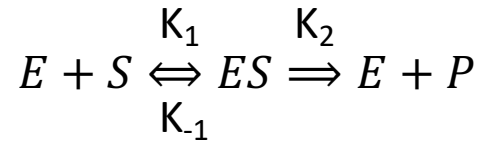


# Biosensori enzimatici

# Biosensori - enzimatici

Struttura generale di un biosensore catalitico.



E: enzima

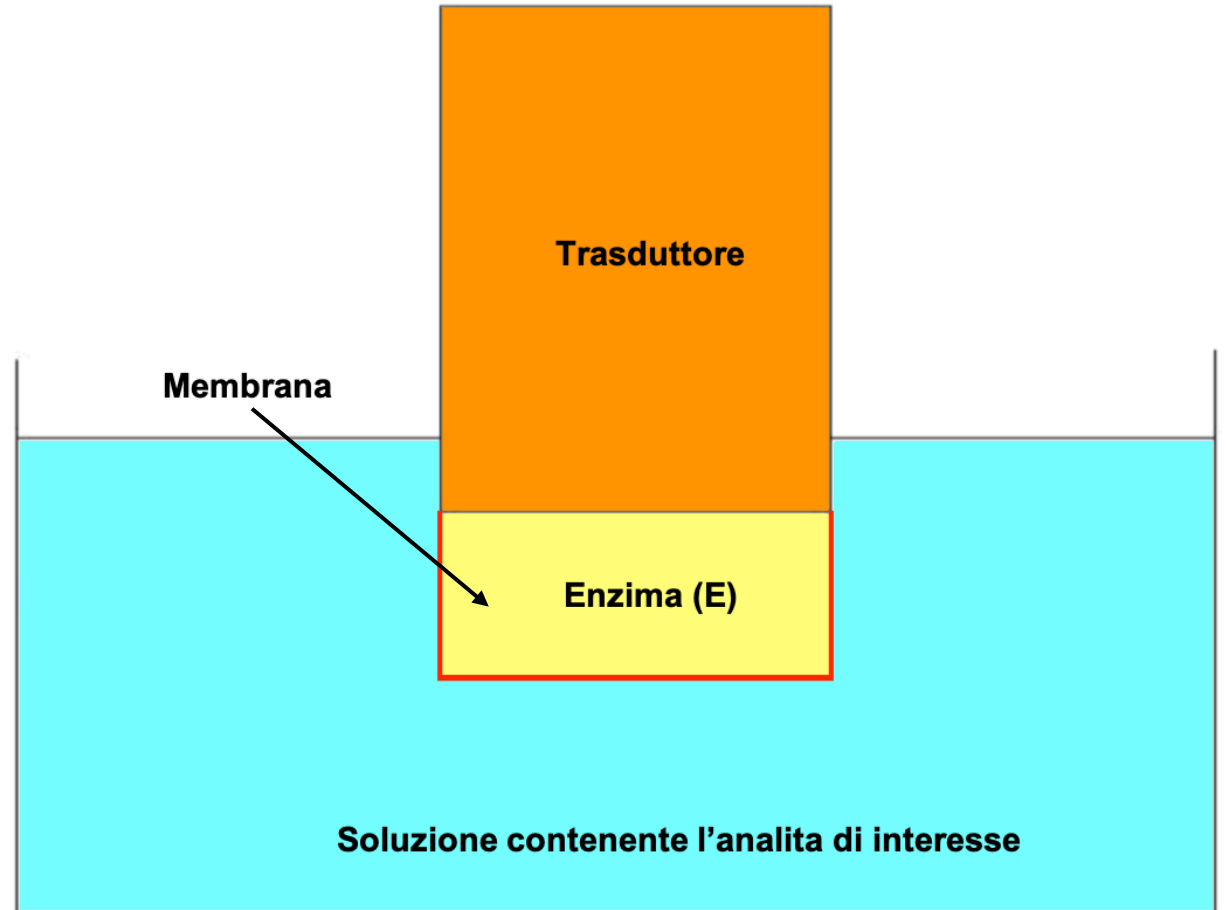
S: substrato (analita)

ES: complesso Enzima-substrato

P: prodotto

$K_i$ : costanti di velocità di reazione

**Misura di [P] e calcolo di [S] tramite un opportuno modello** ( $[S]=f[P]$ ) – idealmente, grazie alla specificità di E, si avrà che **un incremento di P sarà dovuto solo e soltanto ad un incremento di S.**



# Biosensori - enzimatici

---

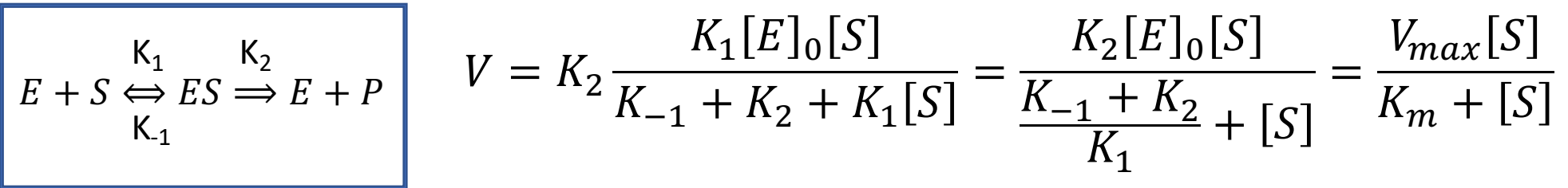
Supponendo la **soluzione di test perfettamente agitata**, la trasduzione in un sistema in cui è presente un enzima, opera in 4 passi distinti:

- 1) Diffusione del substrato attraverso la membrana
- 2) Reazione enzimatica
- 3) Trasporto di P verso l'elettrodo
- 4) Lettura della variazione di potenziale rispetto ad un elettrodo di riferimento (caso potenziometrico) o della corrente che scorre nella cella elettrochimica (caso amperometrico)

Considerando **molto rapido il punto 4** e ideale la membrana (quindi **1 trascurabile**), i fenomeni che determineranno la velocità di risposta del sensore saranno i **fenomeni di diffusione e la velocità della reazione enzimatica**. L'ultima è possibile ricavarla dall'equazione di **Michaelis-Menten (MM)**.

