³ – 10³ Hz per l'impedenza dell'elemento a fase costante ideale a differenti valori di n (grafico di sinistra, A = 100) e limitato, per differenti valori di R₀ e con n fissato (grafico di destra A = 0,01).

4.2.2.2 Modelli degli elettrodi^{[11][12]}

Grazie alle strutture ed agli elementi sopra descritti è dunque possibile costruire diversi modelli per diversi processi elettrochimici.

Il caso di un elettrodo idealmente polarizzabile, il più semplice per quanto riguarda l'interfaccia metallo-elettrolita, viene modellizzato con la serie della componente resistiva della soluzione elettrolitica e quella capacitiva di double layer.

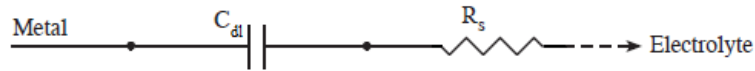


Figura 4.15: Modello per l'elettrodo polarizzabile ideale.

L'impedenza di tale modello risulta quindi:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{1}{j\omega C_{dl}} \quad (4.8)$$

Per quanto riguarda invece il caso dell'elettrodo polarizzabile non ideale si assume che avvenga un processo di trasferimento di carica dunque si andrà ad aggiungere al modello precedente un'impedenza faradica (R_t) in parallelo alla capacità di double layer.

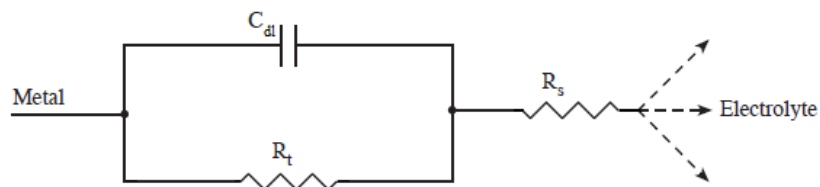


Figura 4.16: Modello per l'elettrodo polarizzabile non ideale.

Dunque l'impedenza del modello risulta^[13]:

$$Z(j\omega) = R_s + \frac{R_t \frac{1}{j\omega C_{dl}}}{R_t + \frac{1}{j\omega C_{dl}}} \quad (4.9)$$

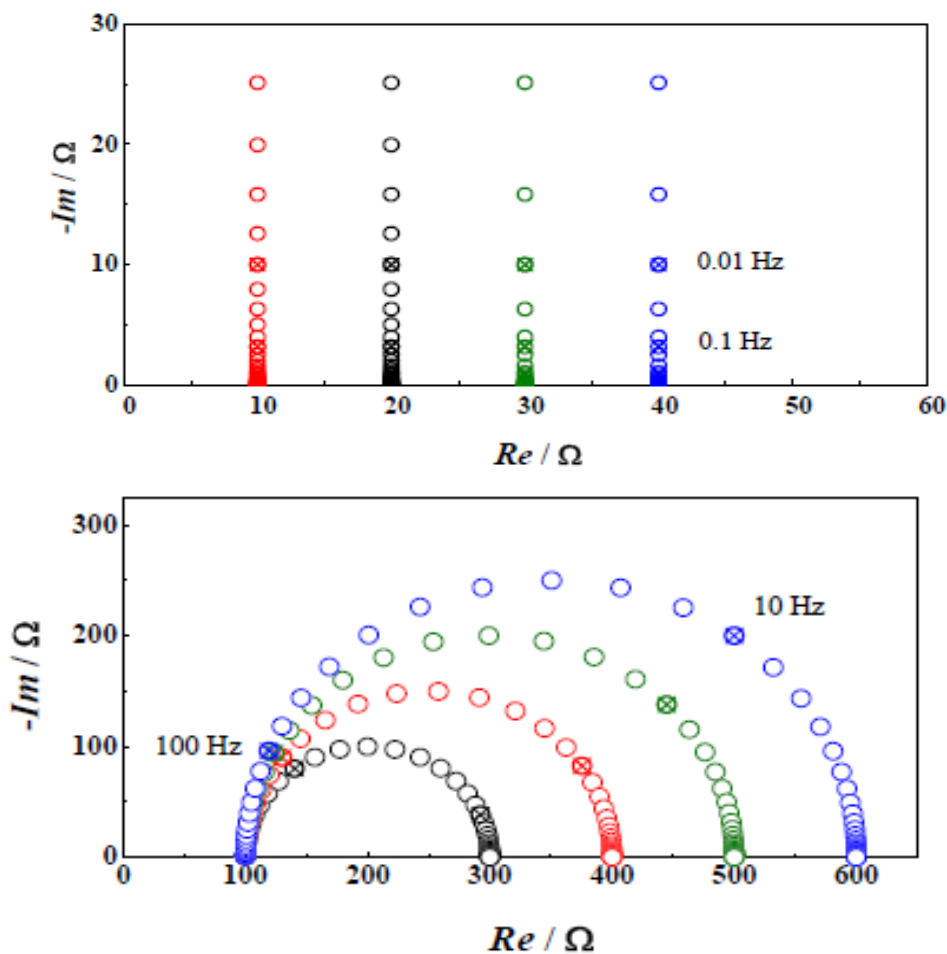


Figura 4.17: Diagrammi dell'impedenza di un elettrodo polarizzabile ideale per diversi valori di R_s ($C_{dl} = 10 \text{ mF}$) (figura di sinistra) e di un elettrodo polarizzabile non ideale per diversi valori di R_t ($R_s = 100 \text{ Ohm}$, $C_{dl} = 100 \text{ } \mu\text{F}$) (figura di destra), entrambi simulati nell'intervallo di frequenze $10^3 \div 10^{-3} \text{ Hz}$

Dalle considerazioni descritte nel capitolo relativo all'interfaccia metallo/elettrolita è stato derivato un modello molto utilizzato negli studi sui biosensori elettrochimici. Esso è noto come modello di Randles.

In tale modello l'elettrodo si tiene conto della capacità di double layer (C_d) che caratterizza la regione interfase, ben descritta dal modello di Stern (cfr. Paragrafo 1.1.2.3), in parallelo ad una resistenza (R_t) che descrive il trasferimento elettronico tra metallo ed elettrolita.

Tale resistenza è in serie con un elemento di Warburg in modo da modellizzare la diffusione che domina il trasferimento elettronico.

Infine, in serie a questi elementi è posta una resistenza (R_s) che modella l'opposizione, da parte dell'elettrolita, al passaggio della corrente e dunque lo caratterizza.

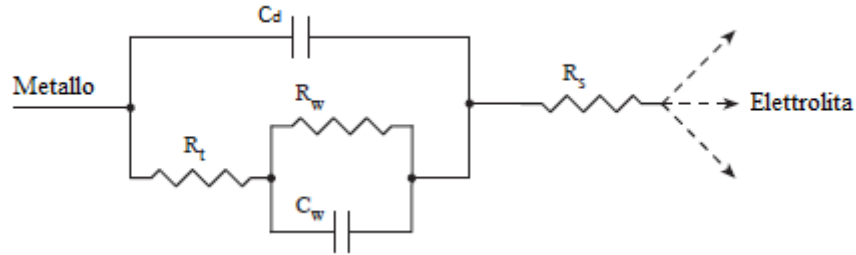


Figura 4.18: Modello di Randles per l'interfaccia metallo elettrolita. Il modello è costituito dalla Capacità di double layer (C_{dl}), dalla resistenza di trasferimento (R_t) e dall'elemento di Warburg (qui descritto come un parallelo RC) nel ramo faradico ed infine dalla resistenza di spreading (R_s).

Utilizzando le nozioni qui introdotte esso ha una struttura ladder contenente la resistenza dell'elettrolita (R_s) seguita dal parallelo tra la capacità di double layer (C_{dl}) e la serie della resistenza di trasferimento elettronico (R_t) e l'elemento di Warburg (W) che tiene conto della diffusione.

L'impedenza di questo modello è:

$$Z_{RND}(i\omega) = R_s + \frac{1}{i\omega C_{dl} + \frac{1}{R_t + \sigma\sqrt{\omega} - i\sigma\sqrt{\omega}}} \quad (4.10)$$

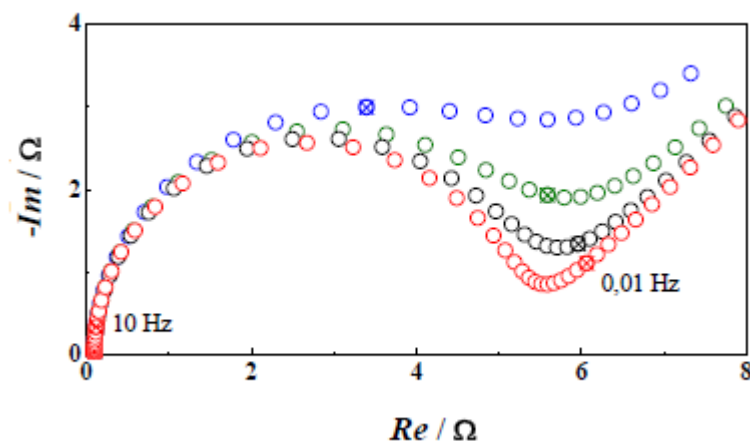


Figura 4.19: diagramma dell'impedenza per il modello di Randles simulato nell'intervallo di frequenza tra $10^3 \div 10^{-3}$ Hz per diversi valori di C_{dl} : 300 μ F, 1 mF, 3 mF, 10 mF ($R_s = 100$ Ohm, $R_t = 5000$ Ohm, $\sigma = 100$).

Il parametro strutturale σ è correlato ai parametri elettrochimici:

$$\sigma = R_t [k_f^O \sqrt{D_O} + k_f^R \sqrt{D_R}] \quad (4.11)$$

Dove D_O e D_R sono i coefficienti di diffusione delle specie.

Un modello più utilizzato è il Bounded Randles, uguale al precedente a parte per l'elemento di Warburg che viene sostituito con quello limitato (BW). Tale modello considera anche un processo di diffusione lineare ma finita attraverso uno strato di spessore finito.

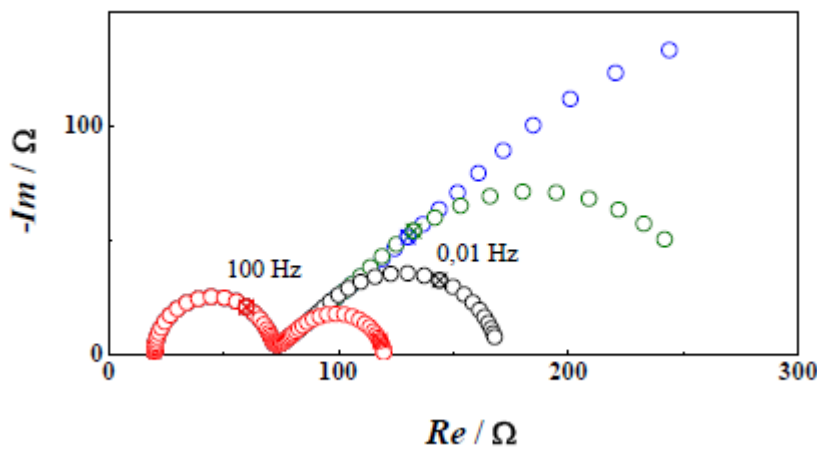


Figura 4.20: diagramma dell'impedenza per il modello Bounded Randles simulato nell'intervallo di frequenza $10^3 \div 10^{-3}$ Hz per diversi valori di R_0 : 50 Ohm, 100 Ohm, 200 Ohm, 400 Ohm ($R_s = 20$ Ohm, $C_{dl} = 1E-4$ F, $R_t = 50$ Ohm, $A = 0.1$, $n = 0.45$).

Questi modelli, come già detto, si riferiscono al caso omogeneo, introduciamo quindi uno costruito per un elettrodo polarizzabile eterogeneo che rappresenti la reazione Faradica provocata dall'adsorbimento di una specie. Il modello considerato opera in assenza di limitazioni dovute alla diffusione ed ha una struttura ladder dove il primo elemento è una resistenza (R), il secondo è un parallelo RC (C_1/R_2) ed il terzo è un altro parallelo RC (C_2/R_3).

In questo modello $R=R_s$, $C_1=C_{dl}$ e $R_2=R_t$ dunque R , R_2 e C_1 hanno un diretto significato fisico mentre

$$R_3 = R_t \frac{(b_1 - b_2)(k_1 c_B - k_2)}{2(b_2 k_1 c_B + b_1 k_2)} \quad (4.12)$$

$$C_2 = \frac{\beta(b_1 + b_2)}{R_t(b_1 - b_2)(k_1 c_B - k_2)} \quad (4.13)$$

$$R_2 = R_t = \frac{1}{\frac{k_1 c_B}{FA(b_1 + b_2)} + \frac{1}{k_2}} \quad (4.14)$$

E' importante notare che R_3 e C_2 possono assumere sia valori positivi che negativi, dipendentemente dal segno della combinazione di parametri elettrochimici:

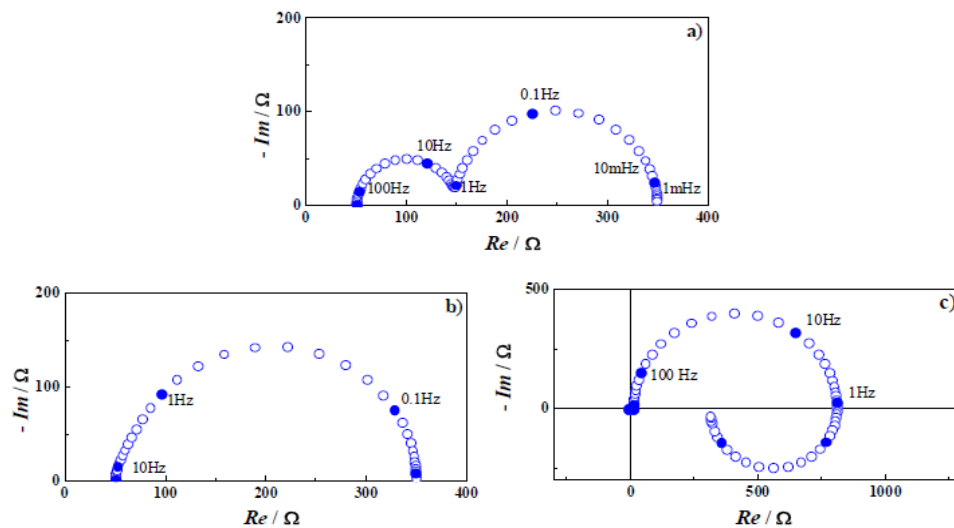


Figura 4.21: diagrammi dell'impedenza di una reazione faradica con una specie adsorbita simulato nel range di frequenze 10^{-3} ÷ 10^3 Hz per diversi valori dei parametri. [(a): $R_1 = 50$ Ohm, $C_1 = 1E-4$ F, $R_2 = 100$ Ohm, $C_2 = 1E-2$ F, $R_3 = 200$ Ohm; (b): $R_1 = 50$ Ohm, $C_1 = 1E-3$ F, $R_2 = 100$ Ohm, $C_2 = 1E-2$ F, $R_3 = 200$ Ohm and (c): $R_1 = 10$ Ohm, $C_1 =$

$$(b_1 - b_2)(k_1 c_B - k_2) \quad (4.15)$$

In seguito all'identificazione dei parametri del modello utilizzato, è possibile da questi stimare la copertura della superficie dell'elettrodo da parte della specie su di essa immobilizzata. In particolare, nel caso dei biosensori ad enzimi, è dunque possibile caratterizzare la loro presenza e la loro densità sull'elettrodo, nonché ma solo fino ad un certo punto la loro funzionalità residua.

4.2.2.3 Interconnessioni e parassiti

I microelettrodi creati utilizzando la tecnologia di fabbricazione dei circuiti integrati hanno una struttura di base caratterizzata da un substrato che può essere composto da vetro, plastica o anche un semiconduttore, un dielettrico sopra di esso e sopra ancora le tracce conduttive dei microelettrodi, coperte nelle zone di non interesse da uno strato di passivazione.

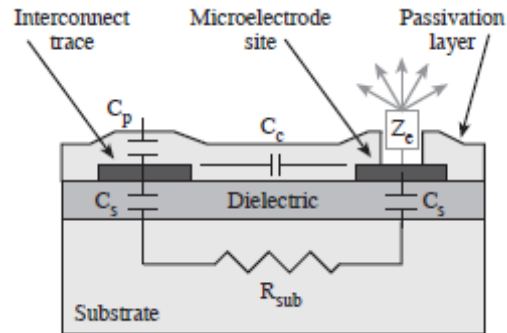


Figura 1.12: Sezione di un elettrodo e schema dei parassiti caratteristici dello stesso.

