



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

POLIMERIZZAZIONE RADICALICA PER TRASFERIMENTO DI ATOMO INIZIATA DA SUPERFICIE (SI-ATRP)
PER APPLICAZIONI SENSORISTICHE

Relatore: Prof. AHMED ISSE ABDIRISAK

Laureando: FABIO XU
NM: 2009919

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

INTRODUZIONE	3
Sensori chimici.....	3
Sensori elettrochimici.....	4
Sensori e qualità della vita	4
Nanosensori.....	7
eATRP	7
SI-ATRP	9
Note generali.....	9
Electrografting.....	9
Self-assembled monolayers.....	11
Molecularly-imprinted polymers	12
Immobilizzazione di polimeri contenenti gruppi elettroattivi	15
Conclusione.....	17
Bibliografia.....	17

INTRODUZIONE

Sensori chimici

Dalla definizione IUPAC i sensori chimici sono dei dispositivi in grado di convertire un'informazione chimica, che va dalla concentrazione di un singolo componente specifico del campione in analisi alla concentrazione di tutti i componenti dell'intera matrice, in segnali analiticamente utili. (1)

Generalmente parlando un sensore chimico è costituito da due parti principali, ovvero un ricettore e un trasduttore. La funzione del ricettore è quella di interagire con l'analita generando una energia misurabile; si definisce biosensore se il ricettore è di origine biologica. Per quanto concerne il trasduttore, il suo ruolo è quello di convertire l'energia generata dalla interazione ricettore-analita in un segnale analitico.

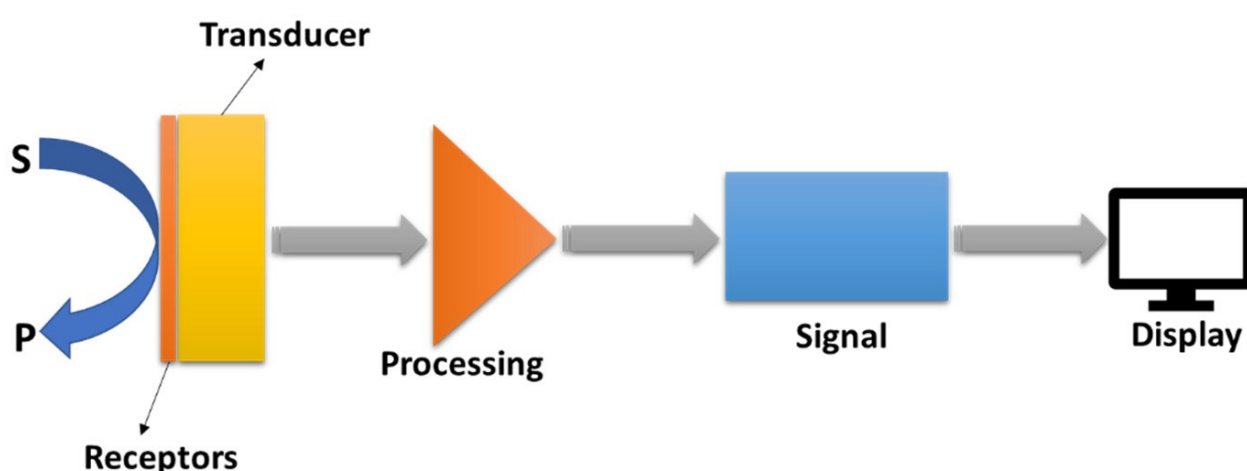


Figura 1. Diagramma schematico che raffigura i principali componenti di un comune sensore. (2)

L'alta specificità dei sensori non è dovuta al trasduttore, ma bensì al ricettore che lavorando in condizioni operative controllate il segnale analitico può essere indipendente dalla matrice. In base al principio chimico-fisico sfruttato dal trasduttore per riprodurre il segnale analitico è possibile classificare i sensori chimici nelle seguenti categorie e sottocategorie:

- Ottici se l'interazione analita-ricettore causa una variazione dei fenomeni ottici come l'assorbanza, la riflettanza, la luminescenza, la fluorescenza, la rifrazione e la luce diffusa.
- Elettrochimici se l'interazione analita-ricettore genera una corrente elettrica misurabile attraverso diverse tecniche analitiche come la voltammetria, amperometria e la potenziometria.
- Elettrici se l'interazione analita-ricettore genera una variazione delle proprietà elettriche del campione come la permittività elettrica e la conducibilità elettrica.
- Magnetici se l'interazione analita-ricettore fa variare il paramagnetismo del campione

Per la precisione in letteratura sono presenti altre classificazioni, oltre a questa; infatti, i sensori chimici vengono distinti spesso in base al loro utilizzo e non in base al loro principio di funzionamento.

Lo scopo di questo elaborato è di approfondire i biosensori elettrochimici ed elettrici (d'ora in poi le due categorie di sensori vengono considerate un tutt'uno). (1) (3)

Sensori elettrochimici

In questo paragrafo vengono esplicitate le principali tecniche analitiche dei sensori elettrochimici, precedentemente citate, e i loro vantaggi rispetto ad altre tecniche analitiche strumentali.

Le tecniche elettrochimiche sono:

- Voltammetria. Attraverso un sistema a tre elettrodi (Lavoro, riferimento e ausiliario) si misura l'intensità di corrente rispetto ad un crescente o decrescente potenziale elettrico
- Amperometria. Si misura la variazione di intensità di corrente nel tempo ad un potenziale elettrico costante. La corrente misurata nel sistema è dipendente dalla concentrazione dell'analita
- Potenziometria. In un sistema ove l'intensità di corrente è zero si misura il potenziale elettrico che si sviluppa nella cella elettrochimica. Tale potenziale è dovuto all'energia libera di Gibbs della reazione di cella che non è nulla in condizioni di non equilibrio chimico.
- Impedimetria. Si perturba la cella con un piccolo potenziale alternato e si osserva come il sistema ritorna nello stato di equilibrio.
- Conduttimetria. Viene monitorata la capacità di condurre la corrente elettrica dell'analita secondo la legge di Ohm, $E = IR$, dove E è la differenza di potenziale, I è l'intensità di corrente e R è la resistenza. Questa tecnica, tuttavia, è meno vantaggiosa rispetto alle altre per l'effetto matrice causato dalle specie ioniche, oltre all'analita, presenti nel campione.

Rispetto a tecniche analitiche strumentali come la spettroscopia UV-Vis, IR, di assorbimento atomico, di massa, etc. i sensori elettrochimici non richiedono una strumentazione sofisticata e non sono invasive verso il campione da analizzare. Perciò, le tecniche elettrochimiche risultano più economiche, veloci, riproducibili e spesso più selettive rispetto a determinati analiti. Inoltre, non sono distruttive e questo permette un monitoraggio costante delle specie chimiche ricercate.

L'alta selettività di questi sensori è dovuta alla particolare struttura del ricettore; infatti, è costituita da polimeri organici conduttivi. Tali composti presentano una estesa coniugazione di orbitali π permettendo agli elettroni di delocalizzarsi da un monomero all'altro. Inoltre, l'alta flessibilità strutturale dei polimeri permette la funzionalizzazione dei sensori con biomolecole, chiamati biosensori, che interagiscono selettivamente con l'analita in una matrice complessa. (1) (2)

Sensori e qualità della vita

Il concetto di qualità della vita è molto ampio ed esprimibile secondo una moltitudine di indicatori. Tra questi indicatori si ha la salute, la quale è strettamente correlato al controllo delle malattie, qualità e sicurezza degli alimenti, e il livello dell'inquinamento ambientale.

Uno degli strumenti analitici per monitorare le specie chimiche, che possono causare danni alla salute e/o all'ambiente, sono i sensori elettrochimici e le loro caratteristiche descritte nei precedenti paragrafi sono compatibili in questo genere di misure analitiche.

Per la ricerca delle biomolecole è essenziale che il ricettore abbia un'affinità chimico-fisica con esse; perciò, si utilizzano spesso i biosensori dove l'elemento di ricezione è anch'esso una biomolecola.

Questa categoria di sensori presenta una classificazione che si basa sulla tipologia della biomolecola e il suo metodo di intrappolamento sulla superficie dell'elettrodo.