# Biosensori - enzimatici

La cinetica di MM descrive **come la concentrazione dell'analita S influenza la velocità di reazione**. Supponendo **costante la concentrazione totale di enzima** e considerando che **a regime l'analita satura l'enzima** (cioè non resta enzima libero) è possibile definire la velocità di reazione:



con  $[E]_0$  concentrazione enzimatica totale, cioè la **somma della concentrazione dell'enzima legato con la concentrazione dell'enzima libero**:

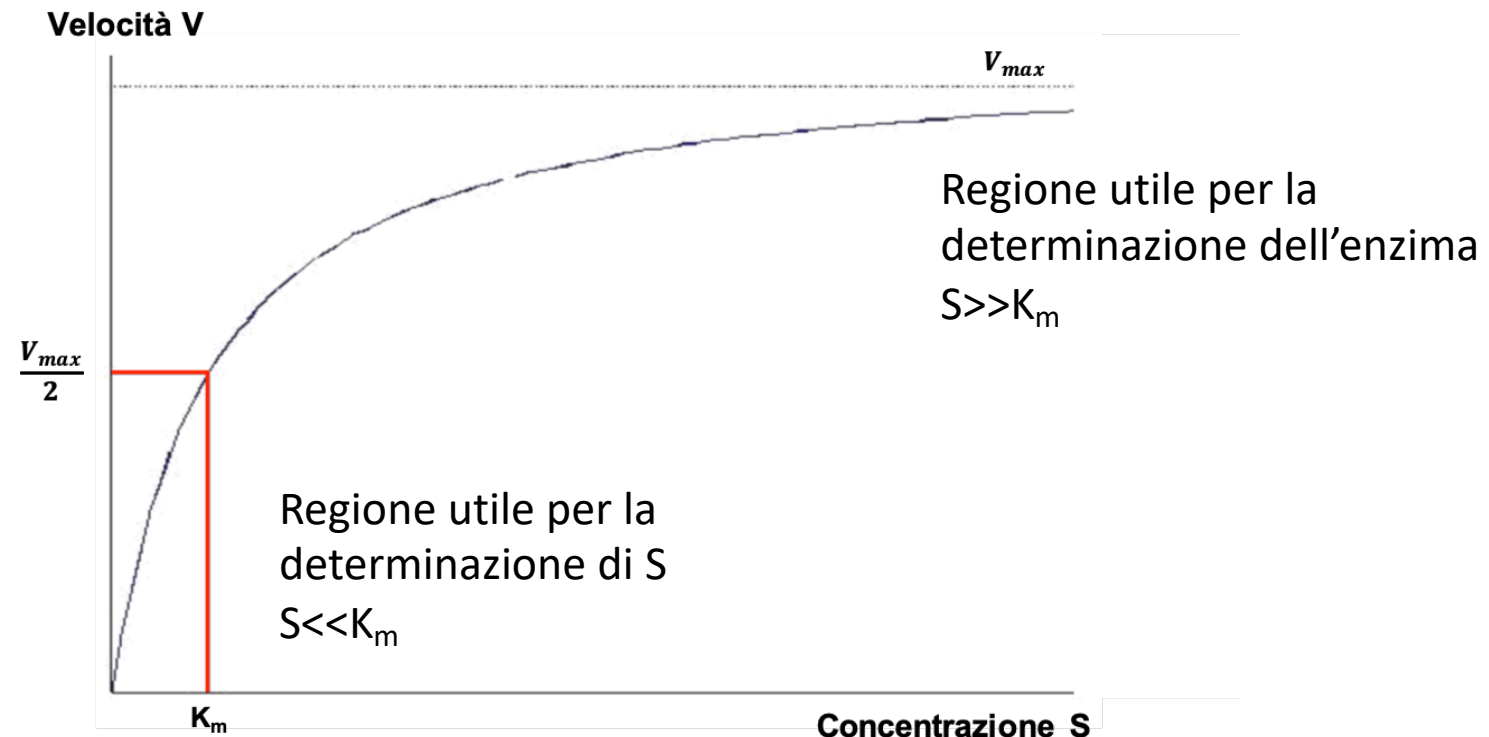
$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$  è la costante di MM, e  $V_{max}$  è la velocità limite, quella cioè per cui tutto l'enzima è occupato nella reazione ( $[E]_0 = [ES]$ ).

# Biosensori- enzimatici

In particolare  $K_m$  rappresenta la **concentrazione di substrato per cui la velocità di reazione è la metà di quella massima**. Un **basso  $K_m$**  indica **un'alta affinità dell'enzima** per un particolare analita.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

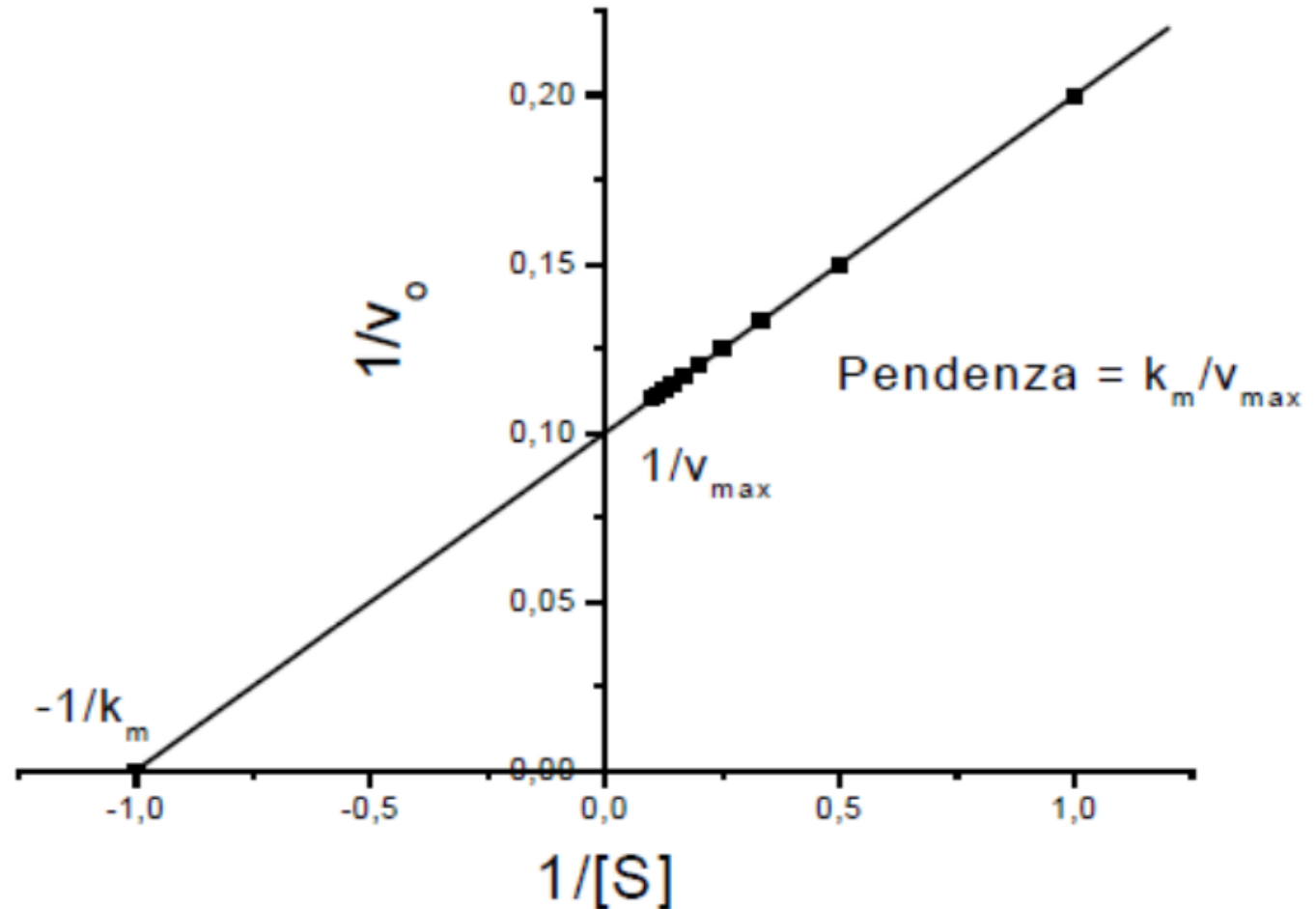


# Biosensori- enzimatici

È possibile linearizzare la caratteristica di MM ottenendo una sua derivazione in cui sono facilmente riconoscibili i vari termini:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = mx + q$$