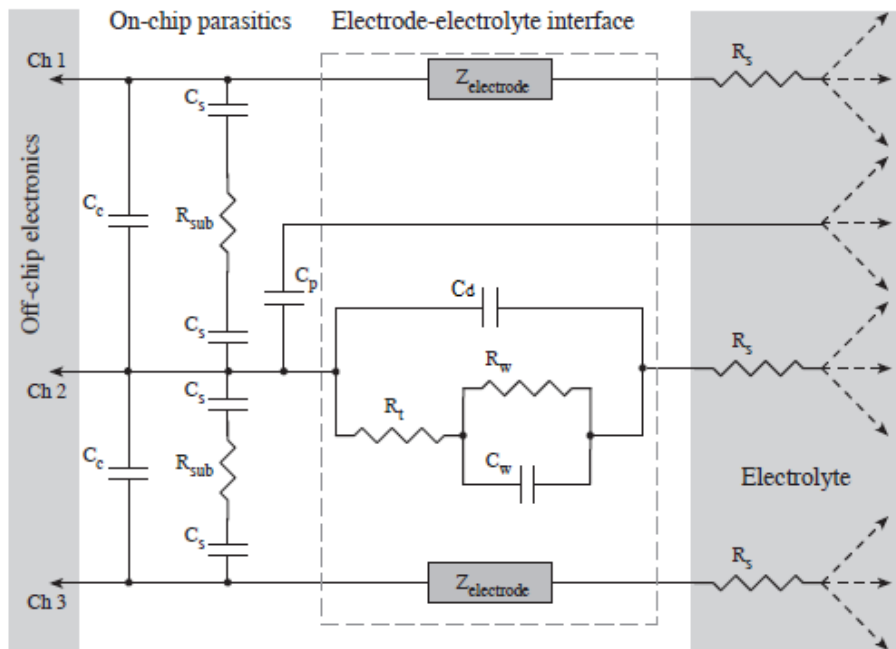


Figura 1.13: Modello completo per un elettrodo semplice in un elettrolita puro.

Nel caso in cui il substrato sia conduttivo si avrà una capacità parassita (C_s) tra esso e le tracce conduttive (elettrodi, connessioni e pad di collegamento). La capacità può produrre cross-talk tra elementi adiacenti attraverso la resistenza del substrato se questo non è posto a massa o una riduzione del segnale nel caso in cui lo sia.

Questi parassiti dipendono sia dall'area geometrica dell'elettrodo che dallo spessore del dielettrico.

Ulteriori parassiti sono costituiti dalla capacità che produce cross-talk tra elettrodi adiacenti (C_c) e da quella esistente tra le connessioni e l'elettrolita (C_p). Esistono altri parassiti per questo tipo di elettrodi ma qui non vengono presi in considerazione.

n quanto non sono particolarmente influenti, nelle applicazioni di nostro interesse, rispetto a quelli già citati.

4.3 Tecniche Voltammetriche

Tali tecniche si basano sul concetto fondamentale che il comportamento elettrochimico di un sistema può essere caratterizzato completamente dalle sue curve corrente-tempo in corrispondenza ad un certo potenziale in ingresso. Utilizzando direttamente tale approccio si arriva ad ottenere una superficie tridimensionale.

La raccolta e l'analisi di tali dati può però essere complicata, in realtà si ottengono maggiori informazioni facendo variare nel tempo il potenziale e registrando direttamente le curve corrente-potenziale.

4.3.1 Cronoamperometria

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



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

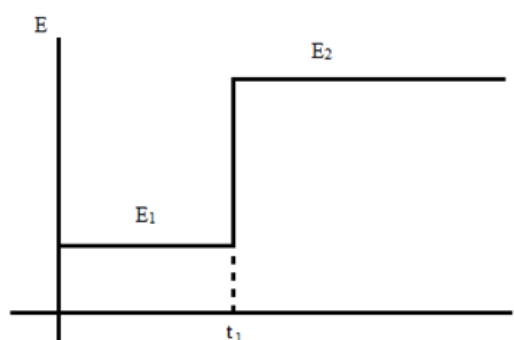


Figura 4.13: Andamento del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro durante una cronoamperometria.

Il potenziale E_1 viene scelto in modo tale che nessuna reazione possa avvenire all'elettrodo, mentre E_2 è il potenziale alla quale avviene la reazione riportata nell'equazione (4.16).

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

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

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

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

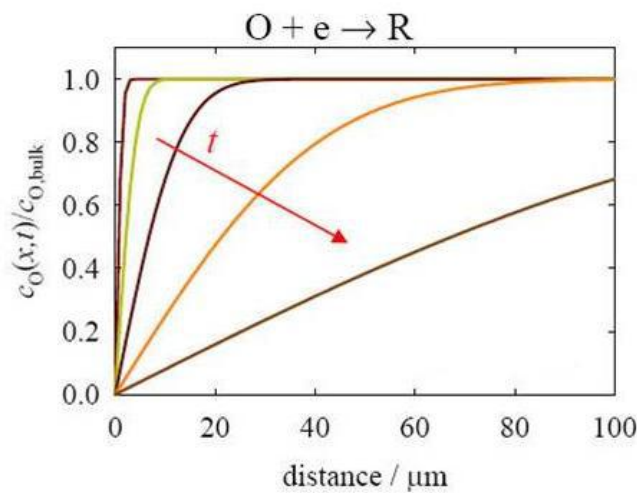


Figura 4.14: Profili di concentrazione ottenuti in condizione di diffusione limite a diversi istanti di tempo. Da notare l'andamento in diminuzione della concentrazione con l'andare del tempo (da curva rossa a curva marrone) ^[1]

Dall'integrazione della seconda legge di Fick:

$$D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (4.17)$$

E con l'introduzione di opportune condizioni al contorno:

$$t \leq 0; c(x, t) = c_{bulk} \quad (4.18)$$

$$t > 0; c(0, t) = 0 \quad (4.19)$$

Si ottiene l'andamento della corrente nel tempo:

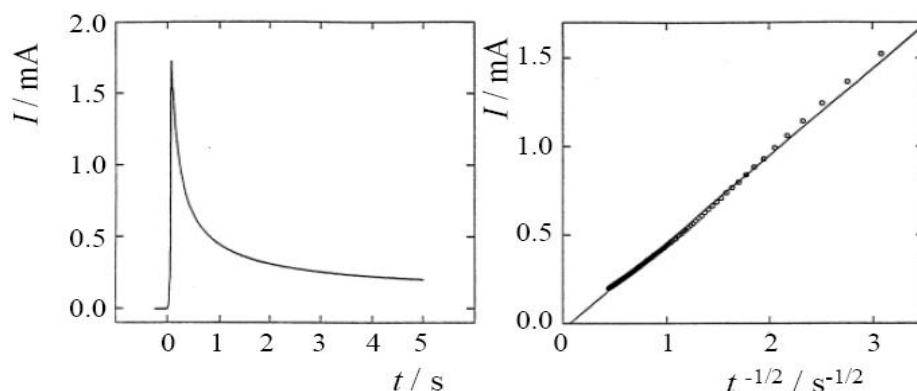


Figura 4.15: esempio di risposta cronoamperometrica ottenuta ad un elettrodo di platino in tampone fosfato a pH 6 in presenza di ferrocene 8,25 mM. Scalino di potenziale: 0,0 V – 0,4 V^[1].

Andamento che viene espresso dall'equazione di Cottrel:

$$I = \frac{AnFD^{1/2}c_{bulk}}{\sqrt{\pi \cdot t}} \quad (4.20)$$

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

4.3.2 Ciclovoltammetria

4.3.2.1 Definizione

La tecnica nota come ciclovoltammetria (CVM) consiste nella misurazione della

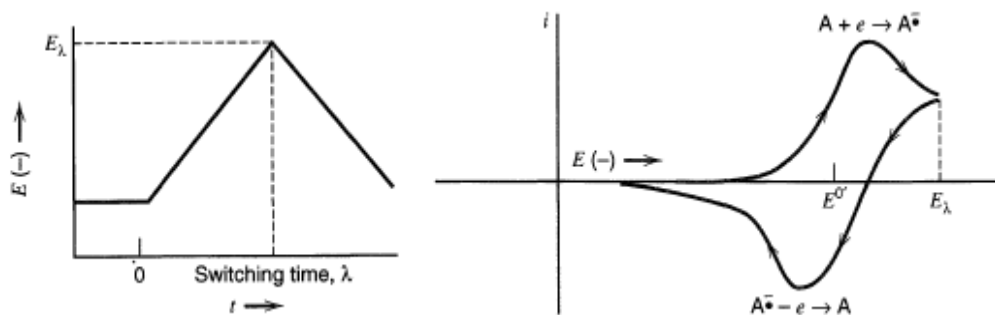


Figura 4.16: grafici del potenziale applicato e della corrente misurata in funzione della tensione simulata in una cella elettrochimica. I due picchi della curva nel grafico di sinistra descrivono i flussi di elettroni rispettivamente delle reazioni di riduzione per $i > 0$ e di ossidazione per $i < 0$ ^[16].

corrente che fluisce attraverso il sistema elettrochimico in esame in corrispondenza dell'applicazione di un'onda triangolare di potenziale. Il numero di periodi che compongono l'onda è detto numero di sweep, intendendo dunque con sweep la crescita e la decrescita lineari e consecutive del potenziale, che avrà quindi all'inizio e alla fine di queste lo stesso valore.

La pendenza dei tratti lineari in valore assoluto è detto scan rate e definisce la variazione del potenziale nel tempo all'interno del mezzo periodo. Esso è usualmente definito in milliVolt al secondo (mV/s).

La CVM è divenuta una tecnica molto popolare negli studi di caratterizzazione di nuovi sistemi elettrochimici, dimostrandosi molto utile nell'ottenere informazioni su reazioni anche molto complesse.

La forza della CVM sta nella capacità di offrire rapidamente considerevoli informazioni sulla dinamica di processi di ossidoriduzione, sulla cinetica delle reazioni di trasferimento elettronico e su processi di

adsorbimento alla superficie. In particolare offre una rapida locazione dei potenziali redox delle specie elettroattive e una conveniente valutazione degli effetti dei mediatori sul processo redox^[2].

A seconda delle informazioni che si vogliono ottenere è possibile eseguire anche più di un ciclo applicando un'onda triangolare di tensione al sistema elettrochimico al posto della doppia rampa vista poco sopra. Il grafico risultante dalla misura della corrente nel sistema, ad opera del potenziostato, in risposta alla tensione data in ingresso è detto ciclovoltammogramma (in figura 4.16 ne è riportato un tipico esempio nella parte di destra mentre nella figura 4.17 se ne ha una descrizione più

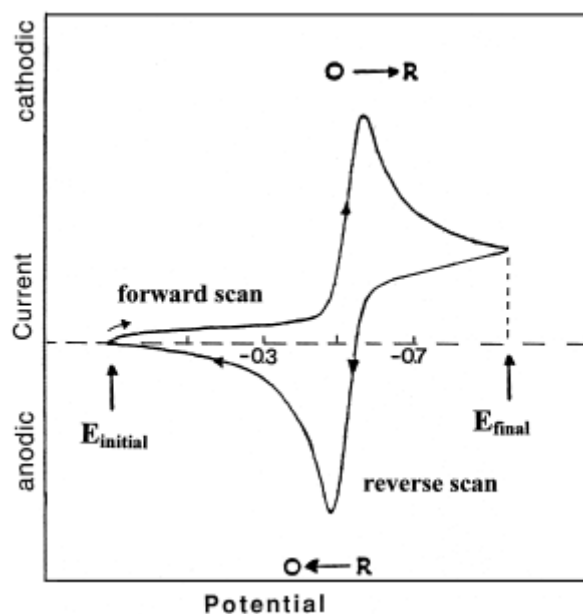


Figura 4.17: ciclovoltammogramma tipico (grafico *i-v*) con indicazioni dei passaggi di stato di ossidazione/riduzione e delle relative correnti misurate (anodica/catodica).

dettagliata). Esso rappresenta l'andamento della corrente misurata sul rispettivo valore di tensione dato in ingresso in quell'istante.

Finché il potenziale applicato aumenta e si avvicina al potenziale di riduzione elettrochimico, si genera in risposta una corrente catodica che aumenta fino a raggiungere un valore massimo quando il potenziale applicato è uguale al potenziale di riduzione. Fino a quando il potenziale applicato, superato il potenziale di

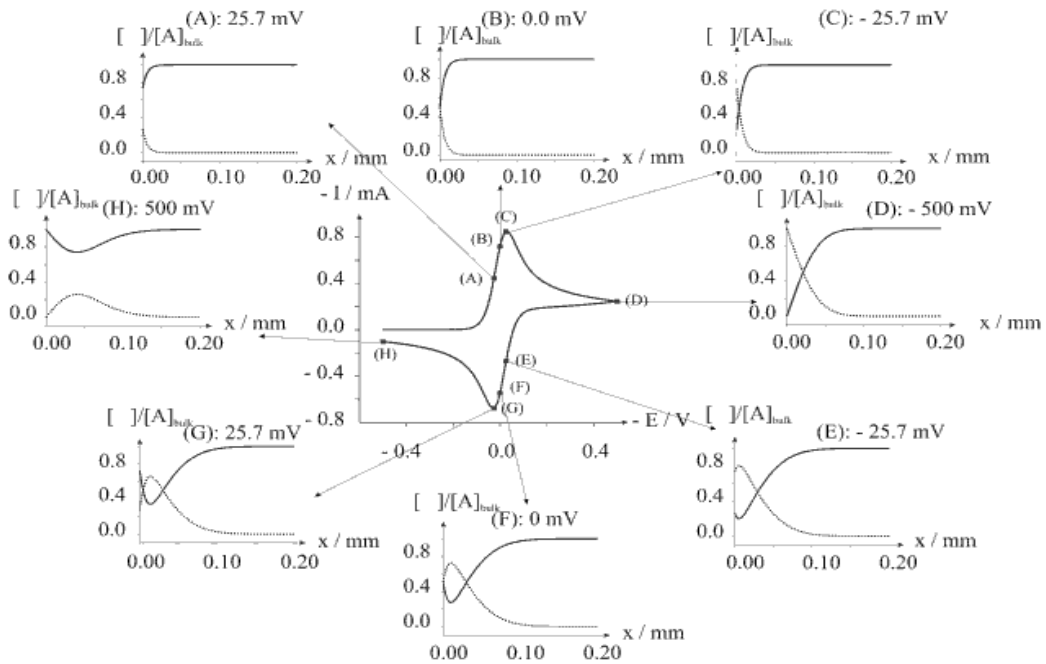


Figura 4.18: profili di concentrazione della soluzione redox rispetto a quella del bulk sulla distanza dalla superficie elettrodica, simulati in vari punti del ciclo voltammogramma. Reazione redox reversibile della specie A in B e viceversa. Parametri: $E^0 = 0 \text{ V}$, $[A]_0 = 1 \text{ mM}$, $D_A = D_B = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [5].

riduzione, raggiunge E_{final} (vedi figura 4.17), la corrente catodica in risposta decresce generando così un picco nel voltammogramma.

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

I picchi caratteristici nel ciclo voltammogramma sono causati dalla formazione dello strato diffusivo vicino alla superficie elettrodica. Si può meglio capire ciò esaminando i profili concentrazione - distanza durante la scansione mostrati in figura 4.18^{[2][3][4]}.

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

4.3.2.2 Sistemi reversibili

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

Un sistema si dice reversibile se le reazioni elettrochimiche che avvengono in esso sono reversibili, ovvero se la loro cinetica è veloce, i fenomeni di trasporto di massa sono estremamente lenti e sono governati dalla diffusione. In tal caso l'inversione del potenziale applicato in ingresso alla cella elettrochimica provoca l'inversione semplice delle reazioni redox che vi avvengono, senza la comparsa di altre reazioni. Inoltre, in caso di reversibilità si verificano le seguenti condizioni^[2]:

- La posizione dei picchi sull'asse del potenziale non dipende dalla velocità di scansione e la loro distanza in tensione dipende solo dal numero di elettroni coinvolti nella reazione redox all'elettrodo

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \text{ a } 25^\circ\text{C} \quad (4.21)$$

ove n è il numero di elettroni coinvolti, $E_{p,a}$ è la tensione del picco di corrente anodico ed $E_{p,c}$ di quello catodico;

Dato che il picco è abbastanza largo, spesso può essere difficile determinare esattamente il potenziale di picco quindi è più comodo considerare il potenziale di mezzo picco $E_{p/2}$ ovvero il potenziale corrispondente alla metà della corrente di picco.

Un ottimo modo per capire se un sistema è reversibile (Nernstiano) è verificare se:

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{56.5 \text{ mV}}{n} \text{ a } 25^\circ\text{C} \quad (4.22)$$

- Il potenziale formale^{xvii} della coppia redox si può ricavare dalla media matematica dei potenziali di riduzione e ossidazione:

$$E^o = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (4.23)$$

- Il rapporto tra le correnti di picco è unitario:

$$\frac{i_{p,c}}{i_{p,a}} = 1 \quad (4.24)$$

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

$$i_p = (2,69 \times 10^5) AC \sqrt{n^3 D v} \quad (4.25)$$

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

4.3.2.3 Sistemi irreversibili o quasi-reversibili

Sistemi irreversibili, nei quali cioè il trasferimento elettronico è più lento dei fenomeni diffusivi presentano ciclovoltammogrammi con proprietà radicalmente diverse da quelli dei sistemi reversibili. Una via di mezzo tra una tipologia di sistemi e l'altra è costituita dai sistemi quasi-reversibili che presentano dunque ciclovoltammogrammi con caratteristiche intermedie. Per sistemi totalmente irreversibili si ha che:

^{xvii} Potenziale formale: potenziale di una soluzione redox all'equilibrio in un sistema dove le forme ossidate e ridotte sono entrambe presenti a concentrazioni formali unitarie, anche se fossero distribuite in forme chimiche multiple.