L'elemento biologico di ricezione può essere un biocatalizzatore (es. enzima, microorganismi

e tessuti) o un bioligando (es. anticorpo, acido nucleico e lectina). (4)

In vari ambiti clinici si hanno vari esempi di utilizzo dei biosensori come la diagnosi di infezioni virali e tra questi si possono citare l'Epatite E, il Coronavirus, l'HIV, l'Influenza, la Malaria e il Zika virus. (5) (6) (7)

Inoltre, grazie ai biosensori che rilevano selettivamente gli enzimi è possibile monitorare il cancro e le malattie relative alla gravidanza. (8) (9)

In tabella 1 sono riportati una serie di biosensori enzimatici affiancate le loro caratteristiche analitiche (limite di rivelabilità, limite di linearità e tempo di risposta) che possono essere utilizzati nei test di controllo più comuni come glucosio (glucometro), etanolo (alcol test), acido lattico, colesterolo, urea, etc. Dalle caratteristiche è possibile confermare che i biosensori enzimatici forniscono delle misure veloci e sono sensibili a concentrazioni nell'ordine del mM e

Analyte	Enzyme	Characteristics	Application
Glucose	Glucose oxidase	LR: up to 25 mM Rejuvenation of the sensor possible Operation mode (ii)	Measurements with the sensor implanted subcutaneously in dogs
	Glucose oxidase	LR: up to 25 mM DL: 0.5 mM 10–20 nl internal volume Operation mode (iii)	Detection during glucose tolerance tests on volunteers
	Glucose oxidase	LR: up to 30 mM Operation mode (i)	Determination of glucose in whole blood
Lactate	Lactate oxidase	Dual electrode system Operation mode (i)	Detection in human saliva
	Lactate oxidase	LR: 0.2–10 mM Operation mode (iii)	Simultaneous detection of glucose and lactate in rat brain and in human control serum
Cholesterol	Cholesterol oxidase	RT: 30 s LR: 0.5–15 mM DL: 120 μM Operation mode (i)	Measurements in serum samples from hospitalised patients
Urea	Urease	LR: up to 350 μM DL: 3 μM More than 3 months stability Operation mode (i)	Measurements in fresh blood and urine from healthy persons
	Urea amidolyase	LR: up to 350 μM DL: 5 μM RT: 30 s Operation mode (i)	Measurements in serum and urine samples
L-Glutamate	Glutamate oxidase	DL: 0.5 μM Multisite detection Operation mode (ii)	Glutamate release and uptake in rat prefrontal cortex
	Glutamate oxidase	DL: 6.4 nM Operation mode (iii)	Monitoring release from cultured rat nerve cells
Choline	Choline oxidase	LR: up to 200 μM DL: 0.4 μM Multisite detection Operation mode (ii)	Measurements in rat brain
Creatinine	Creatinine amidohydrolase	LR: up to 2 mM RT: 1.0 min DL: 10–20 μM Operation mode (i)	Measurements in control and hospital human serum samples
	Creatinine amidohydrolase	LR: 0.01–1.7 mg/dl Operation mode (i)	Measurements in effluent dialysate during haemodialysis treatment
Ethanol	Alcohol oxidase	RT: 1–2 min Operation mode (i)	Detection in human saliva
	Alcohol dehydrogenase	RT: 5 s More than 35 days stability Operation mode (i)	Detection in human breath
Oxalate	Oxalate oxidase	LR: 0.01–0.1 mM DL: 0.09 mmol/L Tissue homogenate based	Determinations in urine

LR: linear range; DL: detection limit; RT: response time.

Tabella 1. Alcuni biosensori enzimatici per uso biomedico e le loro caratteristiche. [4]

alcuni anche all'interno del range del μM . (4)

Per quanto concerne l'industria alimentare, nei reparti di controllo qualità è comune l'utilizzo di tecniche spettroscopiche e cromatografiche, che come descritte in precedenza, non sono le più efficienti dal punto di vista dei costi e tempi di analisi. Inoltre, per i patogeni che non sono rilevabili da parte di questi strumenti analitici si deve procedere con i classici metodi di coltura che aumentano ulteriormente i costi e tempi di analisi.

I biosensori sono l'alternativa per eccellenza per la loro selettività, bassi costi e bassi tempi di risposta e possono essere integrati in sistemi automatizzati ma anche in semplici apparecchiature portatili. (10)

In letteratura vi sono esempi di biosensori, a base di aptamero¹, specifici per patogeni come la Salmonella² (LOD³ = 3 cfu/mL⁴) o l'Ocratossina A⁵ (LOD = 0.15 ng/mL). (11) (12)

Un altro vantaggio dei biosensori (e dei sensori in generale) è la possibilità di fare analisi "on-site" nelle zone di interesse ambientale. Questo permette il monitoraggio degli inquinanti senza il prelievo dei campioni e il suo trasporto in laboratorio con la riduzione dei costi e tempi di analisi, nonché abbattendo il rischio di danneggiare il campione durante le fasi di campionamento.

In tabella 2 sono riportati alcuni esempi di analisi di inquinanti ambientali assieme al metodo di rilevamento e lo specifico ricettore.

Analyte	Recognition	Recognition Element	Detection Method
Uranium	Preconcentration	Nafion	Voltammetry
Peroxides	Biocatalysis	Peroxidase	Amperometry
Pesticides	Enzyme inhibition	Acetylcholinesterase choline oxidase	Amperometry
Hydrazines	Electrocatalysis	Ruthenium catalyst	Amperometry
Lead	Ion recognition	Macrocyclic ionophore	Potentiometry
Mercury	Preconcentration	Crown ether	Voltammetry
Nickel	Preconcentration	Dimethylglyoxine	Voltammetry
Cyanide	Enzyme inhibition	Tyrosinase	Amperometry
Nitrite	Preconcentration	Aliquat 336 ion exchanger	Voltammetry
Nitrosamines	Electrocatalysis	Ruthenium catalyst	Amperometry
Phenol	Biocatalysis	Tyrosinase	Amperometry
Sulfite	Biocatalysis	Sulfite oxidase	Amperometry
Benzene	Modulated-microbial activity	Whole-cell	Amperometry

Tabella 2. Alcune analisi degli inquinanti attraverso i sensori e le loro caratteristiche. [1]

¹ Acidi nucleici aventi la capacità di legarsi ad una proteina

² Batteri parassitarie che causano malattie intestinali nell'uomo

³ Limit of detection

⁴ Numero di batteri presenti in 1 mL di coltura

⁵ Una micotossina presente nella frutta secca, caffè, cereali e possiede attività nefrotossica

Nanosensori

L'introduzione delle nanotecnologie nella costruzione dei biosensori elettrochimici è una svolta per le tecniche elettrochimiche dovuto all'amplificazione del segnale analitico ottenendo anche limiti di rilevabilità del aM⁶. Pertanto, una delle possibili applicazioni dei nanosensori è il rilevamento dei microRNA correlati al cancro, permettendo la diagnosi e anche la prognosi alle prime fasi della malattia. (13)

I nanosensori sono una classe di sensori, i quali sfruttano interazioni chimico-fisiche all'interno della nanoscala per rilevare la presenza e/o la concentrazione degli analiti.

Le particelle all'interno del regime della nanoscala hanno almeno una delle tre dimensioni minori di 100nm e presentano proprietà chimico-fisiche differenti dalla fase massiccia. (14)

Una delle proprietà essenziali delle nanotecnologie nell'applicazione dei nanosensori è l'aumento dell'area superficiale specifica⁷ al diminuire delle dimensioni delle particelle, incrementando l'attività catalitica dell'elettrodo e il numero di biomolecole immobilizzate sulla superficie elettrodica. Inoltre, i nanomateriali conduttivi presentano ottime qualità come trasduttori grazie all'alta conducibilità elettrica e velocità di trasferimento elettronico. Perciò, vi è un innalzamento generale della performance del biosensore nanostrutturato.