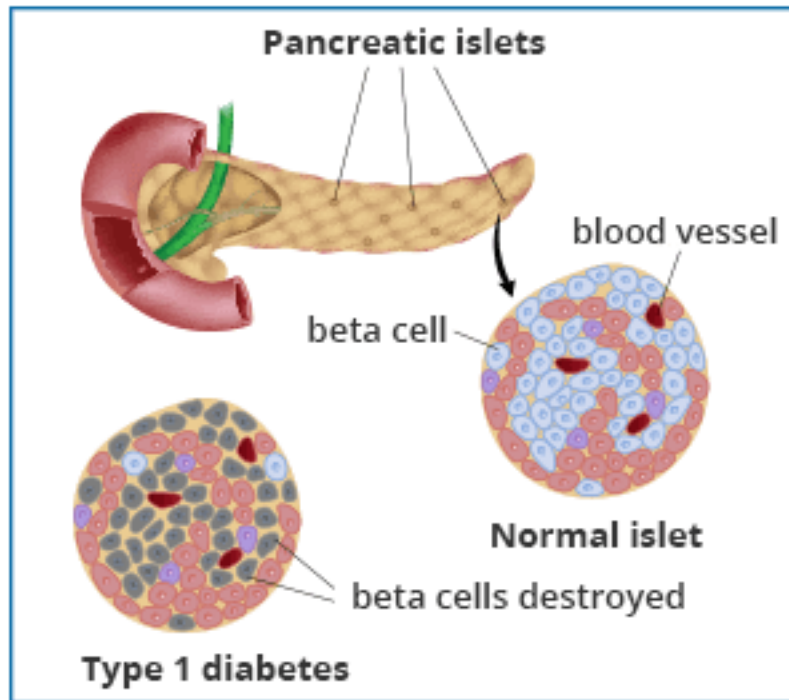
# Sensori amperometrici

---

Il biosensore amperometrico più comune è certamente il  **sensore di glucosio**. Non è solo il **primo esempio di biosensore**, ma rappresenta attualmente la più grande fetta di mercato in ambito biosensoristico.

# Il diabete mellito di tipo 1

- Il diabete mellito di tipo 1 costituisce una delle malattie croniche più frequenti.
- Il diabete mellito di tipo 1 è uno **stato di deficit assoluto o relativo di insulina** che conduce ad una elevazione **cronica delle concentrazioni di glucosio nel sangue** (iperglicemia).
- È una malattia **cronica autoimmune** nella quale si verifica una **progressiva distruzione delle cellule beta del pancreas**.



	mmol/L	mg/dl
glicemia a digiuno	> 7.0	> 126
glicemia random o 2 ore dopo carico di glucosio	> 11.1	> 200