- L'intensità delle correnti di picco è direttamente proporzionale alla concentrazione e aumenta con la radice quadrata della velocità di scansione come per i sistemi reversibili ma si ha un coefficiente diverso e si ha dipendenza dal coefficiente di trasferimento invece che dal numero di elettroni scambiati:

$$i_p = (2,99 \times 10^5) AC \sqrt{\alpha D v} \quad (4.26)$$

con α coefficiente di trasferimento della reazione all'elettrodo, A area dell'elettrodo [cm^2], D coefficiente di diffusione [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$], v velocità di scansione [V s^{-1}] e C concentrazione.

- Il potenziale di picco dipende dallo scan rate:

$$E_p = E^{0'} - \frac{RT}{\alpha F} \left[0.780 + \ln \left(\frac{D_o^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (4.27)$$

Ove $E^{0'}$ è il potenziale formale della coppia redox, k^0 è la costante di velocità standard per reazioni eterogenee [cm s^{-1}], α coefficiente di trasferimento della reazione all'elettrodo, v velocità di scansione [V s^{-1}], D_o coefficiente di diffusione della specie ossidata. La differenza tra il potenziale di picco e quello di mezzo picco è in questo caso:

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{47.7 \text{ mV}}{\alpha} \text{ a } 25^\circ\text{C} \quad (4.28)$$

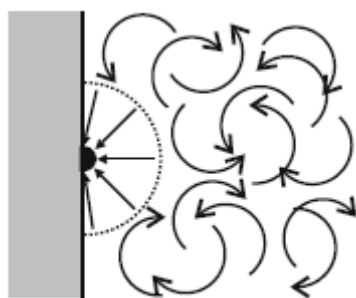
Per quanto riguarda i sistemi quasi-reversibili la forma dei picchi ed i relativi parametri sono funzioni di α e di un parametro Λ che con $D = D_R = D_o$ è definito nel modo seguente:

$$\Lambda = \frac{k^0}{\sqrt{D f v}} \quad (4.29)$$

Per valori di $\Lambda > 10$ il comportamento del sistema è approssimabile a quello di un sistema reversibile.

4.3.2.4 Microelettrodi

Quanto trattato finora sulla ciclovoltammetria riguardava elettrodi planari di area nell'ordine dei millimetri quadri. Per elettrodi di dimensioni inferiori, a cui ci si riferisce comunemente con il termine di microelettrodi (area nell'ordine dei micrometri quadri), si hanno relazioni completamente diverse. A cambiare è proprio la teoria di base dato che si passa dalla diffusione planare degli elettrodi di dimensioni maggiori a quella approssimativamente emisferica e dunque più efficiente, dei microelettrodi.



Diffusion at microelectrode

Figura 4.19: diffusione sferica attorno ad un microelettrodo^[3].

Questo è stato indagato comparando l'area di un dato macroelettrodo con una collezione di microelettrodi che abbia la stessa area complessiva del macroelettrodo, frammentata in molte piccole isole. Nel complesso con i microelettrodi si possono avere densità di corrente all'interfaccia più alte rispetto ai macroelettrodi e il tempo di risposta rispetto alle variazioni di potenziale o di concentrazione è molto più breve. Tutte queste qualità positive li rendono sensori ideali, il problema è che mostrano alte densità di corrente ma comunque basse correnti totali.

Un modo per ovviare a questo problema è lavorare con array di microelettrodi, in cui sono raggruppate molte singole aree elettrodiche per formare una corrente elettrolitica totale soddisfacente. Si ottiene un comportamento microelettrodico, da tale array, solo se c'è sufficiente spazio tra i singoli elettrodi. Infatti se la spaziatura fra i microelettrodi è troppo piccola, le zone di diffusione adiacenti possono sovrapporsi e interagire tra di loro, il che comporta una tendenza alla diffusione planare. Quindi la separazione centro a centro degli elettrodi deve essere sufficiente

per evitare queste sovrapposizioni, ma non eccessiva per non sprecare spazio inutilmente. La massima densità di corrente viene raggiunta quando ogni elettrodo si comporta come un singolo microelettrodo; in tal caso la diffusione radiale domina il trasporto di massa del reagente, portando coefficienti di trasporto di massa più elevati rispetto alla diffusione planare.

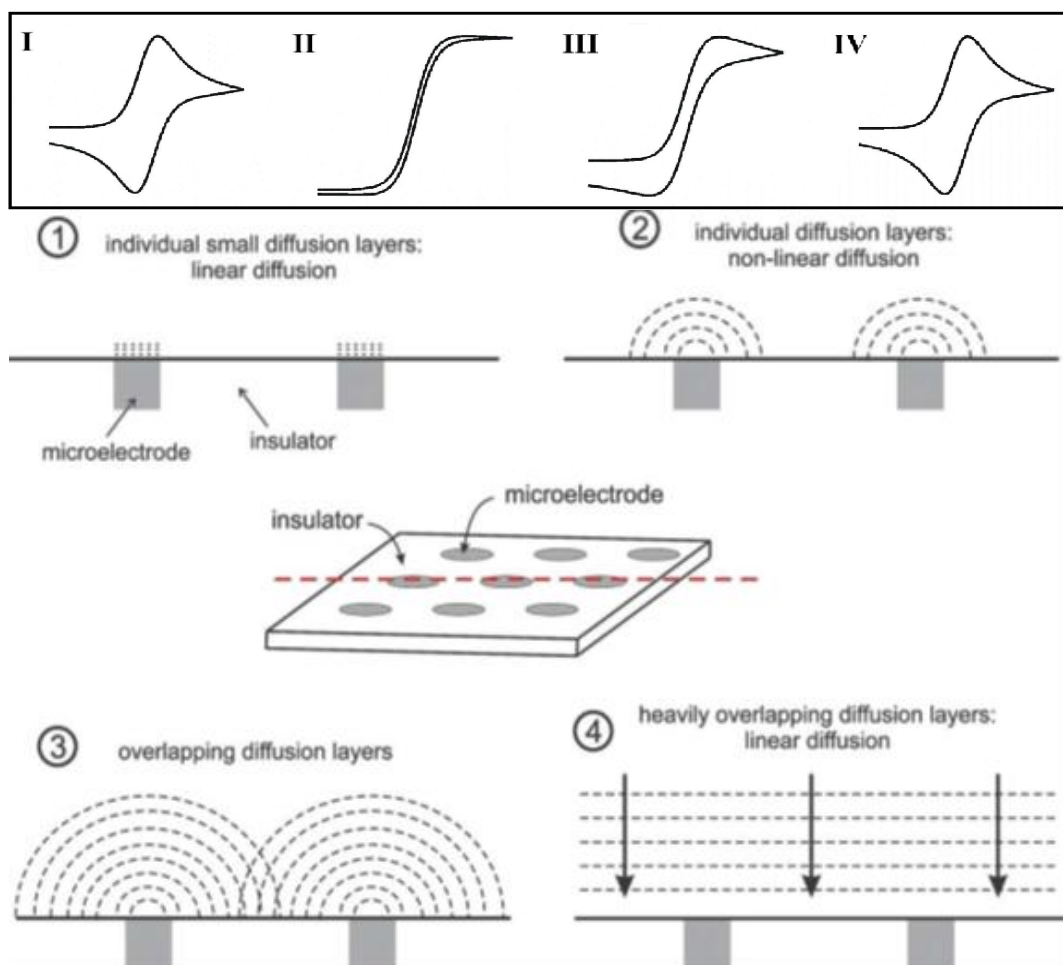


Figura 4.20: diagramma schematico delle quattro risposte ciclovoltammometriche per le diverse categorie di profili diffusivi rappresentati e definiti dal rapporto tra il raggio dei singoli elettrodi e la distanza tra i loro centri^{[6][9]}.

Si consideri di operare una ciclovoltammometria, su un array regolare di microelettrodi, di una coppia redox che scambi solo un elettrone, quindi $A \rightarrow B + e^-$. Ovviamente in condizioni stazionarie in soluzione è presente solo la specie A. Aumentando il potenziale, si dà avvio al processo di ossidazione di A in B e attorno ad ogni microdisco si forma uno strato diffusivo. Si è notato^[6] come l'ampiezza e la forma del voltammogramma, relativo all'esperienza in corso, sia strettamente collegata al rapporto fra la superficie del microelettrodo e la grandezza dello strato diffusivo

formatosi, e al rapporto fra la grandezza dello strato diffusivo e la lunghezza dello strato isolante che separa due microelettrodi adiacenti. Sulla base di questi due fattori è quindi possibile distinguere quattro categorie del profilo diffusivo su un array di microelettrodi e di conseguenza assegnare la risposta voltammetrica ad una categoria o ad una combinazione di categorie.

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

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

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

Da un punto di vista analitico la teoria sugli elettrodi sferici o emisferici e sui microelettrodi è la stessa, essendo caratterizzati dallo stesso tipo di diffusione. La corrente è determinata aggiungendo a quella di un elettrodo planare un termine dipendente inversamente dal raggio dell'elettrodo:

$$i = i_{planare} + \frac{nFAD_0C_0\phi(\sigma t)}{r_0} \quad (4.30)$$

Per i microelettrodi ad alti valori di scan rates il termine della corrente $i_{planare}$ è dominante rispetto alla correzione data dal secondo termine ma ciò non è altrettanto vero per bassi valori di scan rate per i quali si ha il fenomeno opposto. E' possibile dimostrare che questo comportamento si ha quando:

$$v \ll \frac{RTD}{nFr_0^2} \quad (4.31)$$

Quando questa condizione viene rispettata il ciclovoltammogramma rappresenterà una risposta stazionaria e quindi indipendente dallo scan rate.

Tale limite dipende dal quadrato del raggio dell'elettrodo dunque è impossibile ottenere ciclovoltammogrammi stazionari con elettrodi di dimensioni maggiori dei microelettrodi. D'altro canto, nel caso si vogliano ottenere ciclovoltammogrammi non stazionari utilizzando microelettrodi, sarà necessario utilizzare valori di scan rate molto elevati.

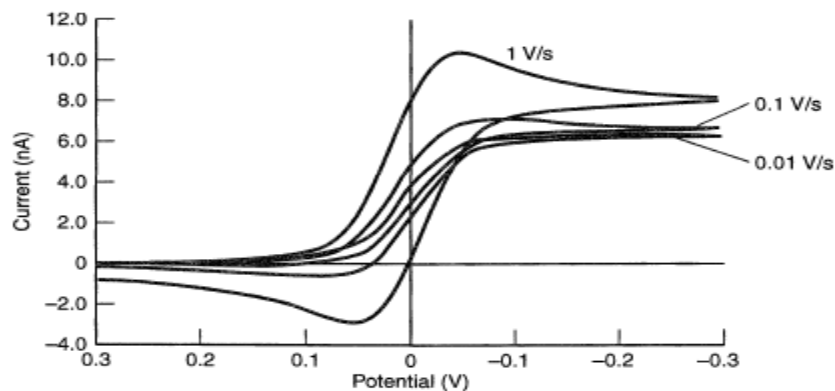


Figura 4.21: ciclovoltammogrammi per diversi valori dello scan rate per un microelettrodo di raggio 10 μ m. Il potenziale formale della coppia redox è considerato 0 mentre la concentrazione della specie ossidata è 1mM. Il coefficiente di diffusione delle specie ridotta ed ossidata è pari a 10⁻⁵ cm²/s e la temperatura è di 25°C. Si osservi come ad 1V/s la risposta cominci a mostrare i tipici picchi della diffusione lineare ma il valore della corrente ai potenziali limite ed il piccolo rapporto delle correnti di picco indicano che la

Si osservi come in stato stazionario le ciclovoltammetrie siano delle sigmoidi, da esse è possibile ottenere molti dati sul sistema misurato:

- Il plateau di corrente di una curva reversibile è controllato dal trasferimento di massa, il suo valore di corrente rende possibile determinare il numero di elettroni n implicato nella reazione redox, l'area dell'elettrodo, il coefficiente

di diffusione e la concentrazione di elettrolita al bulk. Quest'ultimo valore è quello per cui l'altezza della curva viene più utilizzata, solitamente attraverso calibrazione.

- La forma delle curve fornisce informazioni legate alla termodinamica del processo determinando grandezze come potenziali standard, energie libere di reazione e varie costanti di equilibrio. I sistemi reversibili non consentono però di ottenere informazioni di tipo cinetico dato che in effetti in essi la cinetica è trasparente.

La forma dell'onda viene facilmente analizzata considerando la sua pendenza che per un sistema reversibile ci si aspetta essere:

$$m = 2.303 \frac{RT}{nF} = \frac{59.1}{n} \text{ a } 25^{\circ}C \quad (4.32)$$

Sistemi con pendenze più elevate non sono generalmente caratteristiche di sistemi nernstiani e reversibili.

- La posizione in tensione della curva permette di determinare il potenziale formale E_0 della cella elettrochimica e di determinare quindi la reversibilità del un processo in base alla vicinanza tra esso e $E_{1/2}$, potenziale a metà tra E_p ed $E_{p/2}$.

Bibliografia:

13. A. Mignani, Sviluppo di Biosensori: Modifiche di Superfici Elettrodiche e Sistemi di Immobilizzazione Enzimatica, Università degli Studi di Bologna Alma Mater Studiorum, A.A. 2007-2008
14. J. Wang, Analytical Electrochemistry, Ed. Wiley, 2000, second edition
15. Peter Gründler, Chemical Sensors An Introduction for Scientists and Engineers, Ed. Springer, 2007
16. P. Protti, AMEL Electrochemistry Introduzione alle modern tecniche di Analisi Voltammometriche e Polarografiche, quarta edizione, 2001
17. R. G. Compton, C. E. Banks, Understanding Voltammetry, 2007
18. T. J. Davies, R. G. Compton, The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes: Theory, Journal of Electroanalytical Chemistry, 585, 63 – 82, 2005
19. C. Amatore, J. M. Savèant, D. Tessier, Charge transfer at partially blocked surfaces A model for the case of microscopic active and inactive sites, Journal of Electroanalytical Chemistry, 147, 39 – 51, 1983
20. J. Guo, E. Lindner, Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisc Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment, Analytical Chemistry, 81, 130 – 138, 2009
21. H. J. Lee, C. Beriet, R. Ferrigno, H. H. Girault, Cyclic voltammetry at a regular microdisc electrode array, Journal of Electroanalytical Chemistry, 502, 138 – 145, 2001
22. C. Beriet, R. Ferrigno, H. H. Girault, Simulation of the chronoamperometric of a regular array of microdisc electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry, 486, 56 – 64, 2000
23. D. Vladikova, The Technique of the Differential Impedance Analysis Part I: Basics of the Impedance Spectroscopy, Proceedings of the International Workshop “Advanced Techniques for Energy Sources Investigation and Testing”, 2004
24. M. Minella, Caratterizzazione elettrochimica dell'interfaccia semiconduttore – elettrolita in elettrodi a film sottile di TiO₂ nanocristallino, Università degli Studi di Torino, A.A. 2005-2006

25. E. Katz, I. Willner, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis*, 15, N. 11, 2003
26. D. A. Borkholder, Cell Based Biosensors using Microelectrodes, Stanford University, 1998
27. S. H. Liu, Fractal Model, for the ac Response of a Rough Interface, *Physical Review Letters*, volume 55, n. 5, 1985.
28. Bard A.J., Faulkner L.R.; "Electrochemical methods, fundamentals and applications-second edition"; 2001.

CAPITOLO 5: MISURE E ANALISI

5.1 Il biosensore elettrochimico ad enzimi

Il biosensore che si è realizzato è stato progettato per la rilevazione e la quantificazione della concentrazione di lattato (cfr. Paragrafo 3.2) in campioni liquidi con volumi dell'ordine della decina di microlitri. Tale biosensore rientra nella categoria dei biosensori elettrochimici ad enzimi di seconda generazione (cfr. Paragrafo 2.2.1.2), utilizzando un mediatore di ossidoriduzione per il trasporto degli elettroni dal cuore ossido-riduttivo dell'enzima (il sito attivo cui vanno a legarsi le molecole di lattato) all'elettrodo che ne rileverà il flusso, e dunque la corrispondente corrente elettrica generata. L'enzima utilizzato come componente biologica del biosensore è la lattato ossidasi (LOx), purificata da *Pediococcus* (cfr. Paragrafo 3.1.4). Essa verrà immobilizzata sulla superficie elettrodica d'oro attraverso adsorbimento diretto.

Come tecnica di immobilizzazione alternativa è stata presa in considerazione quella del cross-linking (cfr. Paragrafo 4.2.1) della LOx con un composto chimico in grado di adsorbirsi più stabilmente sulla superficie elettrodica. Il composto utilizzato a questo scopo è una soluzione di dimetil n-succimidil propionato (DTSP) in un solvente adatto, il dimetil-solfoossido (DMSO).

Con tale tecnica (cfr. Paragrafo 2.1.4) è possibile evitare la relativamente rapida denaturazione dell'enzima, posto in contatto con la superficie metallica, che si ha normalmente nell'adsorbimento diretto. Infatti, con la tecnica del cross-linking l'enzima è distanziato dalla superficie dalla molecola del DTSP che con un gruppo si lega all'oro e con quello ai suoi antipodi all'enzima. Inoltre, grazie ai tioli presenti nella sua struttura chimica il DTSP è in grado di legarsi più stabilmente dell'enzima a superfici d'oro, come quella utilizzata con la funzione di elettrodo, nel biosensore realizzato. Infine una caratteristica importante di questa tecnica di funzionalizzazione della superficie è il controllo dell'orientazione spaziale assunta dall'enzima giacché esso si lega con un suo gruppo particolare (sempre lo stesso) al DTSP.