Tra i biosensori presenti in letteratura quelli costruiti a partire dai nanocompositi hanno una maggiore incremento di sensibilità, selettività, e ripetibilità. I nanocompositi sono materiali multifase solidi costituiti da una o più specie chimiche, aventi le dimensioni della nanoscala, inglobate all'interno di una matrice inerte. (1)

In letteratura si hanno vari esempi di nanocompositi dati dalle diverse combinazioni di nanotecnologie come nanopolimeri conduttivi, nanofibre, grafene, nanotubo di carbonio, nanostrutture metallorganiche, nanoparticelle metalliche e quantum dots⁸. (15) (16) (17)

eATRP

"Electrochemically mediated atom transfer radical polymerization" (eATRP) è una tipologia di reazione radicalica reversibilmente disattivabile che è attuabile attraverso un controllo elettrochimico di una reazione redox. Tale processo può essere finalizzata per la sintesi di polimeri a basso MWD⁹ utili nella produzione di sensori elettrochimici. (18) (19)

Nella scienza dei polimeri la MWD misura la distribuzione della massa molare in un campione di polimeri ed è calcolabile come il rapporto tra il peso molecolare medio ponderale M_w e il peso molecolare medio numerico M_n .

Dal momento che i polimeri sintetizzati hanno lunghezze di catena disomogenee si utilizzano metodi statistici per descriverli qualitativamente. M_w e M_n sono per l'appunto una media ottenuta da due metodi statistici differenti e sono definiti come:

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad \{1\}$$
$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad \{2\}$$

ove N_i è il numero di catene aventi la massa M_i .

Dalle formule $\{1\}$ e $\{2\}$ si affermano che M_n è più sensibile con le molecole aventi una massa molecolare piccola e M_w è più sensibile con le molecole aventi una massa molecolare grande. Poiché $M_w > M_n$, MWD è sempre maggiore o uguale a 1. (20)

Il processo dell'eATRP è raffigurato in Figura 2 che descrive una reazione controllata da un

⁶ $10^{-18} M$

⁷ Rapporto tra l'area superficiale e la massa della particella

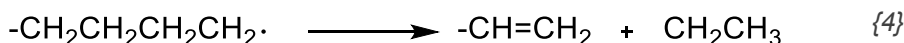
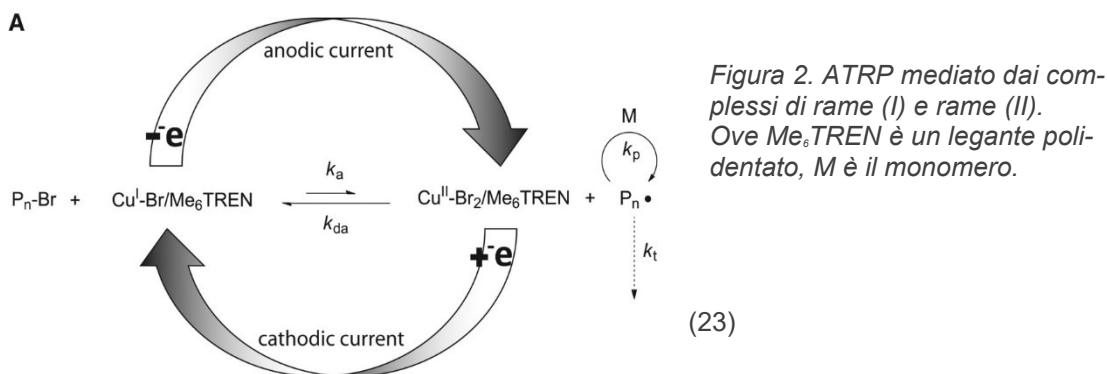
⁸ Nanoparticelle dei semiconduttori

⁹ Dispersione della massa molare

equilibrio, definito da K_{ATRP} , tra la specie dormiente ad alta concentrazione P_n-Br^{10} e la specie radicalica attiva a bassa concentrazione $P_n\cdot$. Tale reazione è mediata dai complessi di Cu(I) e Cu(II) le quali concentrazioni regolate mediante il potenziale elettrico applicato. Lo stadio di iniziazione dell'ATRP generico consiste nella rottura del legame P_n-Br in un radicale libero $P_n\cdot$, con la conseguente ossidazione del centro metallico Cu (I) a Cu (II). Questo processo è reversibile dal momento che è una reazione di equilibrio con le reazioni diretta e inversa sono caratterizzate dalle costanti cinetiche k_a e k_{da} . Perciò, la catena in crescita viene attivata e disattivata in intermittenza limitando la libera propagazione e aumentando il controllo del MWD.

Nello stadio di propagazione il radicale libero reagisce con il monomero con una costante di propagazione k_p e alla concentrazione del monomero $[M]$.

Infine, lo stadio di terminazione è dato dalla reazione di coupling {3} o di dismutazione {4}. Tuttavia, in condizioni ben controllate solo una piccola percentuale di radicali liberi subisce terminazione. (19) (21) (22)



Dalle considerazioni cinetiche fatte in precedenza si può ricavare l'equazione {5} che esprime la velocità dell'intero processo ATRP, R_p , con k_p , e le concentrazioni del monomero M e del radicale libero $P_n\cdot$.

Inoltre $[P_n\cdot]$ è esprimibile con $K_{ATRP} = k_a / k_{da}$ e le concentrazioni della specie dormiente P_nBr e dei complessi attivatore $Cu^I L$ e disattivatore $XCu^{II} L$. (19) (22)

$$R_p = k_p [M] [P_n\cdot] = k_p K_{ATRP} \frac{[P_n Br] [Cu^I L] [M]}{[XCu^{II} L]} \quad \{5\}$$

Generalmente i processi ATRP mediati da complessi di rame dipendono dalle condizioni di reazione come la temperatura, la pressione e il tipo di solvente. (24) (25)

Inoltre, è notevolmente influente la natura chimica del radicale libero, della specie dormiente, del catalizzatore e del monomero nonché le loro rispettive concentrazioni vedi eq. {5}.

Nello specifico per i complessi di rame il tipo di legante gioca un ruolo importante nell'equilibrio ATRP. Se il legante è elettron-donatore forte, può stabilizzare la forma più ossidata del centro metallico spostando l'equilibrio verso i prodotti con l'aumento della K_{ATRP} , della $[P_n\cdot]$ e di conseguenza la velocità di reazione dell'intero processo aumenta. (26)

Uno dei principali svantaggi dei primi processi ATRP è la necessità di una concentrazione

¹⁰ Tipicamente può essere anche un cloruro

elevata di attivatore, con la conseguente presenza di residui metallici non trascurabili nel prodotto finale. (21) Per scongiurare questo problema sono stati sviluppati dei metodi per rigenerare la specie attivatore in modo tale da diminuire la concentrazione necessaria dei complessi di rame. Tra questi metodi vi è eATRP che sfrutta una corrente catodica per convertire sulla superficie di un elettrodo $\text{XCu}^{\text{II}}\text{L}$ a $\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}$. Quest'ultimo va successivamente riattivare la specie dormiente. (19) La peculiarità di questo processo è data dalla possibilità di fermare o (re)iniziare la propagazione radicalica attraverso la modulazione della differenza di potenziale elettrico applicato; infatti, il rapporto desiderato tra $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}]$ e $[\text{XCu}^{\text{II}}\text{L}]$ può essere impostato garantendo un maggiore livello di controllo durante la polimerizzazione. (19)

SI-ATRP

Note generali

Una variante della ATRP generica è la "Surface-initiated atom transfer radical polymerization" (SI-ATRP) che coinvolge in primis il trapianto dell'iniziatore sulla superficie elettrodica, seguito dallo sviluppo di catene polimeriche attraverso processi radicalici a trasferimento d'atomo mediati dai complessi di rame.

Come nella ATRP è possibile rigenerare l'attivatore attraverso processi elettrochimici in modo da utilizzare una bassa concentrazione del complesso metallico nella reazione.

In letteratura vi sono vari metodi di ancoraggio dell'iniziatore come electrografting e self-assembly in modo da sintetizzare elettrodi funzionalizzati utili nella catalisi e nell'immagazzinamento dell'energia, oltre nella sintesi dei (bio)sensori per SI-ATRP. (27)

In questo elaborato si vanno ad analizzare due metodi per la preparazione di sensori elettrochimici ultrasensibili su una superficie elettrodica funzionalizzata: imprinting molecolare e immobilizzazione di polimeri contenenti gruppi elettroattivi.