# Il diabete mellito di tipo 2

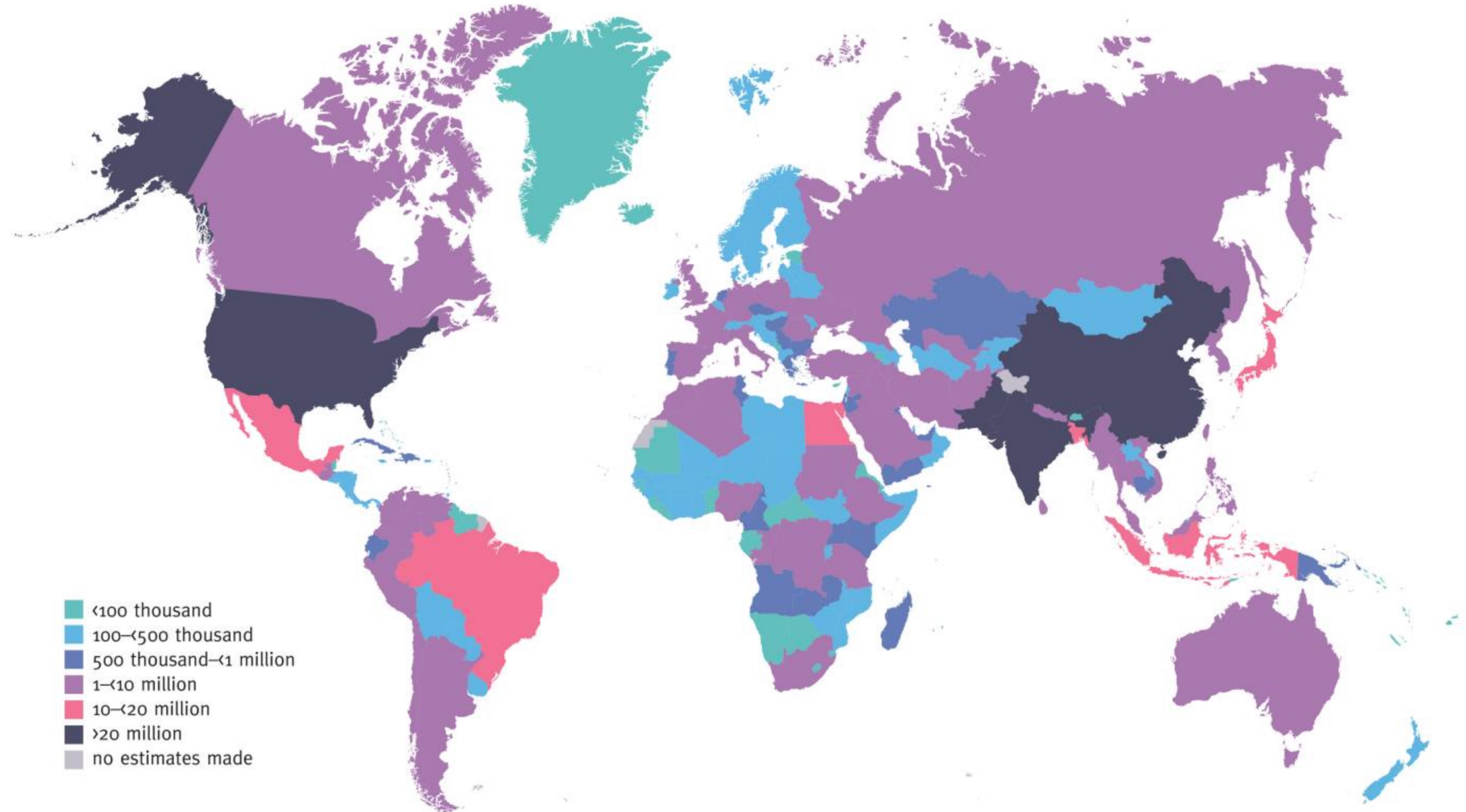
---

Il **diabete di tipo 2** è una **malattia multifattoriale** che tende a presentarsi dopo i 30-40 anni d'età. Diversi meccanismi sono implicati nella genesi di questa patologia metabolica, ma classicamente il difetto iniziale è rappresentato da una **insulino-resistenza**, ossia una ridotta azione dell'insulina a livello degli organi bersaglio che porta da un lato a un eccesso della produzione epatica di **glucosio** e dall'altro a una sua ridotta utilizzazione da parte dei muscoli.

Tra i **fattori di rischio più rilevanti per l'insorgenza del diabete di tipo 2** figurano la **familiarità alla malattia**, uno **stile di vita sedentario**, un'**alimentazione troppo ricca di grassi e zuccheri** e il **sovrappeso corporeo**.

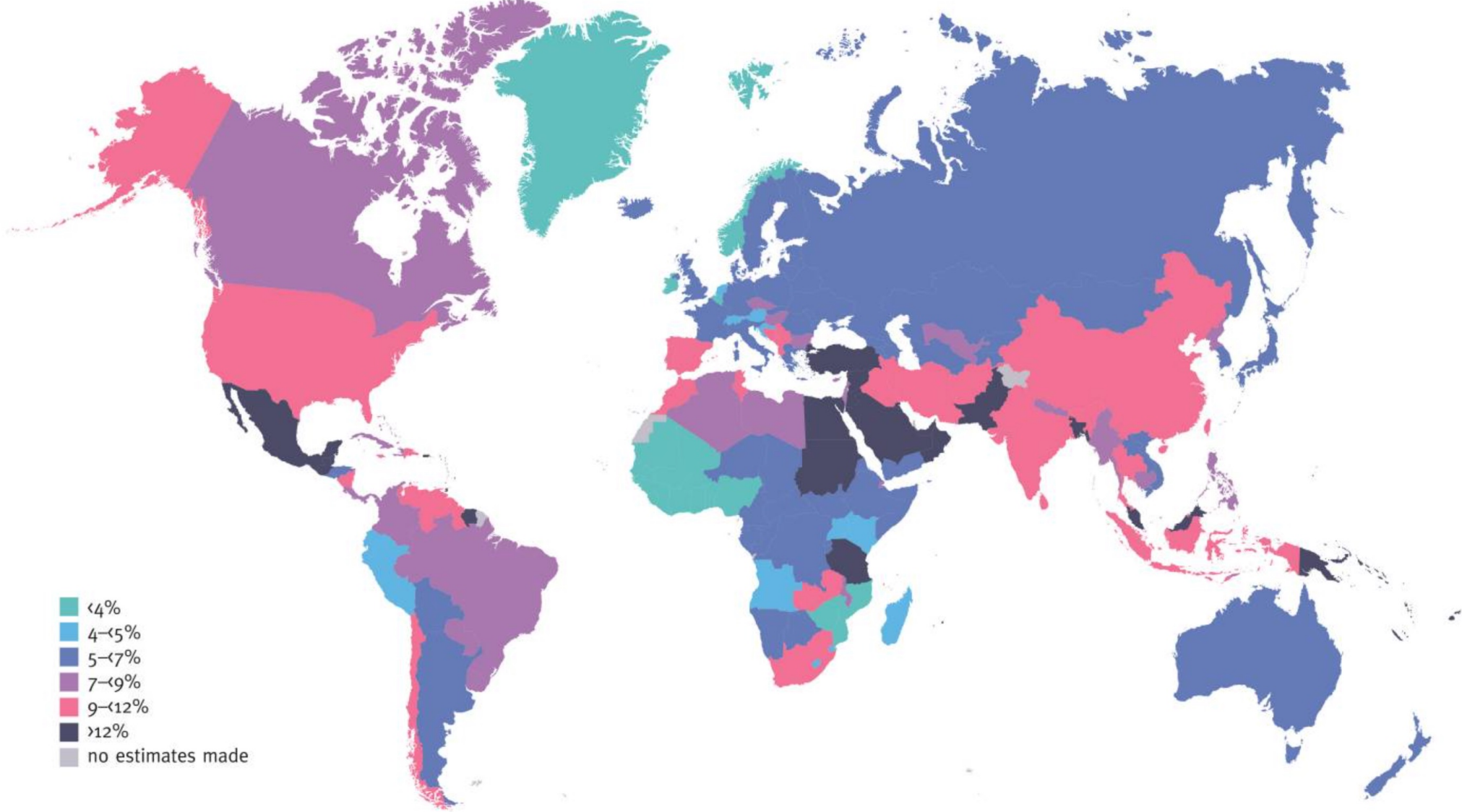
# Il diabete mellito

Estimated total number of adults (20–79 years) with diabetes in 2021



# Il diabete mellito

Estimated age-adjusted comparative prevalence of diabetes in adults (20–79 years) in 2021