Questa tecnica di funzionalizzazione, è stata caratterizzata sia a livello di adsorbimento del DTSP che nel corrispondente livello di copertura a diverse concentrazioni.

Il mediatore utilizzato per il biosensore è il ferrocianuro di potassio ($K_4[Fe(CN)_6]$), (cfr. Formula 2.9) che partecipa al meccanismo di rilevazione prendendo parte alla catena di reazioni di ossidoriduzione visibili in figura 5.1. Tale processo elettrochimico è avviato dalla presenza della molecola di lattato (l'analita di interesse) per cui è specifico l'enzima utilizzato.

L'enzima presente sulla superficie elettrodica del biosensore catalizza la reazione di

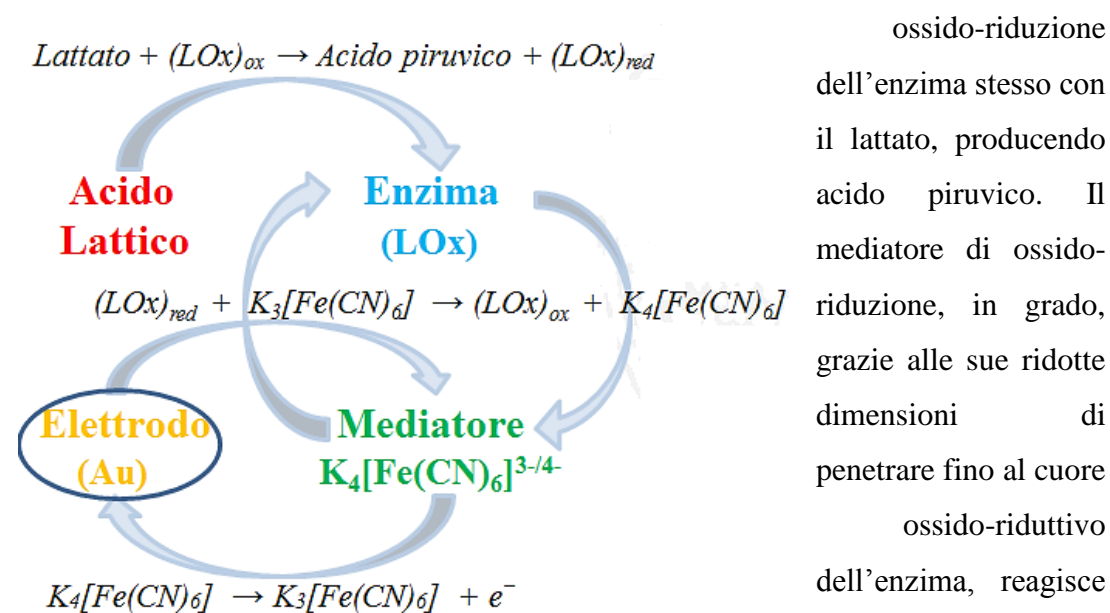


Figura 5.22: Ciclo di reazioni chimiche di ossido-riduzione che consentono la rilevazione della presenza dell'acido lattico e la quantificazione della sua concentrazione nel biosensore.

sua volta e ripristinando lo stato iniziale dell'enzima, rendendolo dunque disponibile per catalizzare una nuova reazione.

A questo punto il mediatore ossidato diffonde fino alla superficie elettrodica e lì si riducendo, trasferendo un elettrone al conduttore elettronico.

L'imposizione di un potenziale tra l'elettrodo e la soluzione provoca un flusso di elettroni e quindi una corrente che viene misurata. Tale corrente, essendo determinata dal numero di elettroni trasferiti dal mediatore all'elettrodo, a sua volta definita dalla reazione dell'enzima con il lattato, fornisce un'indicazione sulla quantità di analita presente nel campione analizzato dal biosensore.

5.1.1 Dispositivi

Negli studi che si sono svolti per la realizzazione del biosensore e per le caratterizzazioni dei suoi principali aspetti, si sono utilizzati due tipi diversi di dispositivi.

I primi studi sono stati infatti svolti su array di microelettrodi (MEA) mentre quelli successivi sono stati eseguiti su dispositivi con elettrodi di raggio nell'ordine del millimetro (di seguito chiamati macroelettrodi, in contrapposizione ai precedenti).

I risultati ottenuti dalle prime sperimentazioni, sui microelettrodi, sono stati trasposti sui macroelettrodi definendo la soluzione di mediatore e buffer per il mantenimento del pH (PBS^{xviii}), da utilizzare come ambiente di misura per la rilevazione del lattato in essa aggiunto. Nel seguito tale soluzione verrà denominata "buffer di misura".

5.1.1.1 Microelettrodi



Figura 5.2: Fotografia del modello MEA60Au della Ayanda Biosystems.

I dispositivi microelettrodi MEA (Multi Electrode Array) utilizzati sono prodotti da una nota azienda del settore, la Ayanda Biosystems. Si è utilizzato il modello MEA60Au che incorpora una matrice quadrata di 60 elettrodi circolari in oro, ognuno con raggio di 15 μ m e con una spaziatura tra il suo

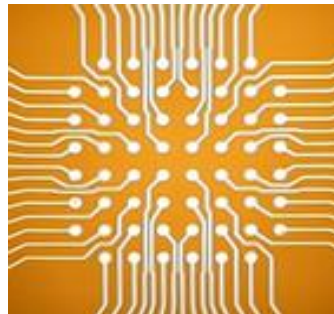


Figura 5.3: Fotografia al microscopio ottico (50x) della matrice di microelettrodi presenti all'interno del pozzetto del chip MEA60Au della Ayanda Biosystems.

centro e quello dell'elettrodo adiacente di 100 μ m.

Il dispositivo è costituito dalla matrice di elettrodi, depositi su una superficie polimerica trasparente ed inseriti in un pozzetto, anch'esso di natura polimerica, di capienza pari a circa 1500 μ L. Esternamente al pozzetto, a quadrato attorno ad esso, sono presenti dei contatti quadrati in oro di lato 2.5 mm, che rendono possibile la connessione agli elettrodi nel pozzetto.

^{xviii} PBS: Phosphate Buffer Saline

5.1.1.2 Macro elettrodi

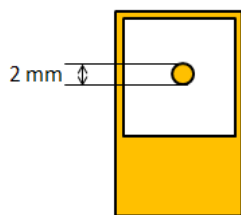


Figura 5.4: Schema di uno dei macro elettrodi

I macro elettrodi utilizzati nella caratterizzazione della deposizione dell'enzima sulla superficie elettrodica e nella rilevazione del lattato hanno un'area attiva circolare di diametro pari a 2 mm. Tali elettrodi sono costituiti da una superficie d'oro dello spessore di 50 nm su di un supporto polimerico. Inoltre, viste le notevoli dimensioni della loro area attiva, è stato studiato un protocollo di pulizia della superficie (cfr. Paragrafo 5.2).

5.2 Protocolli sperimentali

Nelle varie fasi di caratterizzazione dei diversi aspetti del biosensore, l'utilizzo di dispositivi diversi ha ovviamente reso necessario l'utilizzo di protocolli di pulizia e misura adatti ai differenti dispositivi.

In particolare, per i dispositivi MEA si sono dovuti definire dei metodi di pulizia che garantissero il loro riutilizzo, visto il costo elevato e la quantità di elettrodi presenti. Infatti, a differenza dei macro elettrodi, per questi dispositivi un elettrodo rovinato non implica l'impossibilità di utilizzare l'intero dispositivo.

5.2.1 Pulizia dei dispositivi

Per quanto riguarda i micro elettrodi si sono sperimentati due diversi protocolli di pulizia:

1. Pulizia meccanica con l'applicazione successiva e mantenimento nel pozzetto pieno (1500 μ L) per due minuti di perossido di idrogeno e di alcol etilico concentrato al 90% del volume;
2. Pulizia per sonicazione con l'utilizzo delle stesse soluzioni e tempistiche.

In particolare nel secondo protocollo si è posizionato il dispositivo micro elettrodico all'interno dell'apparato sonicatore riempiendone solo il pozzetto con le soluzioni citate. Si è poi provveduto a rendere solidale il dispositivo con la superficie interna del bagnetto ultrasonico in modo che le vibrazioni da esso prodotte potessero propagarsi al dispositivo fino alle superfici degli elettrodi nel pozzetto, immerse nelle soluzioni.

I macroelettrodi vengono puliti unicamente con alcol etilico 90% sulla maschera idrofobica che definisce l'area attiva, prima che questa sia fissata sulla superficie d'oro, e con un risciacquo in acqua demineralizzata. Le piccole gocce d'acqua che rimangono adese alla superficie vengono rimosse utilizzando aria compressa appena finito il risciacquo.

5.2.2 Eliminazione dell'aria residua

Gli elettrodi presenti nei dispositivi microelettronici utilizzati non si presentano adagiati sopra la superficie polimerica che fa loro da supporto, ma si trovano sul fondo di una fossa creata dalla resina epossidica che funge da isolante elettrico. Ciò dà luogo ad un fenomeno caratteristico di tali dispositivi, in particolar modo quando messi in contatto con soluzioni ad elevata viscosità. Il fenomeno di cui si sta parlando è quello di formazione delle bolle d'aria sulle superfici elettrodiche.

La struttura in sezione dei microelettrodi è infatti tale che, in corrispondenza dell'inserimento di una soluzione viscosa su di essi, rimanga intrappolata una piccola quantità di aria tra l'elettrodo vero e proprio e la soluzione che lo circonda. La bolla formata, se non eliminata, isola completamente l'elettrodo dall'ambiente in cui è inserito, cioè dalla soluzione posta nel pozzetto del dispositivo.

Il fenomeno delle bolle è una delle principali tematiche trattate nella chimica delle interfasi^[5], che in molti casi partono dall'avere dimensioni molecolari fino a divenire nettamente visibili. In questi casi, soprattutto quando i dispositivi vengono lasciati all'aria, le bolle incrementano nel tempo le loro dimensioni a causa dell'incorporazione in esse degli elementi atmosferici, precedentemente adsorbiti sulle superfici elettrodiche, che progressivamente vengono desorbiti quando queste entrano in un ambiente liquido.

Affinché le misure effettuate su questi dispositivi siano attendibili, si rende necessaria la sistematica eliminazione di tutte le bolle presenti sulle superfici degli elettrodi del dispositivo. Tale problema non si riscontra, o in ogni caso è trascurabile, nel caso dei macroelettrodi poiché le micro-bolle coprono una piccolissima parte della superficie elettrodica e non ne modifica in modo percepibile il comportamento. E' comunque buona norma evitare in ogni caso la formazione di bolle prestando attenzione nella fase di pulizia e di messa in contatto dei dispositivi con la soluzione.

Tornando al caso dei macroelettrodi, si sono sperimentate tre diverse metodologie per l'eliminazione delle micro-bolle:

1. *Flusso di soluzione*: questa tecnica prevede l'aspirazione e la re-iniezione della soluzione nel pozzetto in modo continuo e ravvicinato. In tal modo si punta a creare all'interno del pozzetto delle correnti in grado di separare le bolle dalle superfici elettrodiche e quindi di farle emergere eliminandole. Parametri di questa tecnica sono il volume di soluzione utilizzato per la creazione del flusso e la velocità con cui questo viene aspirato ed immesso nel pozzetto.
2. *Iniezione di aria*: questo metodo consiste nell'iniettare un certo volume di aria, con una particolare velocità, direttamente sopra gli elettrodi con le micro-bolle. In tal modo queste tendono a fondersi con le bolle iniettate che essendo di dimensioni maggiori hanno una più forte tendenza ad emergere in superficie e ad esplodere, dunque vengono trascinate via dalla superficie elettrodica.
3. *Eliminazione singola*: questa tecnica è quella più lunga e sconveniente, consistendo nell'osservazione al microscopio degli elettrodi affetti da bolle e nell'eliminazione diretta di queste per aspirazione con una micro-pipetta.

Negli studi eseguiti sono stati utilizzati prevalentemente i primi due metodi. Prima si è provveduto ad iniettare volumi da 600 μL di aria direttamente sugli elettrodi con il pozzetto pieno di soluzione e ripetendo la procedura per 4 volte. Poi si è creato un flusso nella soluzione attraverso l'aspirazione e l'immissione rapida dello stesso volume di 600 μL , in modo da eliminare dagli elettrodi le piccole parti di bolle su di essi rimaste. Tale protocollo è stato ripetuto per ogni elettrodo un numero di volte variabile, dipendentemente dalla viscosità della soluzione. Con l'utilizzo delle soluzioni più viscosi, in particolare nella fase di caratterizzazione del dispositivo non funzionalizzato, si è talvolta reso necessario ricorrere alla tecnica dell'aspirazione singola delle bolle sugli elettrodi.

5.2.3 Misure

Per quanto riguarda i setup sperimentali, per le misure di Spettroscopia elettrochimica di impedenza (EIS) (cfr. Paragrafo 4.2) sono stati utilizzati come riferimento un elettrodo Ag/AgCl (cfr. Paragrafo 1.2.3.2), munito di setto poroso, immerso nella soluzione per la misura. Per contattare l'elettrodo sotto indagine è stato invece utilizzato un micromanipolatore. L'impedenza degli elettrodi è sempre stata indagata all'interno dell'intervallo di frequenze tra 1 Hz e 10^6 Hz.

Nelle misure di ciclovoltammetria si è disposta una configurazione a tre elettrodi, utilizzando, anche in questo caso come riferimento l'elettrodo Ag/AgCl e come contatto con l'elettrodo sotto indagine un micromanipolatore. Infine come elettrodo

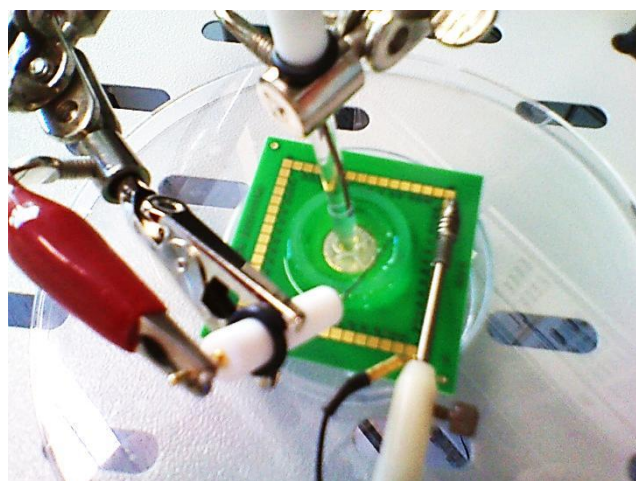


Figura 5.5: Setup sperimentale a tre elettrodi per la ciclovoltammetria. Partendo dall'alto in senso antiorario è possibile intravedere il riferimento (elettrodo Ag/AgCl), il counter (elettrodo in platino) e la punta del micromanipolatore che contatta, attraverso il suo collegamento, il microelettrodo in oro nel pozzetto.

counter (fornitore di elettroni per la misura) è stato utilizzato un filo di platino con contatto esterno in oro.

Il generico protocollo di misura adottato è consistito per prima cosa nella pulizia del dispositivo in esame (cfr. Paragrafo 5.2.1), in seguito si è posto in contatto il dispositivo con la soluzione per la misura; una volta eliminate le bolle, se presenti si è passato al setup sperimentale e quindi all'immersione degli elettrodi

nella soluzione, prestando attenzione affinché questi non andassero ad intaccare in nessun modo la superficie elettrodica.

Il set up sperimentale presentato, esplicito per il caso dei microelettrodi, è stato utilizzato anche per le misure con i macroelettrodi. Per questi dispositivi la procedura di misura ha previsto la collocazione, sulla superficie elettrodica circolare, di una goccia della soluzione di misura di volume 50 μ L.

L'idrofobia della maschera utilizzata per definire l'area attiva del macroelettrodo consente alla goccia posta su di esso di mantenere una forma emisferica. Questa forma consente il contatto con il setto poroso dell'elettrodo di riferimento Ag/AgCl.

La tensione superficiale che si viene a creare, sfociando in un allungamento verso l'alto della goccia tra i due elettrodi consente l'inserimento tra di essi del filo in platino che fa da elettrodo counter. In questo modo i tre elettrodi sono tutti a contatto con la soluzione di misura.

5.3 Caratterizzazione del dispositivo non funzionalizzato

Nella trattazione di questi primi aspetti del biosensore sono stati utilizzati unicamente i dispositivi microelettrodici descritti nel paragrafo 5.1.1.1.

La prima fase nella realizzazione e caratterizzazione dei dispositivi non funzionalizzati è stata quella dello studio dei parametri ottimali di misura, in particolare per la tecnica della ciclovoltammetria.

Nel frattempo si è provveduto a caratterizzare la risposta dei dispositivi in spettroscopia (EIS) per valutarne la qualità. Ciò è stato fatto confrontando i diagrammi di Bode delle risposte medie dei singoli elettrodi con il diagramma di Bode della risposta media di un insieme selezionato di elettrodi tra tutti quelli dei vari dispositivi analizzati.