Electrografting

Il processo dell'electrografting viene caratterizzato da una reazione elettrochimica che ha il fine di coprire la superficie di un substrato solido e conduttivo con molecole organiche. Come per tutti i processi elettrochimici anche nell'electrografting vi è un trasferimento di elettroni e in questo caso il substrato è collegato a un generatore di potenziale che alimenta un flusso di corrente sul substrato stesso.

Da questo metodo di coating le molecole organiche vengono chimicamente adsorbite, ovvero legate con legami covalenti, sulla superficie elettrodica. (28)

Una variante dell'electrografting, quella riduttiva, è interessante per la sintesi di iniziatori della SI-ATRP. Tale processo coinvolge la riduzione di specie organiche, come i composti vinilici e i sali di diazonio, generando un legame covalente sul substrato. (29)

Il meccanismo del processo con i composti vinilici è riportato in figura 3 ed è suddivisibile in 4 steps:

1. Il composto vinilico viene adsorbito sulla superficie elettrodica.
2. Avviene un trasferimento elettronico dall'elettrodo al carbonio sp^2 generando un radicale anione che forma un legame covalente M-C. Il sistema risultante è equivalente a quello del primo stadio di iniziazione di una polimerizzazione anionica.
3. La vicinanza tra il carbanione e la superficie destabilizza il sistema dal momento che sono entrambi elettronegativi. Ma, è possibile allontanare le due cariche negative facendo propagare la polimerizzazione con l'aggiunta di monomeri vinilici.

4. Infine, con l'aggiunta di un acido il carbanione viene protonato terminando così la polimerizzazione anionica.

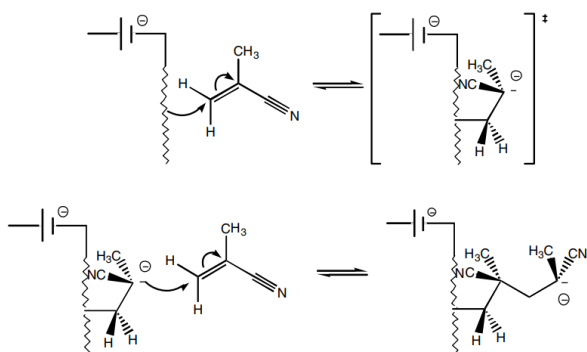


Figura 3. Meccanismo dell'electrografting riduttivo dei composti vinilici con polimerizzazione anionica sulla superficie elettrodica in un ambiente organico. (29)

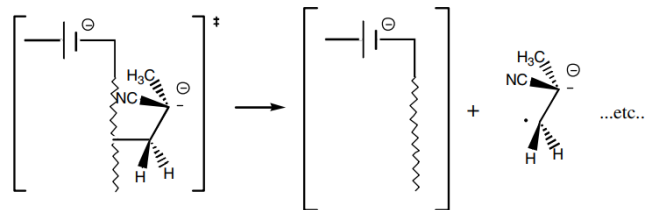


Figura 4. Meccanismo dell'electrografting riduttivo dei composti vinilici con polimerizzazione anionica sulla superficie elettrodica in un ambiente acquoso. (29)

Il solvente di questo processo è organico e generalmente viene utilizzato l'acetonitrile o il dimetilformammide; invece, in un mezzo acquoso la polimerizzazione anionica avviene nella soluzione e non sulla superficie elettrodica, come illustrato in figura 4. Perciò, l'electrografting viene fatta in dry box, in ambiente anidro nonché priva di ossigeno. (29)

In questo processo è possibile utilizzare una vasta gamma di monomeri come gli acrilati, acrilati nitrilici e metacrilati. Notevole è l'electrografting del (2-cloropropionato)etilacrilato, il quale prodotto può essere utilizzato come iniziatore della SI-ATRP.

L'electrografting riduttiva può essere implementata sulla superficie di vari materiali ossidabili, come Fe, Cu, Ni, Au, Pt, carbonio, etc. Questo garantisce la possibilità di costruire iniziatori con diverse combinazioni di substrato e monomero organico. (28)

In precedenza, si è discusso della impossibilità di eseguire l'electrografting riduttiva in ambiente acquoso e in presenza di ossigeno, ma è possibile bypassare questo problema attraverso l'ancoraggio, mediante una corrente catodica, del 4-nitrobenzodiazonio coprendo la superficie elettrodica con uno strato di poly(4-nitrofenilene). In presenza di composti vinilici le catene si propagano dagli anelli aromatici generando un secondo strato polimerico; il meccanismo di tale metodo è illustrato in figura 5. (30)

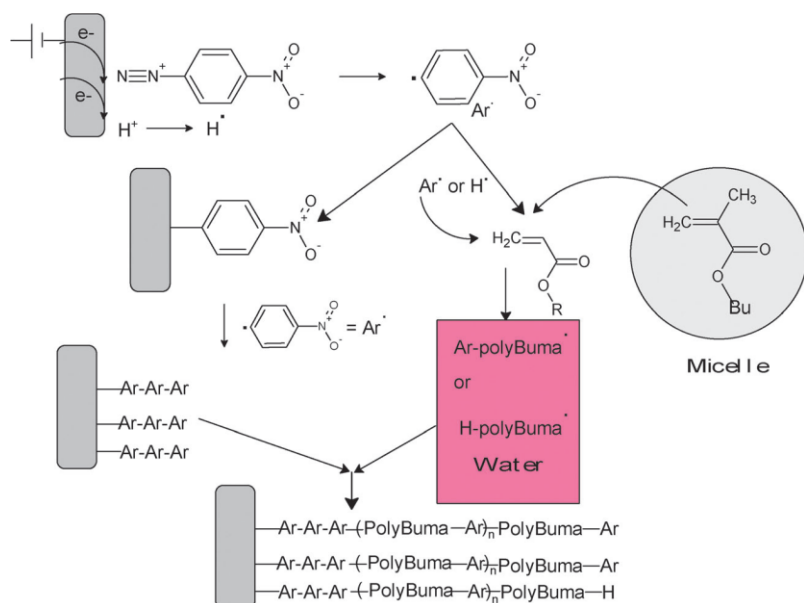


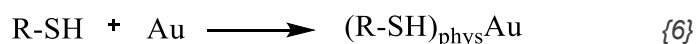
Figura 5. Meccanismo dell'electrografting riduttivo di una emulsione in acqua di 4-nitrobenzodiazonio e metacrilato di butile. (28)

Self-assembled monolayers

Generalmente col termine self-assembled monolayers (SEMs) si intende una struttura complessa avente un substrato solido su cui vengono adsorbiti delle molecole anfifiliche costituite, come raffigurato in figura 6, da tre parti: la testa affine al substrato, la catena idrocarburica e la coda contenente un gruppo funzionale terminale. (31)

Tra i SEMs più promettenti nella letteratura si hanno tioli o ditioli, come gruppo di testa, adsorbiti sulla superficie di oro. La loro particolarità è dovuta al loro semplice metodo di sintesi, in soluzione organica o in fase gassosa, nonché la loro alta stabilità grazie al legame covalente S-Au. Il processo di self-assembly dei tioli sull'oro è descritto in figura 7 e lo si può dividere in quattro steps:

1. Adsorbimento fisico, attraverso forze di VDW¹¹, della molecola anfifilica sulla superficie metallica.



2. Si rompe il legame S-H con la formazione del legame covalente S-Au (adsorbimento chimico) e idrogeno.



3. Inizio della formazione dello strato idrocarburico attraverso la configurazione "standing-up" delle molecole anfifiliche
4. Si genera una struttura cristallina e ordinata con le molecole in una configurazione closed-packed. In questa disposizione spaziale, le catene idrocarburiche si attraggono per le forze di VDW con la conseguente stabilizzazione della SEM. (32)

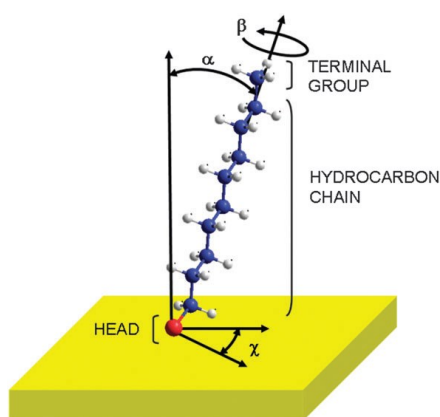


Figura 6. Schema di una molecola anfifilica adsorbita sulla superficie metallica in configurazione "standing up". (31)