# Il diabete mellito

**Table 3.2** Number of adults (20–79 years) with diabetes per World Bank income classification in 2021 and 2045

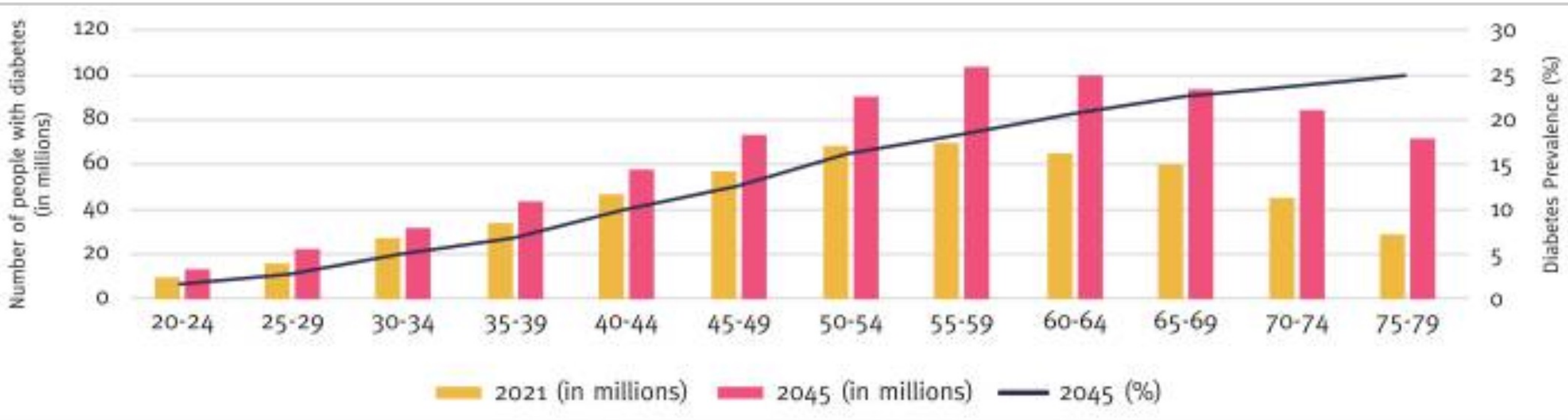
At a glance	2021			2045		
World Bank income classification	Number of people with diabetes (millions)	Diabetes prevalence <sup>i</sup> (%)	Comparative diabetes prevalence <sup>ii</sup> (%)	Number of people with diabetes (millions)	Diabetes prevalence <sup>i</sup> (%)	Comparative diabetes prevalence <sup>ii</sup> (%)
<b>World</b>	<b>536.6</b>	<b>10.5%</b>	<b>9.8</b>	<b>783.2</b>	<b>12.2%</b>	<b>11.2</b>
High-income countries	103.9	11.1%	8.4	117.7	12.4%	10.3
Middle-income countries	414.0	10.8%	10.5	623.3	13.1%	12.0
Low-income countries	18.7	5.5%	6.7	42.2	6.1%	7.0
Number of deaths due to diabetes	6.7 million		–		–	

i Prevalence is standardised to each national population for the respective year

ii Prevalence is standardised to world population for the respective year

- Invecchiamento
- Abitudini alimentari scorrette e aumento dell'incidenza dell'obesità
- Diagnosi efficace

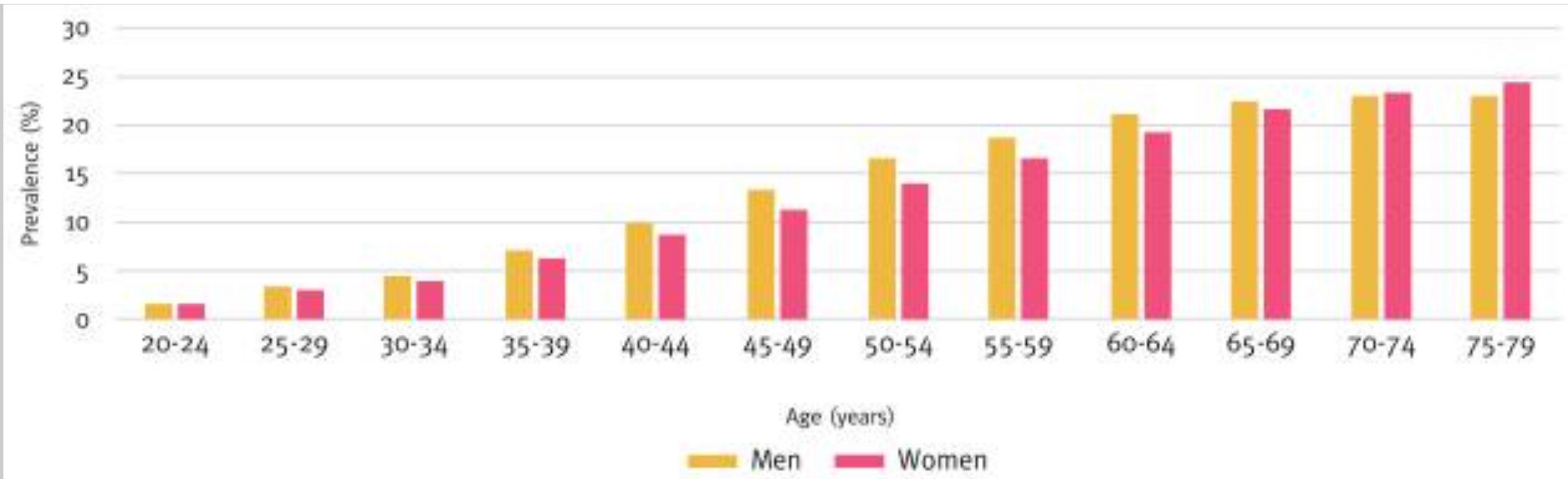
# Il diabete mellito



Number of people with diabetes in adults (20–79 years) by age group in 2021 (columns) and estimated prevalence<sup>i</sup> across age groups in 2045 (black line).

<sup>i</sup>Prevalence is standardised to each national population

# Il diabete mellito

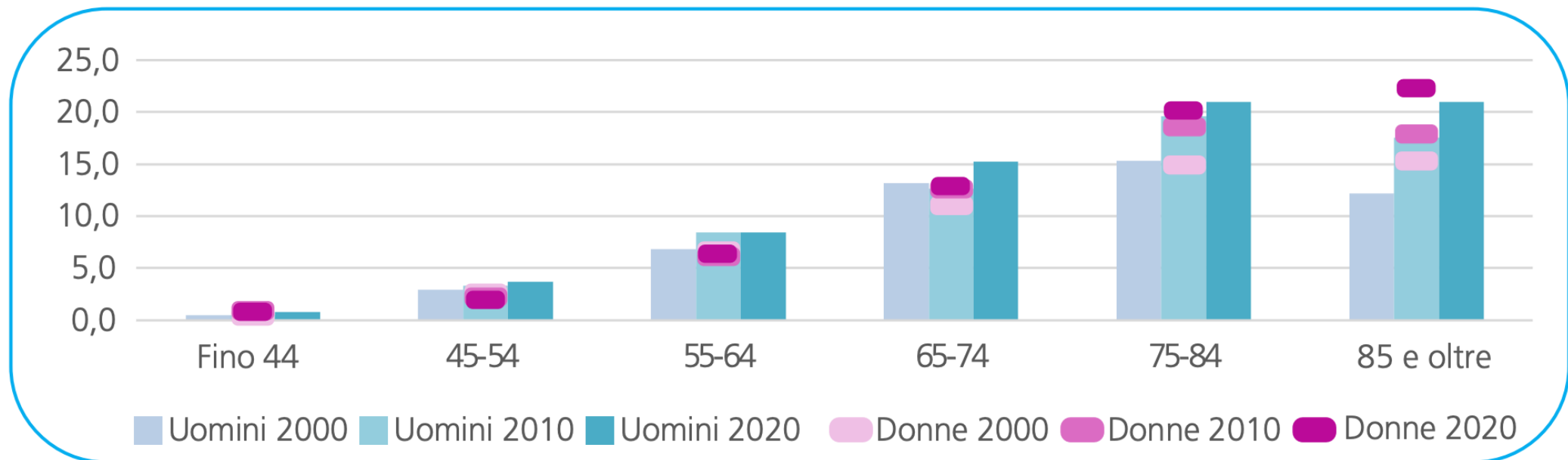


**Prevalence<sup>i</sup> of diabetes among men and women (20–79 years), 2021**

<sup>i</sup>Prevalence is standardised to each national population

# Il diabete mellito in italia

**Figura 2. Popolazione che dichiara di essere affetta da diabete, per età e genere. Anni 2000, 2010 e 2020. Tassi per 100 persone**