Sono stati dichiarati di scarsa qualità gli elettrodi le cui risposte medie si situavano fuori dall'intervallo definito dal valore medio dell'insieme selezionato, più o meno la relativa deviazione standard, per un numero di punti superiore ad una soglia stabilita. Quest'analisi della qualità dei dispositivi e degli elettrodi presenti su di essi, insieme a un'ispezione visiva al microscopio ottico ha consentito di selezionare due dispositivi microelettrodici di qualità molto buona, cioè con più del 90% degli elettrodi in buone condizioni. Questi due dispositivi, denominati C1 e C2, sono stati utilizzati nelle fasi successive della caratterizzazione in assenza di funzionalizzazione.

5.3.1 Studio dei parametri di misura

Lo studio dei parametri di misura nella tecnica della ciclovoltammetria è stato orientato all'ottenimento di un ciclovoltammogramma caratterizzato il più possibile da ripetibilità intra- ed inter-elettrodo, e intra- ed inter-dispositivo: con ciò si intende il maggior grado possibile di sovrapponibilità delle misure ripetute su uno stesso elettrodo (intra-elettrodo), effettuate su elettrodi diversi di uno stesso dispositivo

(inter-elettrodo intra-dispositivo) e relative ad elettrodi di dispositivi diversi (inter-dispositivo).

Per raggiungere l'obiettivo in questione si è reso necessario uno studio approfondito della teoria elettrochimica sui microelettrodi e della dipendenza della corrente che li attraversa dai parametri di misura ciclovoltammetrici, quali l'intervallo di tensione applicato e lo scan rate (cfr. Paragrafo 4.3.3.4). La comprensione di tale teoria sui microelettrodi non può prescindere dallo studio della stessa sui macroelettrodi. Per verificare quanto reperito sulla teoria elettrochimica della ciclovoltammetria su macroelettrodi si è condotta una sessione sperimentale su dispositivi strutturalmente simili a quelli descritti nel paragrafo 5.1.1.2.

Dispositivi delle dimensioni dei macroelettrodi presentano un ciclovoltammogramma tipico a due picchi, uno superiore di riduzione ed uno inferiore di ossidazione. Secondo quanto studiato dalla teoria^[10], la corrente corrispondente a questi picchi, su elettrodi con area attiva paragonabile a quella dei macroelettrodi, dovrebbe essere proporzionale alla radice quadrata dello scan rate utilizzato nella misura.

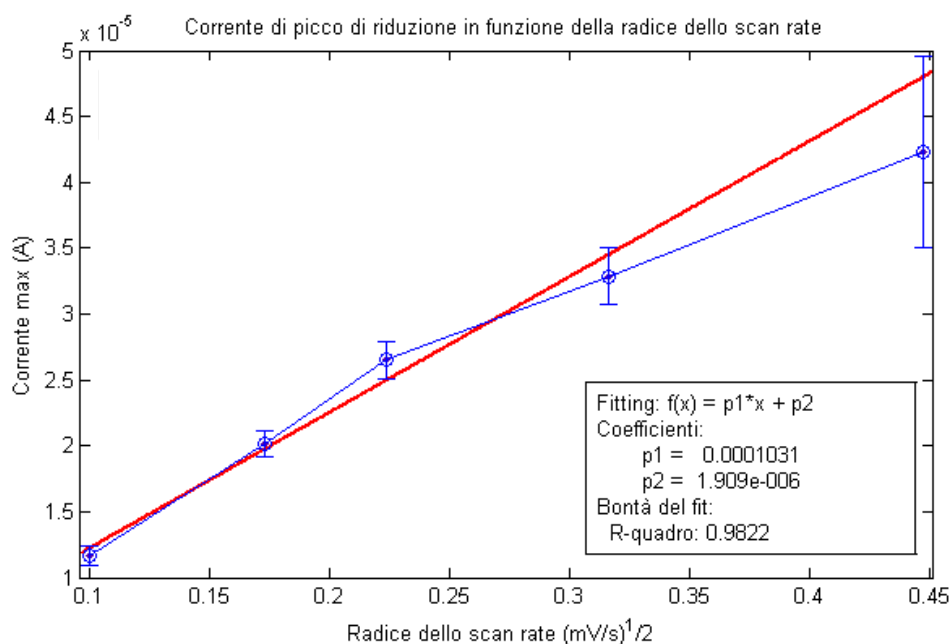


Figura 5.6: Correnti di picco di riduzione medie con relative deviazioni standard al variare dello scan rate utilizzato nelle misure. Il fitting lineare della curva ha una bontà definita da R-quadro pari al 98.22%. Le ciclovoltammetrie sono state condotte in soluzione elettrolitica a 220 mV.

Tale asserzione è stata verificata sperimentalmente, ottenendo il grafico in figura 5.6. Per dispositivi con elettrodi di queste dimensioni il ciclovoltammogramma tipico presenta una forma sigmoidale, indicante che lo scan rate utilizzato nella misura

consente al sistema di permanere in stato stazionario. In tali condizioni si ottiene l'indipendenza del ciclovoltammogramma da sufficientemente piccole variazioni di scan rate (cfr. Figura 4.21).

Utilizzando la formula 4.31 si è determinato il valore limite dello scan rate per mantenere il sistema in stato stazionario durante la misura^[1]. Questo valore è risultato di circa 80 mV/s.

Pur essendo preferibile, secondo quanto riportato dalla teoria, mantenersi almeno un ordine di grandezza al di sotto del valore limite calcolato, si è utilizzato nelle misure uno scan rate pari a 100 mV/s, allo scopo di trovare un punto di incontro tra l'esigenza di mantenersi nello stato stazionario e quella di effettuare le misure in tempi sufficientemente rapidi.

Quest'ultima necessità non nasce solo da una questione di comodità nella sperimentazione ma soprattutto dalle esigenze di rapidità di risposta del biosensore una volta che sarà stato realizzato.

Una delle applicazioni di questa tipologia di biosensori è il monitoraggio continuo del lattato ematico (cfr. Paragrafo 3.2.3.1), questo sarebbe impossibile con un biosensore che impieghi dei minuti a dare una risposta.

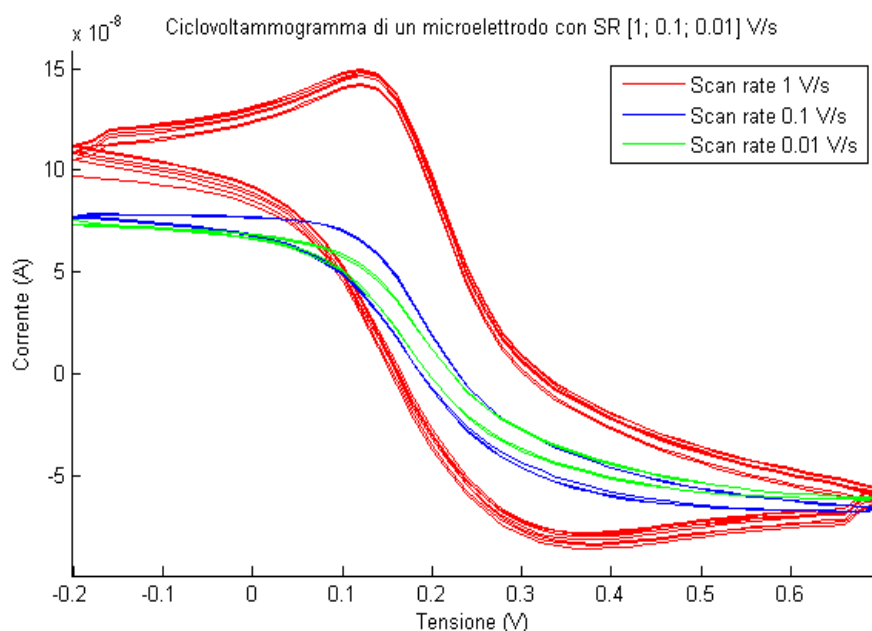


Figura 5.7: Ciclovoltammogrammi ottenuti utilizzando tre diversi valori di scan rate (1; 0.1; 0.01) V/s su di un unico microelettrodo (cfr. Paragrafo 5.1.1.1). Le misure sono state eseguite in una soluzione di $K_4[Fe(CN)_6]$ 20 mM in KCl 100mM. Si noti che i risultati ottenuti sono confrontabili con quelli descritti dalla teoria^[10] (cfr. Paragrafo 4.3.3.4).

Sono state condotte quindi delle misure ciclovoltammetriche sui dispositivi microelettrodi non funzionalizzati, utilizzando come soluzione una soluzione del mediatore in KCl. In tale soluzione il ferrocianuro di potassio ($K_4[Fe(CN)_6]$) è stato disciolto con una concentrazione pari a 100 mM/L in KCl anch'esso con concentrazione 100mM/L.

L'intervallo di tensione del potenziale ottimale da fornire in ingresso al sistema per le misure ciclovoltammetriche è stato determinato essere quello tra -0.2 V e 0.7 V.

Per stabilirlo si è proceduto empiricamente, determinando in corrispondenza di quali livelli di tensione la corrente misurata nel sistema si stabilizzasse a valori costanti.

La forma dei ciclovoltammogrammi ottenuti con questi parametri sperimentali nonché i valori delle loro correnti di plateau hanno consentito di verificare la permanenza del sistema in uno stato quasi-stazionario anche per scan rate pari a 100 mV/s, consentendo in questo modo una efficiente definizione dei parametri sperimentali.

Parametro CVM	Valore
Tensione (V)	[-0.2 ; 0.7]
Scan rate (mV/s)	50
Sweep	8

Tabella 1: Parametri sperimentali principali per le ciclovoltammetrie su microelettrodi e loro valori.

5.3.2 Studio della concentrazione di mediatore

5.3.2.1 Scopo dello studio

Una volta definiti i protocolli di preparazione dei dispositivi microelettrodi e i parametri ottimali per le misure di ciclovoltammetria si è passati ad uno studio mirato a minimizzare la quantità di mediatore (ferrocianuro di potassio) rilevabile con questo tipo di misure e dunque utilizzabile nel biosensore.

Lo scopo di questo studio è determinato dal fatto che il mediatore utilizzato è tossico per l'enzima che vi si troverà immerso. Utilizzare una concentrazione minima di mediatore può dunque ridurre l'effetto tossico e quindi incrementare potenzialmente la durata del biosensore.

5.3.2.2 Fasi dello studio

Per svolgere lo studio nel modo più rapido possibile senza peccare in precisione, il lavoro è stato suddiviso in due fasi. La prima fase, definita esplorativa, è stata volta a definire in linea di massima la variazione di alcuni parametri nelle misure ciclovoltammetriche in funzione della concentrazione di mediatore utilizzato in soluzione. Questa caratterizzazione è stata svolta utilizzando un metodo di definizione delle concentrazioni rapido ma poco ripetibile vista la sua natura esplorativa. In tal modo si è riservata alla seconda fase la produzione di soluzioni di mediatore di concentrazione definita con precisione, dunque ripetibili con sicurezza. Le misure svolte in questa fase sono state quelle poi utilizzate nei passi successivi della caratterizzazione e validazione del biosensore.

La tecnica per ottenere le soluzioni del mediatore alle diverse concentrazioni, utilizzata nella prima fase dello studio, prevede la diluizione di una concentrazione iniziale di mediatore in soluzione.

Le diluizioni sono effettuate direttamente nel pozzetto del dispositivo microelettronico prelevandone una specifica quantità di soluzione e immettendovi la stessa quantità di KCl 100 mM, solvente nella soluzione iniziale.

Con questa procedura la concentrazione di mediatore in soluzione viene diminuita di un fattore pari al rapporto tra la quantità prelevata e la quantità totale di soluzione presente nel pozzetto (1500 μ L). Ad esempio quindi, per dimezzare la concentrazione di ferrocianuro di potassio in soluzione, è sufficiente prelevare 750 μ L di soluzione dal pozzetto pieno (1500 μ L) e reimmettere la stessa quantità di KCl 100 mM.

Come si accennava poc'anzi tale procedura reiterata porta ad errori che possono divenire rilevanti e per questo le concentrazioni di volta in volta ottenute sono senz'altro poco ripetibili. In compenso questo metodo evita di dover ripetere i protocolli di pulizia, di preparazione alle misure ma soprattutto di eliminazione delle bolle sul dispositivo (cfr. Paragrafo 5.2) per ogni concentrazione di mediatore che si desidera indagare.

In questo modo è possibile ridurre notevolmente il tempo impiegato nella sperimentazione e arrivare a definire in maniera sufficientemente rapida i parametri di interesse dei ciclovoltammogrammi ottenuti dalle misure, in funzione della concentrazione di mediatore in soluzione.

Nella seconda fase dello studio, denominata fase di definizione, le concentrazioni utilizzate nella prima fase sono state ricreate con il metodo classico, in modo da poter effettuare delle misure ripetibili su concentrazioni determinate con precisione. In tale fase è stato anche sostituito il solvente utilizzato nelle soluzioni precedentemente analizzate (KCl) con quello maggiormente utilizzato in letteratura^{[2][3]}, il PBS 100 mM.

- *Fase esplorativa:* Il primo set di misure è stato portato a termine con la soluzione iniziale del mediatore ($K_4[Fe(CN)_6]$ 10 mM in KCl 100 mM). Tale soluzione, presentandosi viscosa ha reso lunga e complicata la fase di eliminazione delle bolle dalla superficie elettrodica (cfr. Paragrafo 5.2.2). I successivi set di misure hanno visto l'applicazione reiterata del protocollo di diluizione nel pozzetto, ottenendo le ciclovoltammetrie di trenta elettrodi su due diversi dispositivi (15 per dispositivo), in precedenza valutati di buona qualità (i dispositivi C1 e C2) da misure di spettroscopia (cfr. Paragrafo 5.3). Per ogni elettrodo sono state eseguite cinque misure, in corrispondenza delle cinque concentrazioni di mediatore considerate.

In tutto si sono quindi ottenute 150 ciclovoltammetrie, ognuna a sua volta

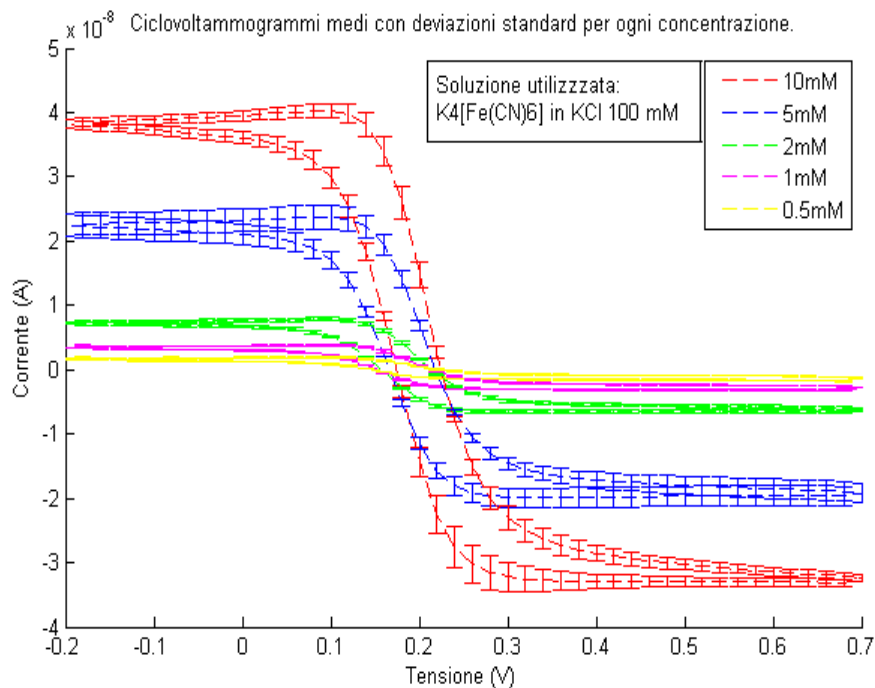


Figura 5.8: Ciclovoltammogrammi medi con deviazioni standard per diverse molarità del mediatore in KCl 100 mM. Le misure sono state eseguite con scan rate 100 mV/s su un totale di 30 microelettrodi suddivisi in due dispositivi diversi (C1 e C2)..

ripetuta per quattro volte (4 sweep).

In tale fase si è evidenziato un aumento della dispersione relativa (sia intra-elettrodo che inter-elettrodo) al diminuire della concentrazione di mediatore in soluzione.

Essendo tali concentrazioni simili a quelle utilizzate in letteratura^{[2][3]}, si è pensato che la dispersione potesse essere legata ai parametri di misura, e in particolare allo scan rate, piuttosto che al dispositivo stesso. Tale ipotesi ha trovato appoggio nella teoria sullo stato stazionario dei microelettrodi (cfr. Paragrafo 4.3.3.4) nella quale il valore limite dello scan rate per la stazionarietà del processo è funzione anche della concentrazione della soluzione (cfr. Formula 4.31). Si è dunque proceduto utilizzando una sola soluzione di mediatore pari a $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in KCl 100 mM e misurandone, in ciclo voltammetria, la risposta con scan rate di 50 mV/s su 40 elettrodi appartenenti ai due dispositivi C1 e C2 (20 elettrodi per dispositivo).