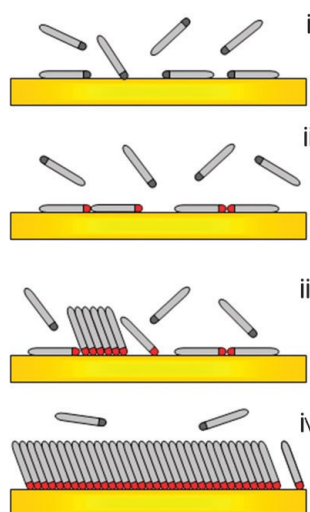


Figura 7. Schema del processo di self-assembled monolayer di molecole anfifiliche sulla superficie di Au. (31)

In base al gruppo funzionale terminale le SEMs possono avere diverse proprietà chimico-fisiche; questo è interessante in particolare per la sintesi di iniziatori della SI-ATRP. In figura 8 viene illustrata la sintesi a stadi di un sensore elettrochimico, per la rilevazione degli ioni piombo (II), mediante la SI-eATRP di una catena di poli-acrilammide iniziata dalla superficie di oro. Tale superficie è stata precedentemente ricoperta da uno strato di iniziatore che è stato ottenuto dalla reazione di esterificazione tra il bromuro di α -bromoisobutile e il 4-idrossifenolo in presenza di trietilammina.

¹¹ Van Der Waals

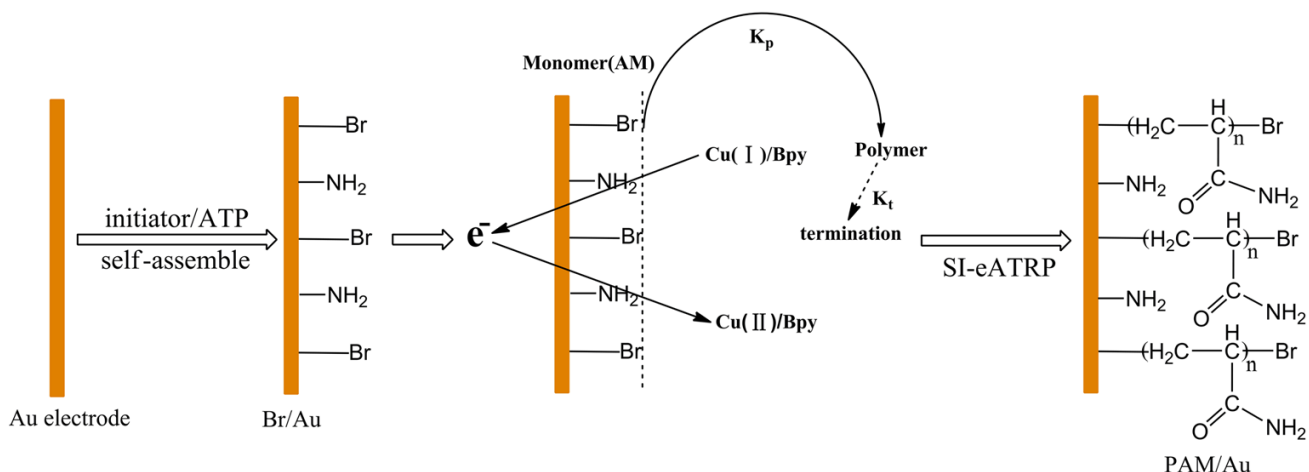


Figura 8. Schema di sintesi del polyacrilammide (PAM) via SI-eATRP iniziata sulla superficie di Au. (33)

Molecularly-imprinted polymers

Uno dei più recenti metodi per la sintesi di elettrodi ultrasensibili è la molecularly-imprinted polymers (MIPs) sviluppato dal gruppo di ricerca di Sun.

Attraverso questo processo di sintesi vengono costruiti dei (bio)sensori aventi dei recettori in grado di riconoscere e legare specificamente le molecole bersaglio.

L'elettrodo modificato con MIP viene preparato mediante SI-ATRP (spesso SI-eATRP) con monomeri funzionalizzati come gli acrilati, i metacrilati e le acrilammidi; inoltre, è necessario un monomero capace di fare cross-linking e la presenza della (bio)molecola target come template.

Successivamente questi templates vengono rimossi in modo da creare delle "impronte" che sono chimicamente e spazialmente complementari, nella rete polimerica, in grado di ricombinare le (bio)molecole ricercate.

Inoltre, per amplificare il segnale analitico e abbassare il LOD i MIPs vengono costruiti su materiale nanostrutturato che, come descritto nel paragrafo "nanosensori", hanno un'area superficiale specifica elevata e proprietà chimico-fisiche rilevanti.

Le misure analitiche vengono comunemente effettuate attraverso la voltammetria prima e dopo la ricombinazione tra il polimero e la molecola bersaglio. Come di consueto nella chimica analitica strumentale, per la determinazione del titolo incognito di una soluzione contenente l'analita si costruisce una retta di taratura linearizzando la concentrazione dell'analita rispetto al segnale analiticamente utile. Inoltre, sono stati riportati valori di LOD nel range di 10^{-8} mg/L ÷ 10^{-14} mg/L per diversi elettrodi modificati con MIPs e i relativi target biomolecolari. (27)

A titolo di esempio si riporta un biosensore costruito con la tecnologia degli elettrodi ultrasensibili con MIPs: una polimerizzazione, iniziata sulla superficie elettrodica a base di Au/FG¹²/nAu, di 2-(metilsulfonil)etilacrilato (MSEA) con l'impronta della mioglobina.

Il monomero è stato ottenuto, come raffigurato in figura 9, da una esterificazione di acido acrilico e β -mercaptoetanololo in diclorometano (DCM); successivamente il gruppo tiolo viene ossidato con perossido di idrogeno. (34)

L'iniziatore è 11-mercaptoundecil-2-bromo-2-metilpropanoato (MBM) che viene sintetizzato a partire dai reagenti 11-mercaptoundecanololo e bromuro di bromoisobutile attraverso la reazione di esterificazione schematizzata in figura 10. (34) (35)

Le fondamenta di questo biosensore sono costituite da un elettrodo di Au sulla quale viene

¹² Foam-Graphene

depositato grafene schiumoso, caratterizzato da un'alta porosità ed elevatissima conducibilità elettrica e termica. Sul sistema Au/FG vengono elettrodepositate, da una soluzione diluita di acido cloroaurico (HAuCl_6), nanoparticelle di Au che possiedono rilevanti proprietà chimico-fisiche, alta area superficiale specifica e stabilità in un ampio range di temperature. Come raffigurato in figura 11 sull'elettrodo Au/FG/nAu viene immobilizzato l'iniziatore, MBM, attraverso il legame S-nAu e con la conseguente formazione di una SEM. Successivamente, l'elettrodo viene inserito in una cella elettrolitica contenente il monomero MSEA (0.01 M), il template molecolare (Mb^{13} , 0.2 mg/mL), l'agente legante (MBA^{14} , 0.015 M) e attraverso un sistema a tre elettrodi viene avviata la SI-ATRP sulla superficie dell'elettrodo Au/FG/nAu. Durante tale processo, il Fe (III) complessato dalla Mb viene ridotto a Fe (II) che reagisce con l'iniziatore per generare il radicale propagante. Infine, il template viene rimosso immergendo l'elettrodo Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} in una soluzione di acido ossalico (0.5 M).