Fonte: Istat, Indagine Aspetti della vita quotidiana

# Il diabete mellito di tipo 1 in italia

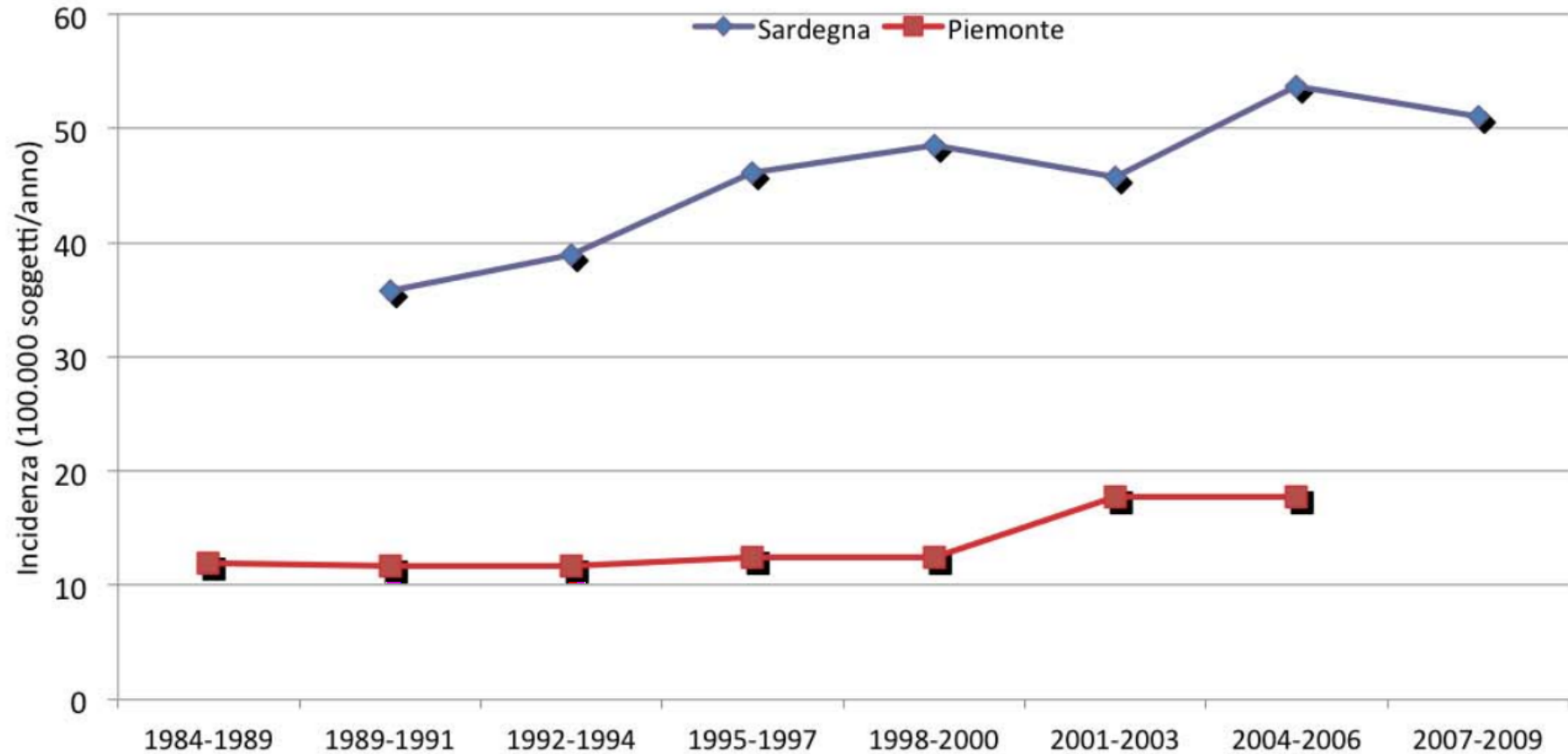
Tabella - Tassi di incidenza (x 100.000 residenti) per diabete di tipo 1 tra i bambini di 0-4 anni nelle regioni italiane. Database SDO (2005-10)

	n. casi	Tasso standard	
Piemonte-Valle d'Aosta	139	11,9	■
Liguria	56	15,4	■
Lombardia	274	9,7	■
Trentino-Alto Adige	44	13,7	■
Veneto	138	9,9	■
Friuli-Venezia Giulia	34	11,0	■
Emilia-Romagna	160	13,6	■
Toscana	95	10,0	■
Umbria	28	12,1	■
Marche	76	18,4	■
Lazio	210	13,3	■
Abruzzo	37	10,9	■
Molise	12	15,9	■
Campania	227	12,1	■
Puglia	104	8,9	■
Basilicata	19	12,6	■
Calabria	93	16,8	■
Sicilia	281	18,7	■
Sardegna	223	55,6	■
<b>Italia</b>	<b>2.250</b>	<b>13,4</b>	