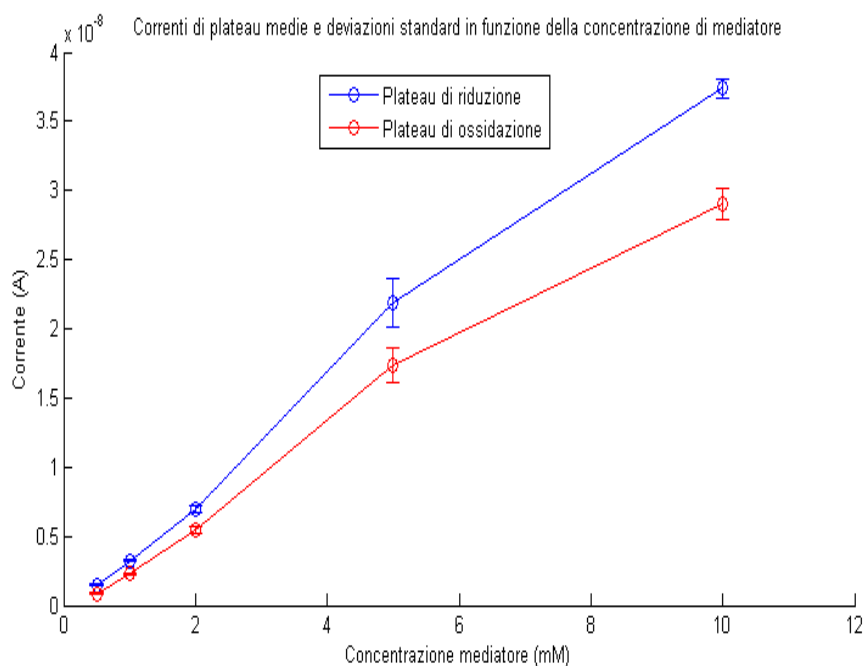


Figura 5.9: Correnti di plateau medie con relative deviazioni standard in funzione delle varie concentrazioni di mediatore in KCl 100 mM.

- *Fase di definizione:* In questa fase si è realizzata l'ultima soluzione utilizzata nella fase esplorativa ($K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in KCl 100 mM), sostituendo al KCl la PBS 100 mM. Entrambi sono delle soluzioni buffer, cioè soluzioni per mantenere costante il pH ad un valore definito. La sostituzione del buffer è

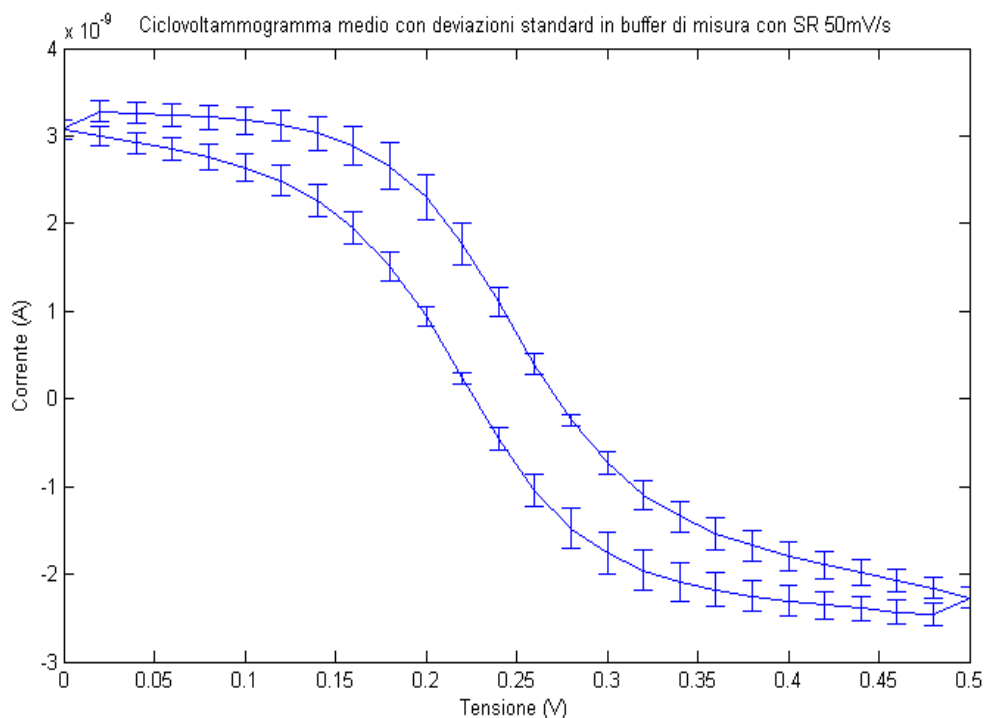


Figura 5.10: Ciclovoltammetrie medie con deviazioni standard relative al buffer di misura. si è utilizzato per ottenere i dati uno scan rate pari a 50 mV/s.

stata eseguita perché il valore del pH mantenuto dalla PBS è più vicino a quello ottimale a cui opera l'enzima lattato ossidasi che si utilizzerà nel biosensore. Un secondo motivo è l'utilizzo della PBS nella maggior parte degli articoli pertinenti in letteratura, la sostituzione potrebbe dunque consentire una maggiore confrontabilità con i biosensori già realizzati, simili a quello in questione.

Per ottenere questa soluzione si è dapprima provveduto a disciogliere in acqua demineralizzata la polvere di PBS in modo da ottenere due provette da 50 mL di PBS 100mM. In seguito si è miscelata in una terza provetta la soluzione $K_4[Fe(CN)_6]$ 100 mM in KCl 100 mM (già disponibile) con la PBS precedentemente ottenuta nelle proporzioni di 1:100. Essendo il cloruro di potassio (KCl) uno dei composti chimici presenti nella PBS, la sua presenza nella soluzione non crea alcun tipo di problema.

A questo punto, una volta portato a termine il protocollo di pulizia, la soluzione ricavata è stata messa in contatto con un dispositivo microelettronico. La procedura di eliminazione è stata veloce data la bassa viscosità della soluzione utilizzata.

Il sistema in questione è stato caratterizzato raccogliendo 30 ciclovoltammogrammi su altrettanti elettrodi del dispositivo C2.

5.3.2.3 Risultati

In questa caratterizzazione preliminare del biosensore sono state poste le basi per l'indagine di alcuni degli aspetti più importanti per la rilevazione dell'analita (il lattato). È stata definita la soluzione (buffer di misura) che costituirà l'ambiente di misura per la quantificazione della concentrazione di lattato in essa aggiunto. Tale soluzione è la seguente: $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in PBS 100 mM. Inoltre si è ottenuta una precisa definizione per i valori dei parametri sperimentali per la ciclovoltammometria. Questi sono stati definiti in modo da minimizzare la dispersione dei ciclovoltammogrammi mantenendo il tempo di misura il più basso possibile.

5.4 Funzionalizzazione del biosensore

In questa importante fase della realizzazione del biosensore si sono perseguiti principalmente due scopi:

1. Identificare un valido protocollo di deposizione dell'enzima (LOx) e dello spaziatore (DTSP), confrontandoli con quelli utilizzati in letteratura.
2. Studiare la copertura superficiale in funzione della concentrazione del composto immobilizzatovi con i protocolli di deposizione individuati al punto precedente.

Gli studi e le misure sperimentali portati a termine per i due composti (LOx e DTSP) sono state condotte parallelamente. Per lo sviluppo del primo punto si sono considerate le soluzioni utilizzate in due lavori recenti su biosensori^{[2][3]} molto simili a quello che si è realizzato durante questa tesi.

Per l'enzima lattato ossidasi la soluzione inizialmente impiegata era composta da 2.5 mg di enzima in polvere liofilizzata disciolti in 480 μ L di PBS 100 mM. Per quanto riguarda la DTSP invece, la soluzione iniziale era DTSP 10 mM in DMSO 100 mM.

Gli studi sulla funzionalizzazione sono stati condotti sui macroelettrodi (cfr. Paragrafo 5.1.1.2) la cui superficie attiva è stata preventivamente risciacquata con acqua demineralizzata.

5.4.1 Caratterizzazione dell'adsorbimento diretto

Lo studio della deposizione dell'enzima per adsorbimento diretto è stato svolto definendo in primis il protocollo di deposizione, quindi il tempo necessario per l'instaurazione di legami sufficientemente robusti. In secondo luogo è stata definita la minima quantità di enzima necessaria per ottenere una copertura della superficie rilevabile attraverso le misure EIS.

5.4.1.1 Protocollo di adsorbimento

Il primo passo nella definizione del protocollo è stato lo studio di quelli effettuati da altri gruppi di ricerca in precedenti lavori sul tema^{[2][3]}. Il generico protocollo di adsorbimento utilizzato dagli altri gruppi è la semplice immersione del dispositivo da funzionalizzare in una soluzione contenente l'enzima per un intervallo temporale determinato.

Questa semplice procedura è stata ottimizzata al fine di ridurre la quantità di enzima utilizzato. Si è pensato di evitare l'immersione dell'intero dispositivo ponendo sopra

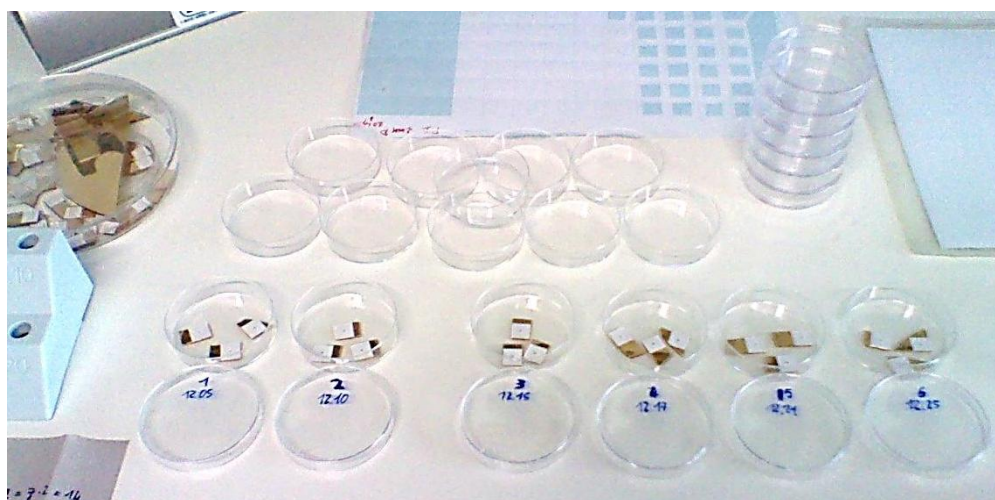


Figura 5.11: Dischi di Petri contenenti i dispositivi funzionalizzati, dopo l'apertura dei dischi e la rimozione del supporto per il mantenimento dell'umidità.

l'area attiva una goccia, di 10 μL di volume, della soluzione enzimatica definita nel Paragrafo 5.4. Per impedire l'asciugatura della goccia, altrimenti rapida, si è posto

l'intero dispositivo in una camera ad alto livello di umidità. Tale camera è stata costruita utilizzando un disco di Petri contenente un supporto umido.

Il tempo di deposizione studiato si riferisce alla permanenza del dispositivo nella camera umida, una volta trascorso questo tempo, il dispositivo viene estratto e la goccia lasciata sciugare all'aria. L'asciugatura della goccia ha dato luogo alla formazione, evidente anche ad occhio nudo, di cristalli di PBS sulla superficie elettrodica. Una foto di questi al microscopio ottico è riportata in figura 5.12.

5.4.1.2 Studio della copertura

La prima prova sperimentale che è stata compiuta era orientata a stabilire l'influenza del tempo di mantenimento del dispositivo in atmosfera umida, con la goccia di soluzione enzimatica su di esso, sul livello di copertura della superficie.

Si sono indagati quattro tempi di adsorbimento (1, 2, 2.5 e 3 ore) utilizzando un dispositivo per ognuno di essi. Il livello di copertura ottenuto è stato indagato con misure di spettroscopia elettrochimica di impedenza (EIS). Le misure sono state ripetute dieci volte per ogni dispositivo.

Tutti i dispositivi sono stati misurati in spettroscopia prima della loro funzionalizzazione (condizione "Fresh")

utilizzando come soluzione di misura 50 μ L di PBS. I cristalli di PBS presenti sulla superficie elettrodica si sono disciolti nel giro di qualche minuto dalla deposizione della goccia sulla superficie.

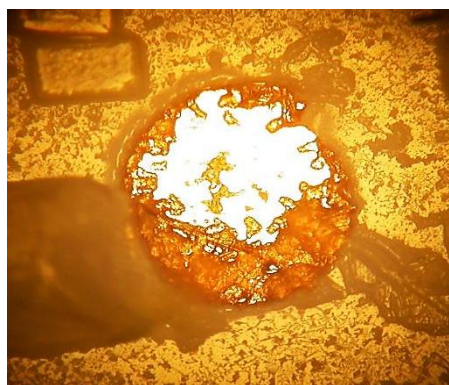


Figura 5.12: Fotografia al microscopio ottico (50x) della superficie attiva di un macroelettrodo funzionalizzato con la soluzione enzimatica prima del risciacquo. Si noti l'abbondante presenza di cristalli di PBS.

I dispositivi funzionalizzati, dopo essere stati caratterizzati una prima volta in spettroscopia, sono stati delicatamente sciacquati con 100 μ L di PBS e in seguito con abbondante acqua demineralizzata. Una volta terminata tale procedura, che ha

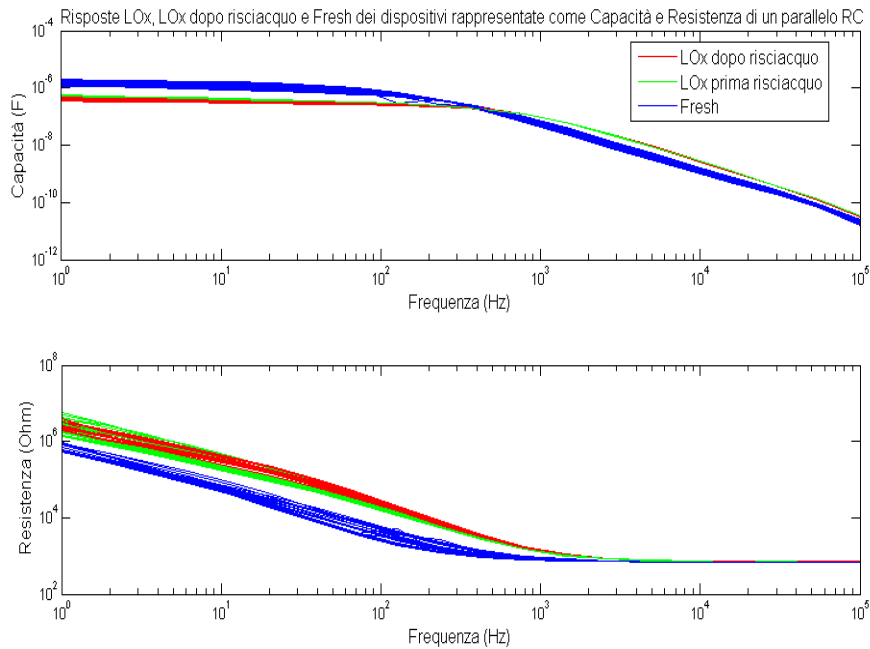


Figura 5.13: Grafici dell'impedenza dei dispositivi prima della funzionalizzazione (Fresh) e dopo la funzionalizzazione (LOx), prima e dopo lo sciacquo. L'impedenza è modellizzata come un parallelo RC. In figura sono rappresentati i grafici di capacità e resistenza, al variare della frequenza, il cui parallelo definisce l'impedenza misurata.

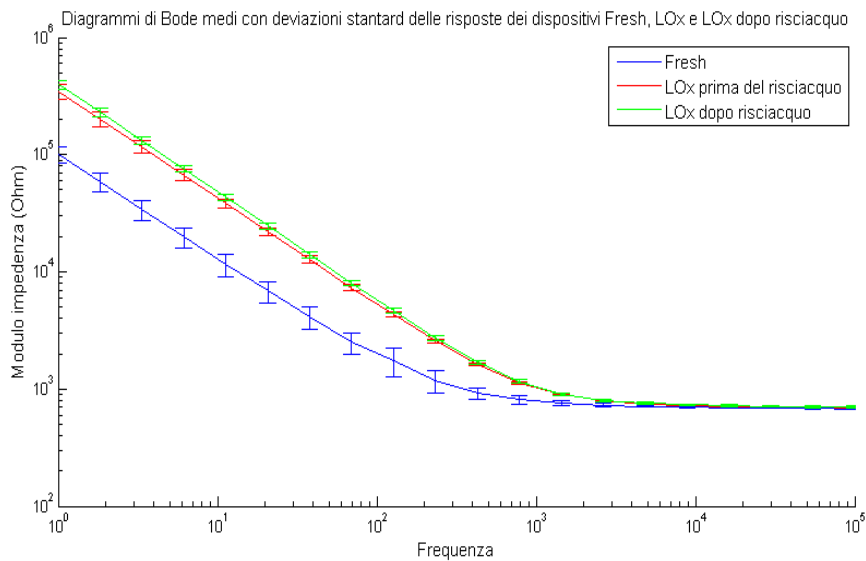


Figura 5.14: Medie dei diagrammi di Bode di tutti i dispositivi con relative deviazioni standard per i tre set di dati relativi alla condizione prima della funzionalizzazione (Fresh), dopo la funzionalizzazione (LOx) e prima del risciacquo ed infine dopo la funzionalizzazione e dopo il risciacquo.

consentito di rimuovere eventuali cristalli di PBS rimasti sulla superficie, i dispositivi sono stati nuovamente caratterizzati in spettroscopia.