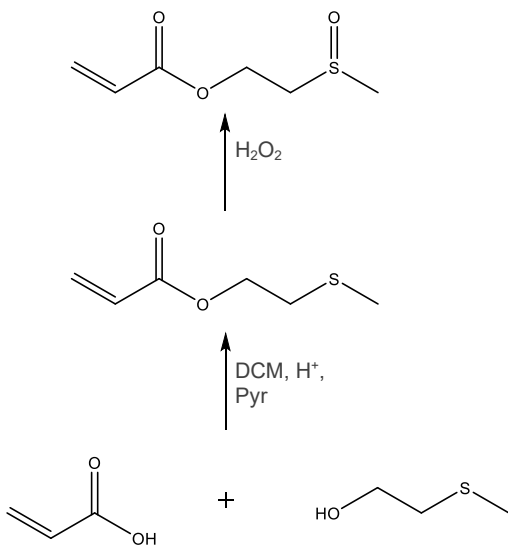


Figura 9. Schema della sintesi del 2-(metilsulfonil)etilacrilato. Chemdraw. Rif. (34)

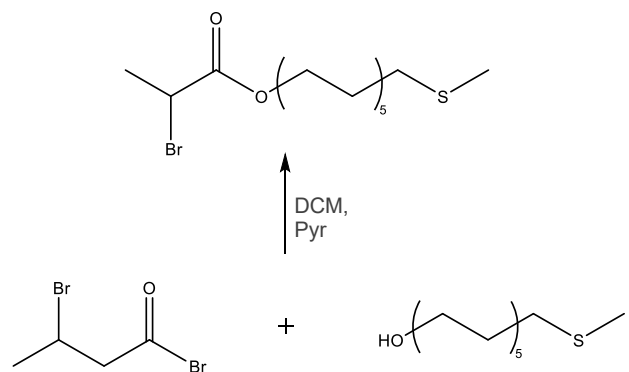


Figura 10. Schema della sintesi del 11-mercaptoundecil-2-bromo-2-metilpropanoato. Chemdraw. Rif. (35)

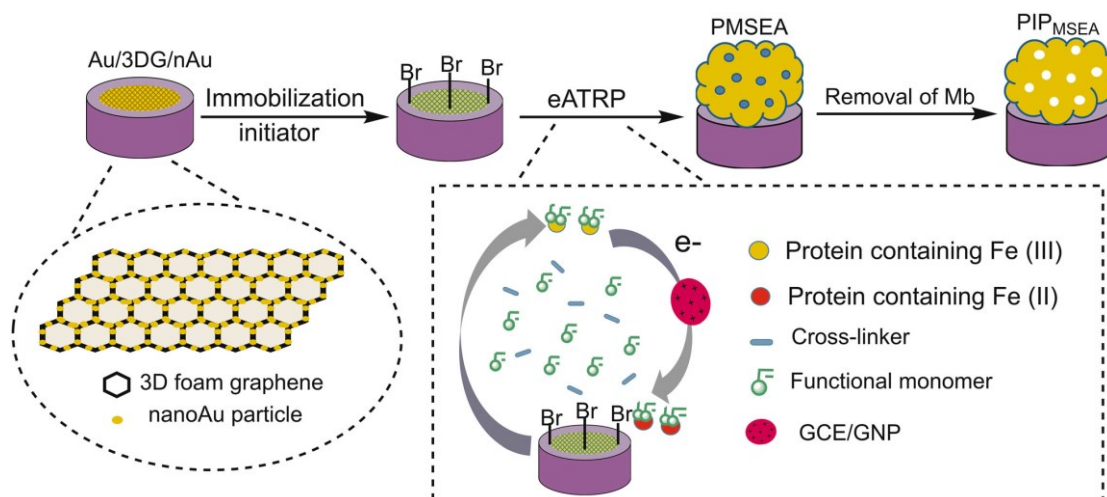


Figura 11. Schema di sintesi dell'elettrodo Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} (34)

¹³ Mioglobina

¹⁴ N,N'-metilenebisacrilammide

L'elettrodo sintetizzato è stato utilizzato, come elettrodo di lavoro, nella misura dell'intensità di corrente delle soluzioni di mioglobina a diverse concentrazioni col metodo di voltammetria a impulsi differenziali (DPV) per mezzo di un redox probe, la coppia $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. L'intensità misurata è data dalla corrente catodica della riduzione del Fe (III) a Fe (II) all'interno dei vuoti creati dal template e in presenza della mioglobina il probe redox viene sostituito portando a una diminuzione del segnale elettrico. In figura 12a, sono riportati le curve DPV a diverse concentrazioni di mioglobina.

Successivamente in figura 12b, viene plottato la retta di taratura che riporta la differenza di intensità di corrente $\Delta I = I_0 - I_c$, dove I_0 è la corrente misurata in assenza della mioglobina, in funzione del logaritmo della concentrazione della mioglobina, $\lg C$. Infine, l'elettrodo Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} ottenuto dal gruppo di ricerca di Sun è caratterizzato da un intervallo di linearità nel range di $10^{-1} \text{ M} \div 10^{-12} \text{ M}$ e il LOD di $1.21 \cdot 10^{-13} \text{ M}$.

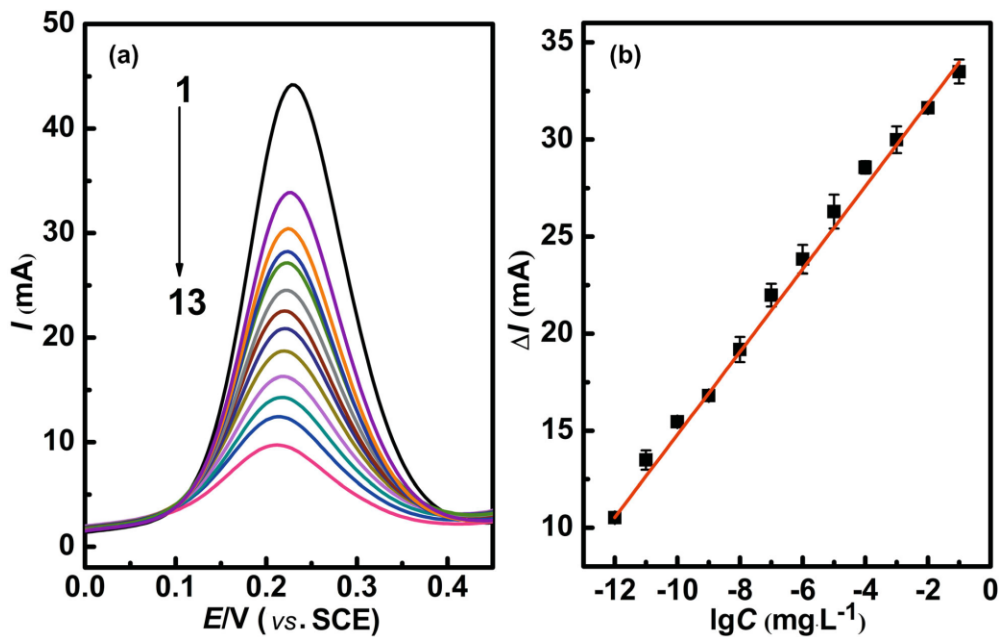


Figura 12. (a) Plot delle curve DPV col probe $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ di soluzioni di mioglobina a diversa concentrazione: da 1 a 13 rispettivamente $0, 10^{-12} \text{ M}, 10^{-11} \text{ M}, 10^{-10} \text{ M}, 10^{-9} \text{ M}, 10^{-8} \text{ M}, 10^{-7} \text{ M}, 10^{-6} \text{ M}, 10^{-5} \text{ M}, 10^{-4} \text{ M}, 10^{-3} \text{ M}, 10^{-2} \text{ M}, 10^{-1} \text{ M}$. (b) Plot retta di calibrazione dell'elettrodo di misura Au/FG/nAu/MIP_{MSEA}. (34)

Per il test di selettività degli elettrodi Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} e Au/FG/nAu/NIP_{MSEA}¹⁵, essi sono stati usati per misurare il segnale analitico di quattro distinti interferenti biologici aventi la medesima concentrazione della soluzione di Mb. In figura 13, vengono riportati i picchi di intensità misurati col metodo DPV e si può confermare l'alta selettività dell'elettrodo a base MIP nei confronti della biomolecola bersaglio, surclassando a livello performativo quello a base NIP. Per il test di ripetibilità una soluzione di Mb è stata misurata dall'elettrodo a MIP per tre volte dando un accettabile valore di RSD¹⁶ (2.88%); invece per il test di riproducibilità, misure fatte con tre elettrodi a MIP costruiti indipendentemente hanno dato nuovamente un RSD accettabile (3.10%). Anche il test di durabilità risulta positivo, infatti un elettrodo a MIP è stato conservato a 4 °C per 5 giorni e il segnale analitico è diminuito del 1.2%. Infine, è stato eseguito un test sul siero bovino col metodo delle aggiunte standard e l'RSD ottenuto è minore del 5% indicando che l'elettrodo Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} è utilizzabile nei campioni biologici. (34)