# Il diabete mellito di tipo 1 in Sardegna

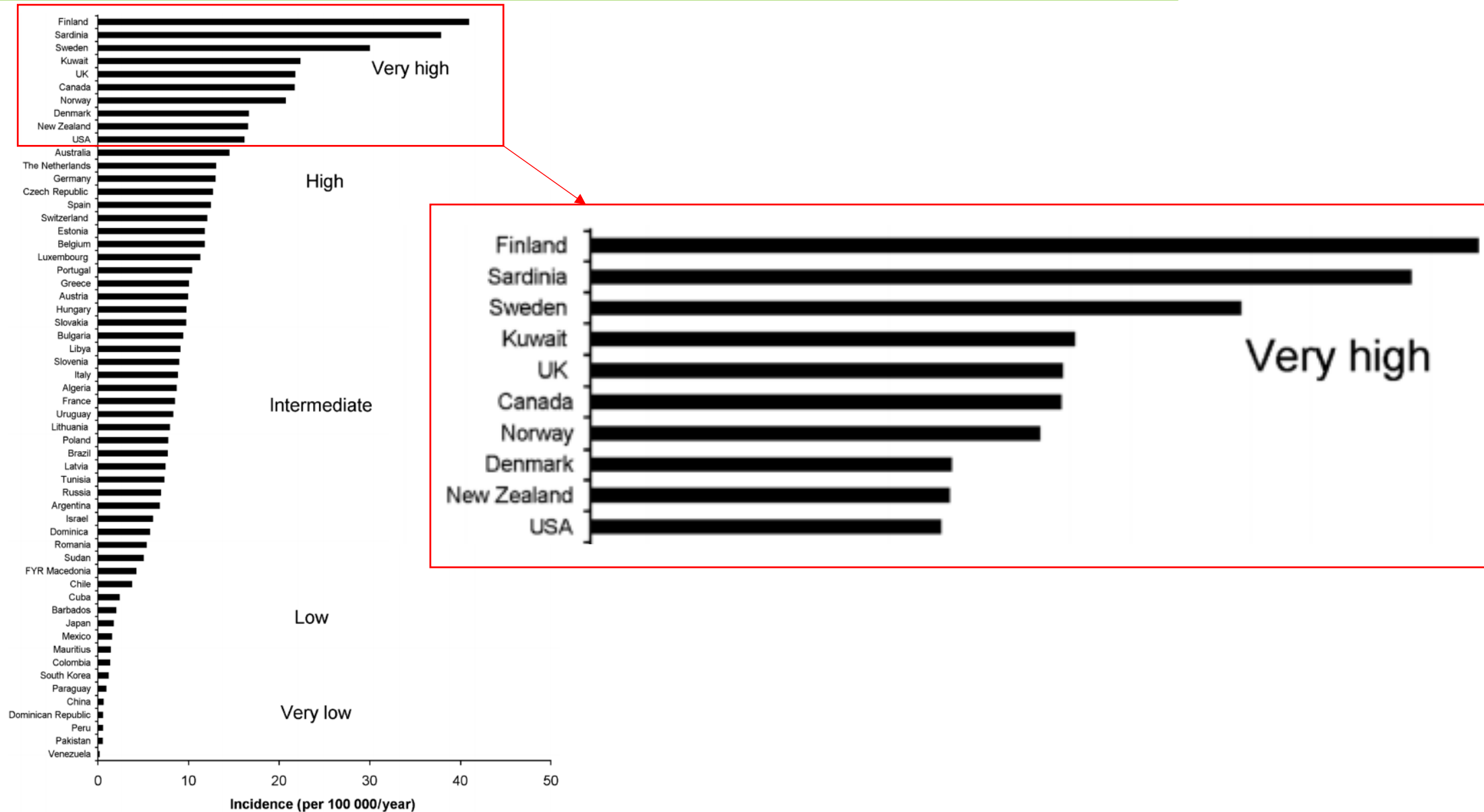
**Situazione  
nella fascia  
0-14 anni...**



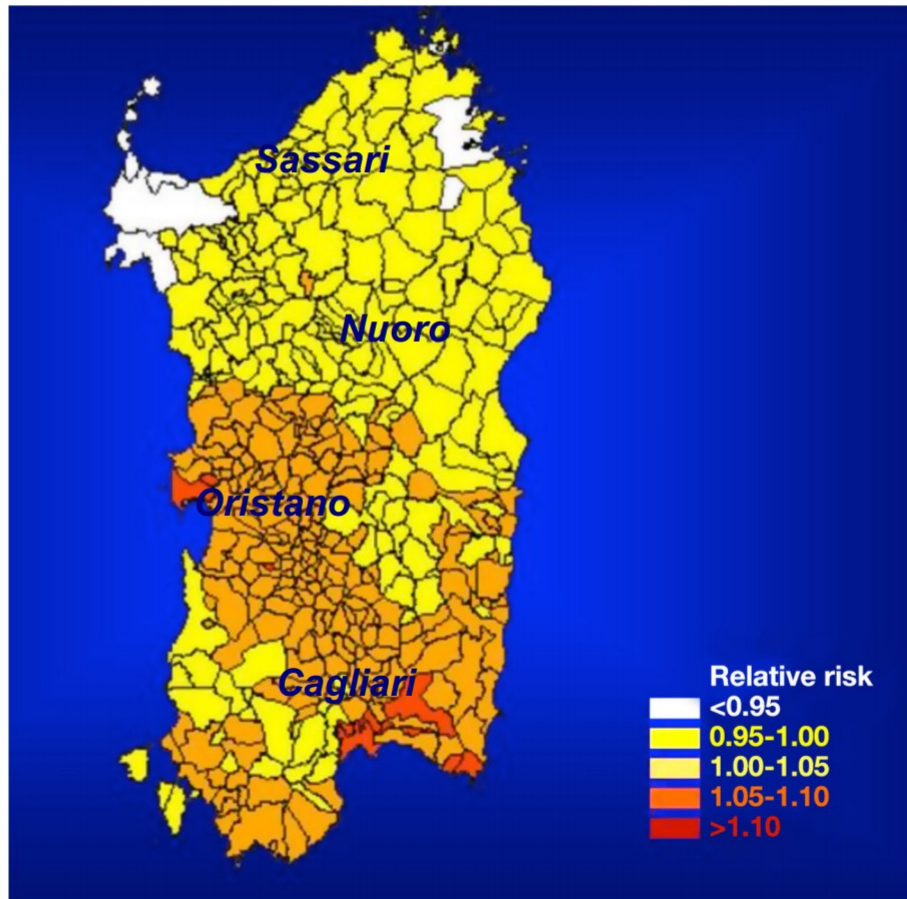
- Casu A, Pascutto C, Bernardinelli L, Songini M. Type 1 diabetes among sardinian children is increasing: the Sardinian diabetes register for children aged 0-14 years (1989-1999). *Diabetes Care*. 2004 Jul; 27(7): 1623-9.
- Bruno G, Maule M, Biggeri A, et al. More than 20 years of registration of type 1 diabetes in Sardinian children: temporal variations of incidence with age, period of diagnosis, and year of birth. *Diabetes* 2013; 62(10): 3542-6.