Lo scopo della procedura attuata è stato quello di determinare qualitativamente la robustezza del legame dell'enzima adsorbito con la superficie e di verificare che quanto rilevato dalla spettroscopia prima del risciacquo fosse effettivamente l'enzima e non la PBS cristallizzata, solubile in acqua.

I diagrammi di Bode ottenuti sovrapponendo i tre set di misure di spettroscopia presentano una netta differenza tra la condizione Fresh dei dispositivi e quella funzionalizzata. Invece la differenza tra la condizione funzionalizzata prima e dopo il risciacquo è molto meno marcata, ad indicare una certa robustezza del legame naturale tra enzima e superficie elettrodica.

Non è invece stata osservata una variazione altrettanto evidente della copertura in funzione del tempo di adsorbimento. In ragione di questo fatto, si è scelto di utilizzare come tempo di funzionalizzazione per le sperimentazioni successive il più breve tra quelli caratterizzati nelle misure (un'ora).

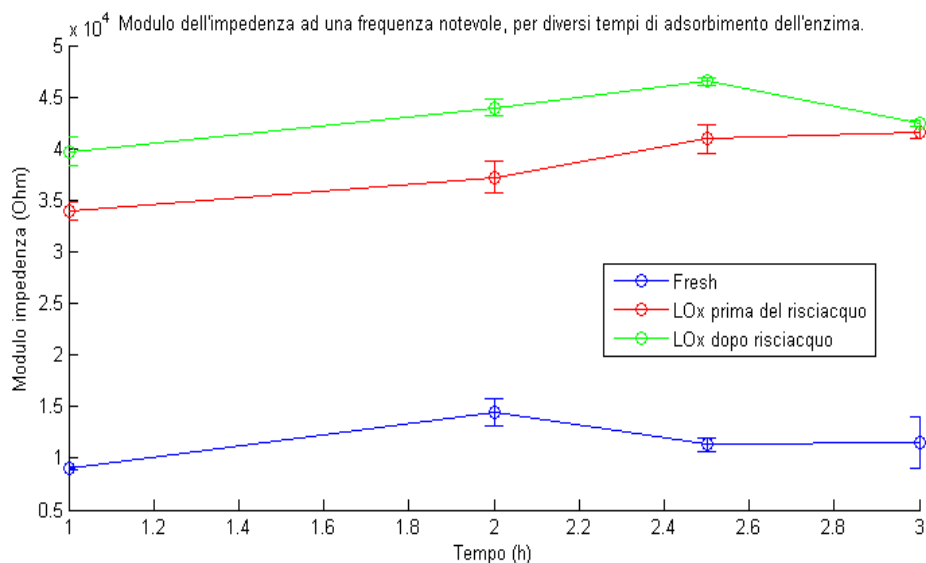


Figura 5.15: Grafico delle medie dei moduli dell'impedenza con deviazioni standard ad una frequenza fissata (11.3 Hz) in funzione del tempo di adsorbimento. Il grafico Fresh vale unicamente come riferimento, non subendo alcun tipo di adsorbimento.

Riepilogando quanto emerso dalle misure, i risultati di questo studio sono:

1. L'avvenuta copertura superficiale della superficie macroelettrodica con l'enzima lattato ossidasi (LOx).
2. La resistenza dell'enzima adsorbito al risciacquo della superficie.

3. La definizione temporale del protocollo di deposizione che consiste dunque nel mantenimento del dispositivo in camera ad alta umidità per un intervallo di tempo di 1 ora.

5.4.1.3 Studio sulla concentrazione dell'enzima

Una volta definito con precisione il protocollo di deposizione dell'enzima sulla superficie elettrodica dei macroelettrodi si è passati a studiare il livello di copertura della stessa ottenibile con diverse concentrazioni di enzima LOx nella soluzione di PBS.

A questo scopo sono state realizzate sei soluzioni diluendo quella utilizzata nel paragrafo precedente per lo studio del protocollo di deposizione (2.5 mg LOx in 480 μ L di PBS 100 mM). La concentrazione di tali soluzioni verrà indicata nel seguito come concentrazione volumetrica percentuale riferita a quella iniziale appena descritta. Da ciò la concentrazione 100% vol. corrisponderà a quella iniziale, quella 50% vol. alla metà di quella iniziale (ottenuta con diluizioni di PBS) e così via.

La copertura della superficie elettrodica viene valutata ancora una volta con la tecnica della spettroscopia elettrochimica di impedenza con la differenza rispetto allo studio precedente della soluzione in cui viene effettuata la misura. Infatti la PBS viene sostituita, in questa sessione di misure, dal buffer di misura definito dagli studi sui microelettrodi (cfr. Paragrafo 5.3.2). In tal modo si avrà a disposizione una caratterizzazione in spettroscopia del biosensore nelle condizioni in cui verrà operata la rilevazione del lattato.

Per la funzionalizzazione dei dispositivi si utilizza il protocollo definito nel precedente paragrafo mantenendo i dispositivi per un'ora in una camera ad alta umidità, a contatto con 10 μ L di soluzione enzimatica.

Per questo studio sono stati utilizzati 16 macroelettrodi in modo da impiegarne due per ogni concentrazione di enzima in soluzione (6 soluzioni) e i restanti quattro per una caratterizzazione del dispositivo non funzionalizzato.

Non avendo particolari aspettative sul tipo di curva che sarebbe potuta emergere

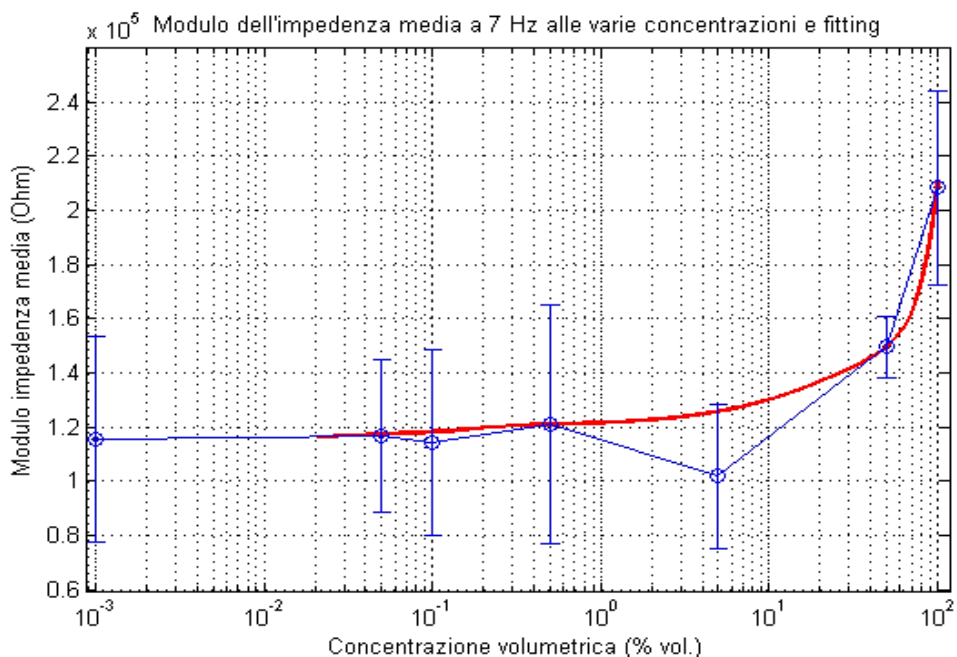


Figura 5.16: Grafico del modulo delle impedenze medie con relative deviazioni standard per ogni concentrazione di soluzione enzimatica utilizzata. In figura viene riportato anche il fitting (in rosso) delle misure. La concentrazione più bassa rappresenta i dispositivi Fresh.

dallo studio si è cercato di coprire l'intervallo più ampio possibile di concentrazioni. Il comportamento atteso era quello qualitativo di aumento dell'impedenza all'aumentare della concentrazione dell'enzima in soluzione e quindi di quello adsorbito. Alle concentrazioni più basse, la risposta attesa era quella dei dispositivi non funzionalizzati.

L'andamento dell'impedenza ricavato dallo studio presenta una crescita rapida in prossimità delle concentrazioni più alte (50% vol., 100% vol.) ed un plateau in corrispondenza di tutte le altre.

La soluzione iniziale utilizzata in questo studio ed in quello precedente per la definizione del protocollo di adsorbimento (la soluzione 100% vol.), è quella utilizzata nella gran parte degli articoli scientifici su biosensori paragonabili a quello sotto indagine in questo lavoro^{[1][2]}. Lo studio appena descritto ha consentito di definire la possibilità di utilizzare una concentrazione minore di enzima (50% vol.) per ottenere comunque una buona copertura della superficie elettrodica.

Nei passi successivi di questo lavoro, quindi nelle prove di rilevazione del lattato, verrà utilizzata proprio questa concentrazione di lattato ossidasi (corrispondente a 1.25 mg di LOx liofilizzato disciolto in 480 μ L di PBS 100 mM).

5.4.2 Studio sul cross-linking

Parallelamente agli studi sull'immobilizzazione dell'enzima, descritti nei paragrafi precedenti, sono stati condotti studi analoghi sulla copertura della superficie elettrodica con uno spaziatore, utilizzabile per funzionalizzarla mediante cross-linking (cfr. Paragrafo 2.1.4). Il composto in questione è il DTSP (cfr. Paragrafo 5.1). Come per l'enzima LOx, per prima cosa è stato definito e verificato un protocollo di deposizione che è stato perlopiù tratto da lavori simili in letteratura ^{[1][2]}. Come secondo passo, come nella trattazione sulla funzionalizzazione superficiale con l'enzima, si è caratterizzato il livello di copertura della superficie elettrodica a diverse concentrazioni di DTSP in DMSO (cfr. Paragrafo 5.1).

L'indagine di tale aspetto per lo spaziatore ha richiesto più tempo di quella sull'enzima essendo caratterizzata da un protocollo di deposizione più lunghi ed avendo dovuto ripeterla più volte con set di soluzioni a concentrazioni diverse per caratterizzare con la necessaria precisione la curva dell'impedenza in funzione della concentrazione di DTSP.

5.4.2.1 Protocollo di deposizione

Per la deposizione della DTSP sulla superficie dei macroelettrodi si è utilizzato un protocollo molto simile a quello per la funzionalizzazione con l'enzima. Le differenze principali sono state: il tempo di mantenimento in atmosfera umida all'interno dei dischi di Petri, che è stato fissato a tre ore e il non far asciugare all'aria la soluzione posta sull'area attiva del macroelettrodo. Infatti, i dispositivi con la copertura di DTSP sono stati sciacquati delicatamente con 200 µL di DMSO e con abbondante acqua demineralizzata appena terminato il tempo di permanenza in atmosfera umida.

Tutte le altre procedure e quantità utilizzate sono identiche a quelle viste per la funzionalizzazione della superficie con l'enzima.

5.4.2.1 Studio sulla concentrazione di spaziatore

Con lo scopo di definire la copertura della superficie elettrodica al variare della concentrazione di DTSP in DMSO, sono state realizzate sei soluzioni a concentrazioni diverse.

Anche in questo caso, come in quello dell'enzima, si è deciso di utilizzare come soluzione a concentrazione più elevata quella maggiormente utilizzata in letteratura per questo genere di ricerche scientifiche^{[1][2]}. Si è dunque realizzata una soluzione iniziale composta da DTSP 10 mM in DMSO 99.9% vol..

Le soluzioni realizzate diluendo quella iniziale, con concentrazioni comprese tra 1mM/L e 10 mM/L, hanno consentito di verificare l'avvenuta copertura della superficie ed anche in questo caso, la resistenza del legame tra il DTSP e la superficie al risciacquo. Fra le misure effettuate si è considerata anche una soluzione a "concentrazione zero", cioè composta di solo solvente (DMSO) per la quale è stato utilizzato lo stesso protocollo di deposizione delle altre.

Tutte le misure di spettroscopia sono state eseguite utilizzando il buffer di misura (cfr. Paragrafo 5.3.2.3).

Le misure di spettroscopia sono state condotte su due macroelettrodi per ogni concentrazione analizzata e ripetendo la misura tre volte per ognuno di essi.

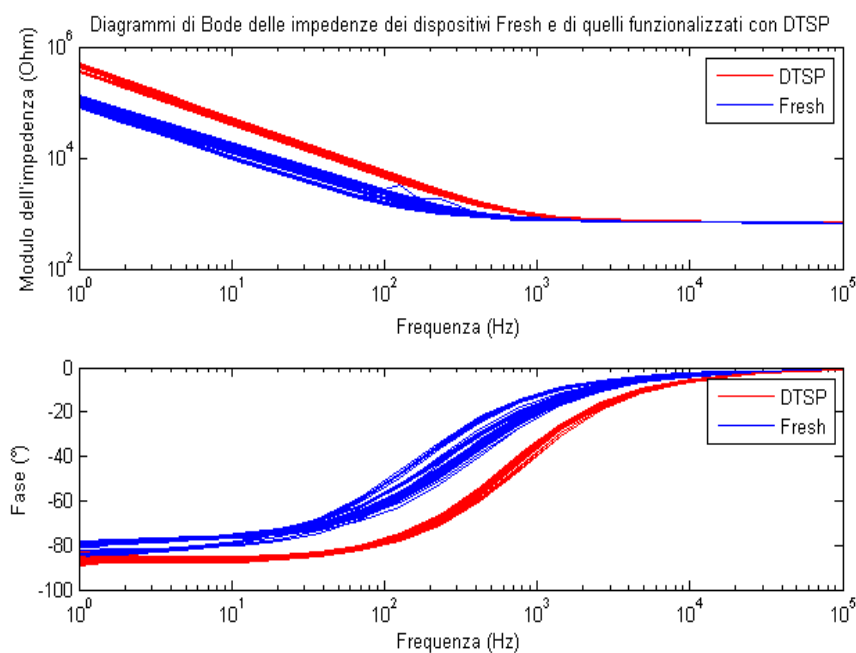


Figura 5.17: Diagrammi di Bode delle impedenze dei dispositivi Fresh e dei dispositivi funzionalizzati con il primo set di diluizioni (DTSP 1-10 mM in DMSO 100 mM).

Per il secondo studio sono state utilizzate concentrazioni inferiori (fino a 1 μ M/L), che hanno consentito di individuare una ripida crescita dell'impedenza in corrispondenza delle concentrazioni più basse.

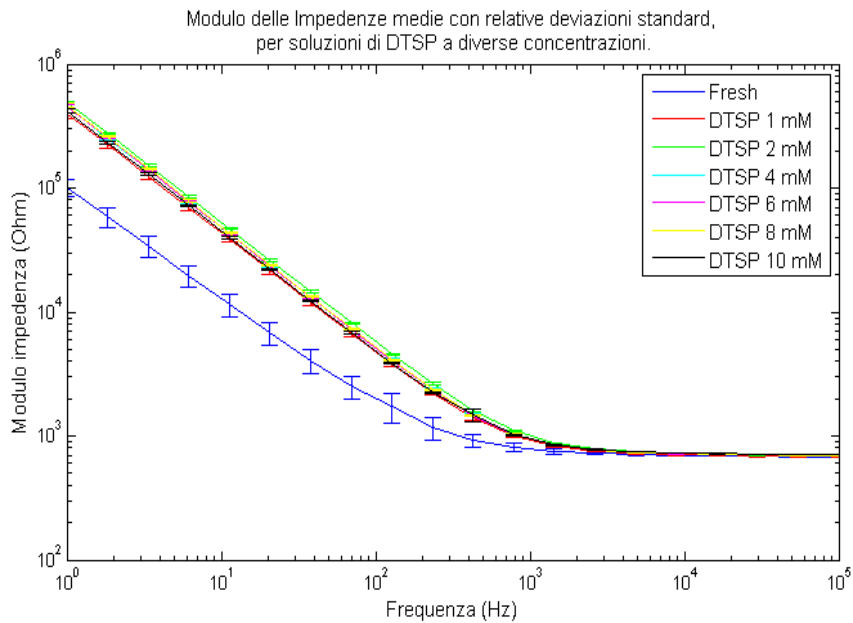


Figura 5.18: Modulo delle impedenze medie con relative deviazioni standard dei dispositivi Fresh e di quelli funzionalizzati con il primo set di diluizioni (DTSP 1-10 mM in DMSO 100 mM).