¹⁵ Non-imprinted polymers-modified MSEA

¹⁶ Relative standard deviations

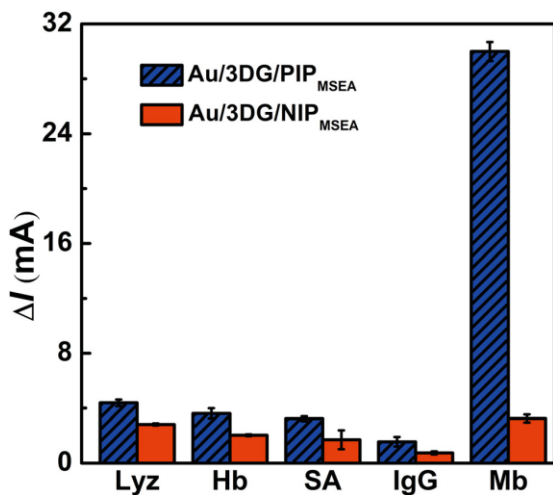


Figura 13. Comparazione dei valori di ΔI di diverse specie biologiche. Le misure sono state effettuate col metodo DPV dagli elettrodi Au/FG/nAu/MIP_{MSEA} e Au/FG/nAu/NIP_{MSEA}.

Immobilizzazione di polimeri contenenti gruppi elettroattivi

Un altro approccio nella sintesi di elettrodi ultrasensibili consiste nella modificazione della superficie elettrodica con una specie affine alla biomolecola bersaglio. Quest'ultima contiene siti attivi per la formazione di cross-link con un iniziatore ATRP. Il metodo è centralizzato sulla possibilità di modificare la biomolecola con polimeri aventi dei centri redox, ad esempio il ferrocene. Tale rete polimerica, chimicamente legata all'analita, è il principale responsabile per l'amplificazione del segnale analitico e della sensibilità del biosensore. (27)

Si propone un esempio in letteratura su un aptasensore elettrochimico destinato per la diagnosi del tumore al fegato. Il marcatore tumorale, nonché biomolecola target, è l'alfafetoproteina (AFP) che essendo una glicoproteina contiene dei gruppi -OH, nei siti cis-diidrossi, capaci di fare cross-linking attraverso la reazione di esterificazione con l'iniziatore acido (4-(2-bromo-2-fenilacetilammino)fenile)boronico (BrPBA).

Alla base del sensore vi è l'elettrodo di Au che è incubata in una soluzione di aptamero (APT) con la formazione del legame Au-S tra il metallo e l'estremità 5' dell'aptamero stesso; successivamente, per bloccare i siti liberi sulla superficie metallica si aggiunge il 6-mercaptoesanolo con la formazione di una SEM.

L'aptamero, per la sua mancanza di siti cis-diidrossi, non interferisce nel cross-linking tra il biomarcatore e l'iniziatore; pertanto, eseguendo l'eATRP del ferrocenilmetilmetacrilato (FcMMA) sul sistema Au/Apt/MCH/AFP/BrPBA nascono centinaia su centinaia di centri redox da ogni sito cis-diidrossi, precedentemente esterificato con l'iniziatore, della AFP. (36)

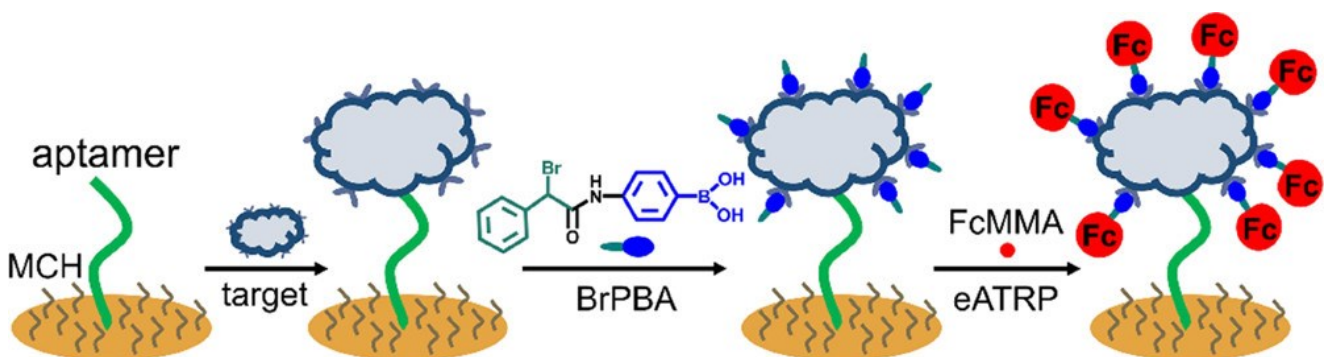


Figura 14. Schema di sintesi dell'elettrodo Au/Apt/MCH/AFP/BrPBA/Fc. (36)

Per verificare le performance analitiche sono state eseguite delle misure, col metodo voltammetrico a onda quadra (SWV), utilizzando gli aptasensori costruiti a partire da soluzioni di AFP a diverse concentrazioni (0.001 ng/mL ÷ 5.0 ng/mL). In figura 15, si osserva che con l'aumentare della concentrazione di AFP vi è un aumento del segnale analitico; inoltre, dalla retta di calibrazione si ricava un intervallo di linearità nel range 10 pg/mL ÷ 1.0 ng/mL mentre il LOD calcolato è di 0.32 pg/mL.

Si valuta la selettività dell'aptasensore misurando il segnale analitico di sei diversi interferenti biologici aventi una concentrazione 10 volte maggiore rispetto alla biomolecola target; in figura 16, è chiaro che l'intensità misurata dell'AFP sia prevalente rispetto a quella delle molecole interferenti, i quali picchi di intensità sono equiparabili a quello del bianco.

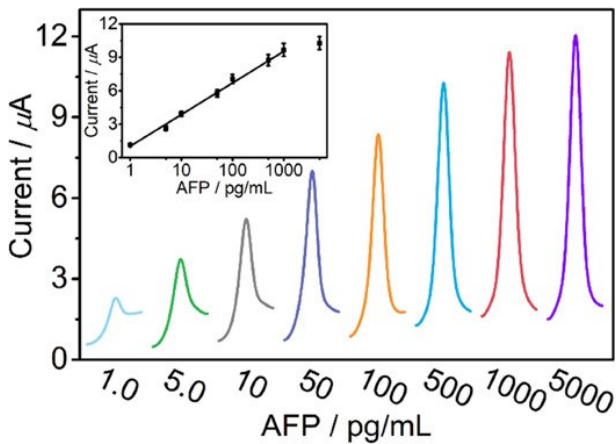


Figura 15. Curve SWV per diverse concentrazioni di AFP e retta di taratura. (36)

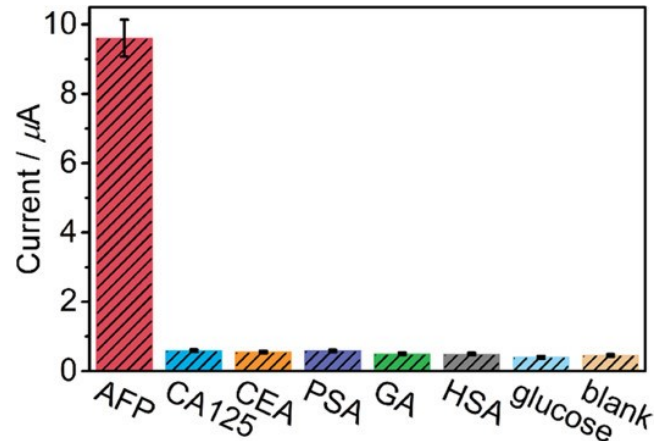


Figura 16. Confronto tra i picchi di intensità misurati per l'AFP, i sei diversi interferenti e il bianco. (36)

Infine, è stato eseguito un test di AFP sul siero umano misurandolo sia con l'aptasensore che con il metodo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in modo tale da comparare le due tecniche analitiche. I campioni sono stati preparati mescolando del siero umano, precedentemente filtrato, con una soluzione tampone di $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.4) ottenendo soluzioni in un rapporto su volume 1:19 (5%) e 1:9 (10%). In tabella 3 vengono riportati i risultati dei test e si può affermare che le misure con l'aptasensore sono accettabili rispetto al metodo ELISA e che non vi è presente una significativa interferenza da matrice.