L'andamento dell'impedenza della superficie elettrodeica funzionalizzata rispetto alla concentrazione di DTSP con la quale è stata funzionalizzata si è presentato in modo molto diverso da quello ricavato per l'enzima. Infatti, si è riscontrato che il modulo dell'impedenza cresce, ed anche in modo molto ripido, al decrescere della

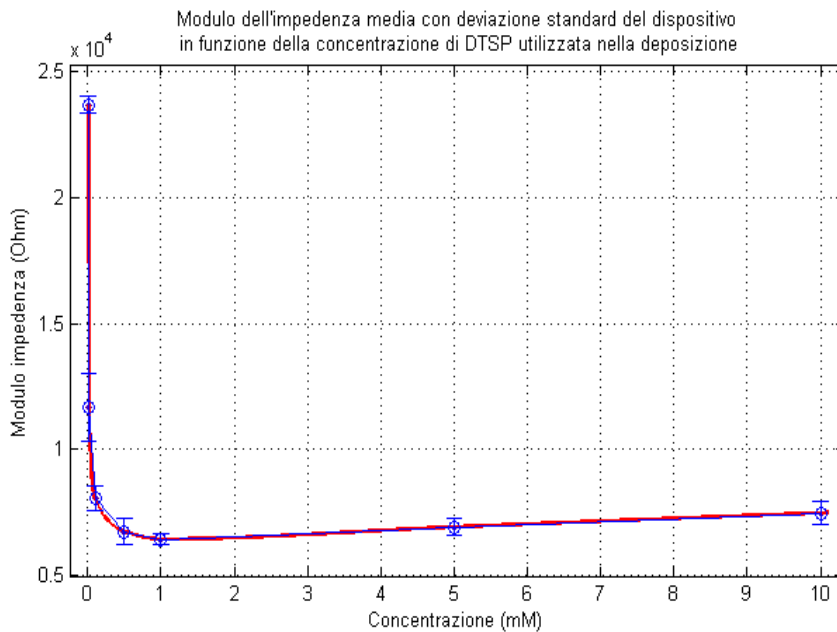


Figura 5.19: Grafico del modulo dell'impedenza media dei dispositivi, con relative deviazioni standard, ad una frequenza fissata (300 Hz) in funzione della concentrazione di DTSP utilizzata nella deposizione.

concentrazione di DTSP in soluzione.

Una delle ipotesi formulate per cercare di spiegare tale comportamento è che il DTSP sia maggiormente conduttivo rispetto al DMSO e che quest'ultimo, adsorbendosi sulla superficie elettrodica ne occupi la gran parte, quando presente in concentrazioni elevate (corrispondenti a basse concentrazioni di DTSP). Se la sua conducibilità fosse veramente inferiore a quella del DTSP allora sarebbe naturale che l'impedenza del sistema aumenti al crescere della concentrazione di DMSO (quindi al decrescere di quella di DTSP).

In letteratura esistono diversi studi sulle interazioni tra superfici d'oro e molecole di DMSO^{[6][7][8][9]}. Tale composto sembra formare addirittura delle strutture ordinate in forma di catene circolari su superfici d'oro di particolari rugosità^[6].

Queste caratterizzazioni del DTSP consentono di studiare la possibilità di funzionalizzare la superficie mediante cross-linking, oltre che per adsorbimento diretto. Il comportamento dell'impedenza del macroelettrodo in funzione della concentrazione di DTSP con cui è stato funzionalizzato suggerisce che sia possibile utilizzare per il cross-linking concentrazioni più basse di DTSP rispetto a quelle riportate in letteratura^{[1][2]}.

5.5 Rilevazione del lattato

5.5.1 Parametri sperimentali

Dopo aver determinato sui microelettrodi il buffer di misura da utilizzare (cfr. Paragrafo 5.3.2.3) e dopo aver caratterizzato sui macroelettrodi la funzionalizzazione della superficie attiva con l'enzima nello stesso buffer di misura (cfr. Paragrafo 5.4.1), si è passati a indagare l'aspetto principale nella realizzazione del biosensore: la rilevazione dell'analita.

Per lo studio della capacità di rilevazione del biosensore si sono utilizzati dei macroelettrodi (cfr. Paragrafo 5.1.1.2) funzionalizzati con l'enzima lattato ossidasi (LOx) per adsorbimento diretto.

La soluzione utilizzata per la funzionalizzazione è una miscela di 1.25 mg di enzima liofilizzato in 480 μ L di PBS 100 mM, scelta grazie allo studio sulla funzionalizzazione eseguito nel paragrafo 5.4.1.3.

5.5.2 Metodi di diluizione

Uno dei metodi più diffusi e rapidi per la realizzazione delle soluzioni di acido lattico è quello delle aggiunte progressive. In tale metodo si pone sul dispositivo funzionalizzato un volume definito di buffer di misura e si caratterizza la risposta Fresh del biosensore (cioè la misura priva di acido lattico) in ciclo voltammetria. Una volta fatto ciò, si aggiunge al volume in precedenza posto sul dispositivo una quantità specifica di acido lattico puro, calcolata in modo da ottenere la concentrazione che si intende misurare. A questo punto viene lanciata un'altra ciclo voltammetria, terminata anche questa si aggiungerà altro acido lattico definendo una nuova concentrazione, e così via. Si procede in questo modo di soluzione in soluzione su di un unico dispositivo. Il grande vantaggio di questo metodo è che, non richiedendo la realizzazione precedente di un set di soluzioni, consente di modificare in qualsiasi momento il piano delle misure e di creare delle soluzioni con concentrazioni di acido lattico ad hoc, secondo quanto rilevato nelle misure precedenti. Questo metodo ha però alcuni difetti:

1. Le aggiunte progressive di acido lattico nel buffer di misura causerebbero la progressiva diminuzione della concentrazione del mediatore in esso contenuto.
2. Con questo metodo le misure ciclo voltammetriche vengono effettuate ripetutamente, sullo stesso dispositivo, ad ogni nuova soluzione realizzata.

Per quanto riguarda il secondo punto, è necessario ricordare che le misure ciclo voltammetriche possono produrre modificazioni della componente biologica immobilizzata sulla superficie dell'elettrodo, in modo particolare se questa vi è solo adsorbita. Per questo motivo eseguire numerose ciclo voltammetrie può risultare deleterio per la risposta del biosensore e inficiare notevolmente le misure.

Il metodo descritto quindi si rivela del tutto inaffidabile per definire la rilevazione del lattato ad altre concentrazioni dato il numero di ciclo voltammetrie già eseguite sul dispositivo e i conseguenti potenziali danneggiamenti indotti sulla sua superficie.

Per i motivi sopra elencati in questo lavoro si è utilizzato il metodo delle aggiunte progressive solo in una prima fase esplorativa, allo scopo di determinare quali

fossero i limiti estremi di rilevazione del biosensore. Nella fase successiva (di definizione) si sono realizzate le soluzioni di acido lattico in modo tradizionale: considerando un volume fissato di PBS 100 mM si sono calcolati i volumi di $K_4[Fe(CN)_6]$ 100 mM in PBS 100 mM e di acido DL-lattico 90% vol. da aggiungervi per ottenere la concentrazione prescelta di acido lattico in $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in PBS 100 mM, cioè nel buffer di misura.

5.5.3 Misure

Nella fase esplorativa si sono utilizzati quattro macroelettrodi testando svariate concentrazioni di acido lattico con il metodo delle aggiunte progressive. Le misure condotte, data la loro natura esplorativa, sono state eseguite mediante ciclovoltammetrie relativamente veloci (utilizzando uno scan rate di 0.1 mV/s). Dalle misure è stato possibile individuare un picco di riduzione nel ciclovoltammogramma. Si è dunque deciso di considerare come parametro di rilevazione il valore della corrente di questo picco. Da questa fase esplorativa è stato possibile identificare grossolanamente un intervallo di concentrazioni entro il quale la risposta amperometrica (definita dal valore di corrente del picco di riduzione) del biosensore

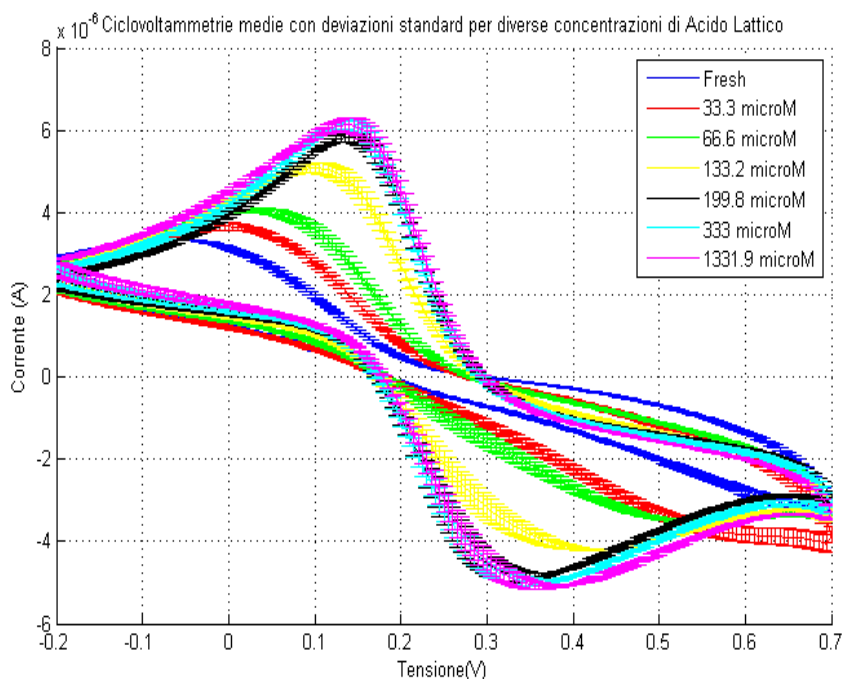


Figura 5.20: Ciclovoltammogrammi medi con relative deviazioni standard per le sette concentrazioni di acido DL-lattico in buffer di misura indagate. Le misure sono state effettuate con uno scan rate pari a 50 mV/s

appariva essere circa lineare con la concentrazione di acido lattico.

Si è passati dunque alla fase di definizione realizzando sette soluzioni in modo che coprissero bene l'intervallo di concentrazioni di acido DL-lattico individuato nella fase precedente.

Per ogni soluzione realizzata si sono utilizzati due dispositivi ai quali ne devono essere aggiunti altri due caratterizzati nel buffer di misura in assenza dell'analita (condizione Fresh). Sono stati dunque funzionalizzati con l'enzima un totale di 16

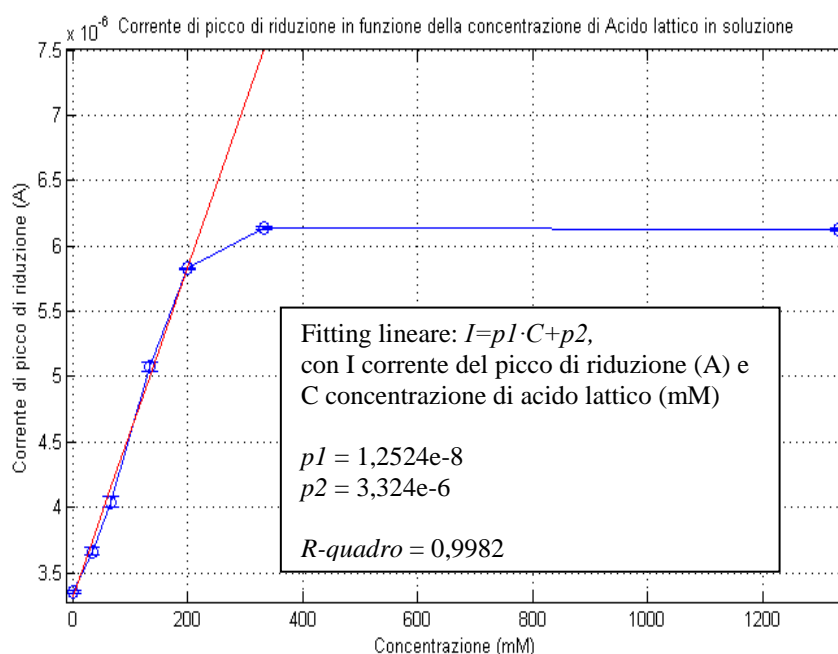


Figura 5.21: Medie e deviazioni standard delle correnti di picco di riduzione in funzione della concentrazione di acido lattico in buffer di misura.

macroelettrodi utilizzando la soluzione enzimatica scelta dallo studio sulla funzionalizzazione (cfr. Paragrafo 5.4.1.3).

La rilevazione del lattato è stata eseguita amperometricamente mediante ciclovoltammetria, utilizzando uno scan rate pari a 50 mV/s (cfr. Paragrafo 4.3.3), in modo da ottenere un buon compromesso tra tempo di misura e dispersione delle 8 scansioni eseguite su ogni dispositivo.

5.5.4 Performance del biosensore:

Prendendo come parametro di misura il valore della corrente del picco di riduzione (quello superiore in figura 5.16) si sono definite quantitativamente due caratteristiche importanti per valutare la performance del biosensore:

1. Intervallo di linearità della risposta amperometrica con la concentrazione di acido lattico analizzata dal biosensore.
2. Sensibilità del biosensore alla concentrazione di acido lattico.

Per la prima caratteristica, come si può notare in figura 5.21, con il biosensore realizzato si ottiene una risposta amperometrica lineare fino ad una concentrazione di acido lattico di circa 200 mM. Per quanto riguarda invece la sensibilità della rilevazione, questa è rappresentata dalla pendenza del fitting lineare della risposta amperometrica (cfr. pI in figura 5.21).

Il valore ottenuto per essa con il biosensore è pari a circa 12.5 nA/mM.

Va ricordato che i valori di concentrazione riportati si riferiscono ad acido DL-lattico in una soluzione racemo (cfr. Paragrafo 3.2.1), contenete quindi acido L-lattico e D-lattico in ugual misura. L'enzima immobilizzato sulla superficie elettrodica del biosensore è in grado di catalizzare solo la reazione dell'acido L-lattico, quindi le concentrazioni riportate andrebbero divise a metà per riferirle solamente all'acido L-lattico. Questo aspetto è particolarmente rilevante per l'applicazione del biosensore nel settore sanitario dato che nell'uomo l'acido lattico è normalmente presente solo in forma di acido L-lattico.

Anche in questo caso comunque, intervallo di linearità e sensibilità del biosensore sono compatibili per le misure per cui esso è stato designato. Infatti, concentrazioni ematiche normali di acido L-lattico nell'uomo sono comprese tra 1 mM/L e 20 mM/L in condizioni di intenso esercizio fisico (cfr. Paragrafo 3.2.2.2).

Nel settore dell'industria alimentare, il limite fissato per l'aggiunta di acido lattico è di 50 mM/L^[4] quindi il biosensore realizzato si dimostra adatto ad essere utilizzato anche in questo frangente.

Bibliografia

1. Parra A., Casero E., Vázquez L., Pariente F., Lorenzo E.; “Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces”; 2005.
2. Gamero M., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C.; “Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors”; 2010.
3. Garjonyte R., Yigzaw Y., Meskys R., Malinauskas A., Gorton L.; “Prussian Blue- and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid”; 2001.
4. Direttiva 95/2/CE del Parlamento europeo e del consiglio del 20/05/1995.
5. Debacher N.A., Ottewill R.H.; “Kinetics of contact angle formation at the gas-liquid-solid interphase” (2001).
6. Siv K. Si and Andrew A. Gewirth; “Solvent Organization above Metal Surfaces: Ordering of DMSO on Au”; 2000.
7. C. Schröter, B. Roelfs, T. Solomun; “The interaction of dimethylsulfoxide with a gold surface”; 1998.
8. Norihito Ikemiya and Andrew A. Gewirth; “Structure Sensitive Adsorption of DMSO on Au Surfaces”; 2000.
9. Zofia Borkowska, Grayna Jarzbek; Metal-solvent interactions at the electrode-solution interface: An experimental approach; 2001.
10. Bard A.J., Faulkner L.R.; “Electrochemical methods, fundamentals and applications-second edition”; 2001.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato la realizzazione di un dispositivo elettronico per la rilevazione e la misura della concentrazione di lattato in campioni liquidi di volume nell'ordine dei microlitri.

Il dispositivo elettronico che è stato realizzato è un biosensore cosiddetto di seconda generazione, il quale impiega un mediatore ossido-riduttivo in combinazione con una componente biologica per la rilevazione dell'analita di interesse, ovvero l'acido lattico.

Durante lo sviluppo di questa tesi sono stati affrontati diversi temi riguardo la progettazione del biosensore.

Per prima cosa è stata minimizzata la quantità di mediatore utilizzata per il biosensore elettrochimico enzimatico di seconda generazione che si è realizzato. Ciò riveste un ruolo di primaria importanza in quanto, essendo il mediatore tossico per l'enzima, la minimizzazione della sua concentrazione intorno ad esso può potenzialmente aumentarne la vita media, dunque la durata del biosensore.

Si è quindi passati a valutare tramite misure di spettroscopia d'impedenza la funzionalizzazione della superficie attiva dell'elettrodo, sia con l'enzima lattato ossidasi che con un composto (DTSP) utilizzabile per il cross-linking dell'enzima alla superficie elettrodica. Si è indagata in questo modo l'opportunità di immobilizzare l'enzima con un metodo diverso dall'adsorbimento diretto.

E' stato definito un protocollo di deposizione dell'enzima ed è stato studiato il livello di copertura della superficie elettrodica in funzione della concentrazione di enzima nella soluzione utilizzata per la funzionalizzazione. In merito a questa analisi è stata verificata la realizzabilità del biosensore anche con l'utilizzo di concentrazioni di enzima inferiori a quelle riportate in letteratura.

Infine è stata studiata la rilevazione dell'acido lattico a diverse concentrazioni, determinando la risposta amperometrica del biosensore. Le prestazioni del biosensore sono state valutate definendo l'intervallo di linearità e la sensibilità nella rilevazione di acido lattico a diverse concentrazioni.

Da queste considerazioni è emerso che il biosensore realizzato è compatibile con i livelli di acido lattico presenti sia nel settore agroalimentare che in quello sanitario.