sample	added (pg/mL)		ELISA (pg/mL)	this aptasensor	
				found (pg/mL)	RSD
1	5%	1000	971	965	5.4%
	10%	1000	964	959	5.6%
2	5%	100	105	104	5.6%
	10%	100	104.4	103.2	5.7%
3	5%	10	11.3	10.5	5.9%
	10%	10	12.2	10.7	6.1%

Tabella 3. Misure dei campioni biologici col metodo ELISA e con l'aptasensore sintetizzato. (36)

Conclusione

Al fine di garantire una migliore qualità della vita è necessario rendere più accessibili i test di prevenzione e monitoraggio delle patologie cliniche come il diabete, i vari tipi di tumori, le infezioni virali, etc. I biosensori ultrasensibili sintetizzati tramite SI-eATRP, come dimostrato in questo elaborato, sono ben performanti dal punto di vista di sensibilità, selettività, riproducibilità, ripetibilità e stabilità; inoltre, il costo della materia prima per la loro produzione è molto ridotto dal momento che essi sono principalmente nanostrutturati. Pertanto, è necessario sviluppare processi industriali per la loro produzione di massa.

Infine, è auspicabile che la ricerca scientifica continui nello studio e sviluppo di metodi di modificazione della superficie elettrodica sfruttando l'elevata potenzialità che dispone l'(e)ATRP.

Bibliografia

- (1) **Baranwal, J; Barse, B; Gatto, G; Broncova, G; Kumar, A.** 10, 2022, *Chemosensors*, p. 363.
- (2) **Shetti, N. P; Nayak, D. S; Reddy, K. R; Aminabhvi, T. M.** Chapter 10 - Graphene–Clay-Based Hybrid Nanostructures for Electrochemical Sensors and Biosensors., *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*. Amsterdam, The Netherlands : Alagarsamy Pandikumar, Perumal Rameshkumar,, 2019, p. 235-274.
- (3) **Hulanicki, A; Glab, S; Ingman, F.** 63, 1991, *Pure Appl. Chem.*, pp. 1247–1250.
- (4) **Castillo, J; Gáspár, S; Leth, S; Niculescu, M; Mortari, A; Bontidean, I; Soukharev, V; Dorneanu, S. A; Ryabov, A. D; Csöregi, E.** 102, 2004, *Sens. Actuators B Chem*, p. 179–194.
- (5) **Chowdhury, A. D; Takemura, K; Li, T.-C; Suzuki, T; Park, E. Y.** 10, 2019, *Nat. Commun*, p. 3737.
- (6) **Ellington, A.D; Szostak, J.W.** 346, 1990, *Nature*, pp. 818–822.
- (7) **Lou, B; Liu, Y; Shi, M; Chen, J; Li, K; Tan, Y; Chen, L; Wu, Y; Wang, T; Liu, X.** 157, 2022, *TrAC Trends Anal. Chem*.
- (8) **Khunseeraksa, V; Kongkaew, S; Thavarungkul, P; Kanatharana, P; Limbut, W.** 187, 2020, *Microchim. Acta*, p. 591.
- (9) **Crulhas, B. P; Basso, C. R; Castro, G. R; Pedrosa, V. A.** 10, 047004, 2021, *ECS J. Solid State Sci. Technol*.
- (10) **Mishra, G; Barfidokht, A; Tehrani, F; Mishra, R.** 7, 2018, *Foods*, p. 141.
- (11) **Ma, X; Jiang, Y; Jia, F; Yu, Y; Chen, J; Wang, Z.** 98, 2014, *J. Microbiol. Methods*, p. 94–98.
- (12) **Mishra, R. K; Hayat, A; Catanante, G; Ocaña, C; Marty, J.-L.** 889, 2015, *Anal. Chim. Acta*, p. 106–112.
- (13) **Monteiro, T; Rodrigues, R. P; Gonçalves, A. L; Moura, J. J. G; Jubete, E; Añorga, L;** 142, 2015, *Talanta*, p. 246–251.
- (14) **Negahdary, M; Angnes, L.** 464, 214565, 2022, *Coord. Chem. Rev.*
- (15) **Vert, M; Doi, Y; Hellwich, K. H; Hess, M; Hodge, P; Kubisa, P; Rinaudo, M; Schué, F. O.** 84, 2012, *Pure and Applied Chemistry*, p. 377–410.
- (16) **Shrivastava, S; Jadon, N; Jain, R.** 82, 2016, *TrAC Trends Anal. Chem.*, p. 55–67.
- (17) **John, B.** *Polymer Nanocomposite-Based Electrochemical Sensors and Biosensors. Nanorods and Nanocomposites. s.l. : Morteza Sasani Ghamsari and Soumen Dhara, 2020.*
- (18) **Zhu, Q; Li, R; Sun, X; Zaijun, L.** 1219, 2022, *Analytica Chimica Acta*.
- (19) **Jenkins, A. D; Jones, R. G; Moad, G.** 82, 2010, *Pure and Applied Chemistry*, p. 483–491.

- (20) **Chmielarz, P; Fantin, M; Park, S; Isse, A. A; Gennaro, A; Magenau, A. J. D; Sobkowiak, A; Matyjaszewski, K.** 69, 2017, *Progress in Polymer Science*, p. 47-78.
- (21) **Gilbert, R. S; Hess, M; Jenkins, A. D; Jones, R. G; Kratochvil, P; Stepto, R. F. T.** 81, 2009, *Pure and Applied Chemistry*, p. 351–353.
- (22) **Matyjaszewski, K.** 52, 2012, *Isr J Chem*, p. 206–20.
- (23) **Krys, P; Ribelli, TG; Matyjaszewski, K; Gennaro, A.** 49, 2016, *Macromolecules*, p. 2467–76.
- (24) **Kwak, Y; Magenau, A. J. D; Matyjaszewski, K.** 43, 2011, *Macromolecules*, p. 9682–9.
- (25) **Kwiatkowski, P; Jurczak, J; Pietrasik, J; Jakubowski, W; Mueller, L; Matyjaszewski, K.** 41, 2008, *Macromolecules*, p. 1067–9.
- (26) **Horn, M; Matyjaszewski, K.** 46, 2013, *Macromolecules*, p. 3350–7.
- (27) **Magenau, A. J. D; Kwak, Y; Schröder, K; Matyjaszewski, K.** 1, 2012, *ACSMacro Lett*, p. 508–12.
- (28) **Fantin, M; Isse, A. A.** 40, 2023, *Curr. Opin. Electrochem.* 101313.
- (29) **Bélanger D., Pinson J.** 40, 2011, *Chem Soc Rev*, p. 3995–4048.
- (30) **Deniau, G; Azoulay, L; Jégou, P; Chevallier, G. L; Palacin, S.** 600, 2006, *Surface Science*, p. 675-684.
- (31) **Mévellec, V; Roussel, S; Tessier, L; Chancelon, J; Mayne-L’Hermite, M; Deniau, G; Viel, P; Palacin, S.** 19, 2007, *Chem. Mater*, p. 6323–6330.
- (32) **Vericat, C; Vela, M. E; Benitez, G; Carrob, P; Salvarezza, R. C.** 39, 2010, *Chem. Soc. Rev.*, p. 1805-1834.
- (33) **Poirier, G. E; Pylant, E. D.** 272, 1996, *Science*, pp. 1145–1148.
- (34) **Sun, Y; Du, H; Deng, Y; Lan, Y; Feng, C.** 20, 2016, *J. Solid State Electrochem* 2016, p. 105–113.
- (35) **Han, Z; Zhou, Y; Yang, Y; Sun, Y; Wang, Y; Wang, Y; Sun, Y.** 45, 2022, *Bulletin of Materials Science*.
- (36) **Jones, D. M; Brown, A. A; Huck, W. T. S.** 18, 2002, *Langmuir*, pp. 1265-1269.
- (37) **Hu, Q; Cao, X; Li, S; Liang, Y; Luo, Y; Feng, W; Han, D; Niu, L.** 94, 2022, *Anal. Chem.*, p. 13516–13521.