# Il diabete mellito di tipo 1 in Sardegna

**Fig. 1** Geographic variation of childhood T1D incidence (children under 14 years of age) during 1990–1999 [6]



# Il diabete mellito di tipo 1 in Sardegna



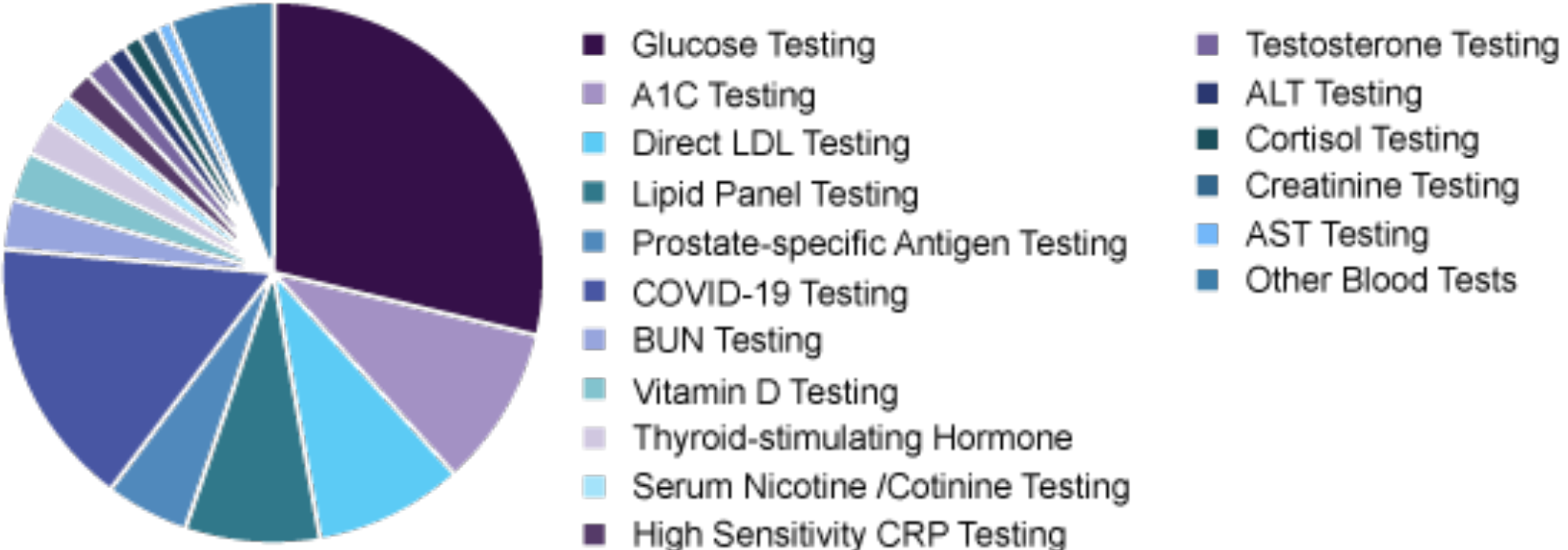
**Fig. 2** Estimated risk of T1D among children aged 0–14 years in the four Sardinian Provinces in period 1989–1999 [11]

	Case subjects (N)	Person-years	IR/100,000 person-years
Total	2371	5,286,212	44.8
<i>Sex</i>			
Boys	1380	2,725,601	50.6
Girls	991	2,560,611	38.7
<i>Age (years)</i>			
0–2	320	910,143	35.2
3–5	396	961,497	41.2
6–8	482	1,034,124	46.6
9–11	613	1,127,595	54.4
12–14	560	1,252,853	44.7
<i>Period</i>			
1989–1991	346	967,116	35.8
1992–1991	334	857,969	38.9
1995–1997	362	785,852	46.1
1998–2000	351	723,217	48.5
2001–2003	311	678,325	45.8
2001–2006	348	648,162	53.7
2007–2009	319	625,571	51.0

**Table 1** Incidence of type 1 diabetes in Sardinia (children under 14 years of age) during 1989–2009 by sex, age-group and calendar period [7]

# Il mercato dei sensori per il glucosio

Global blood testing market share, by test type, 2020 (%)



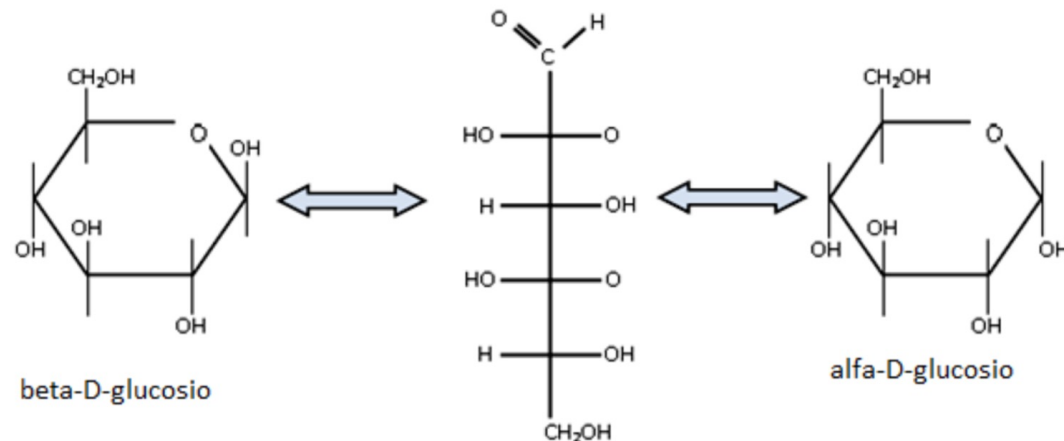
Source: [www.grandviewresearch.com](http://www.grandviewresearch.com)

# Il glucosio

I sensori di glucosio disponibili in commercio sono tutti basati sull'utilizzo **dell'enzima glucosio-ossidasi** e sono altamente **specifici per il beta-D-glucosio**. Tuttavia, **è possibile misurare la concentrazione di entrambe le forme anomeriche del glucosio** grazie al fatto che, a seguito del consumo di beta-glucosio durante la reazione, **la forma alfa viene gradualmente convertita in beta tramite un processo chiamato mutarotazione**.

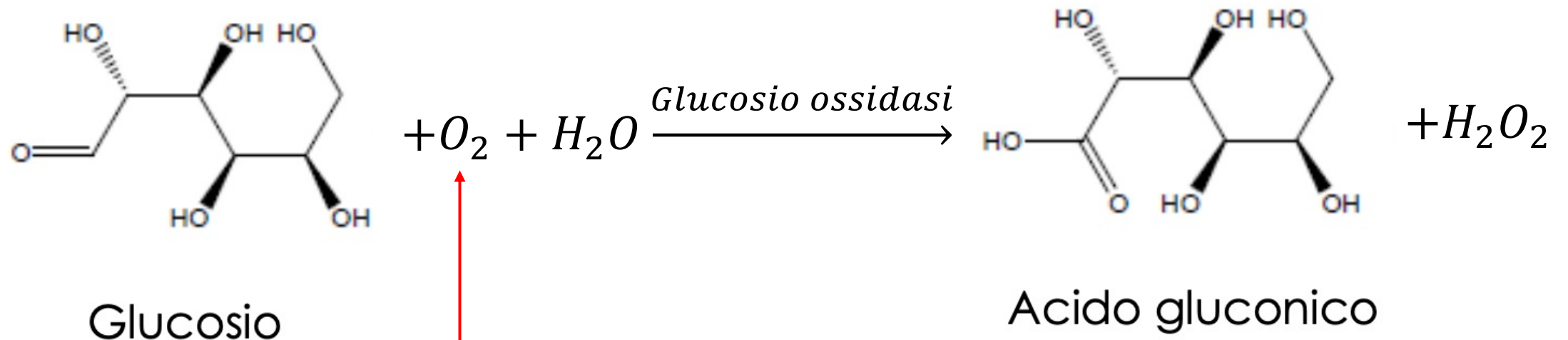
Il glucosio è, come abbiamo visto, una **piccola molecola senza una carica netta** e questo la rende particolarmente inerte dal punto di vista elettrochimico. A causa di queste sue proprietà fisiche il metodo utilizzato è quello amperometrico, il quale sfrutta la **capacità dell'enzima glucosio ossidasi di ossidare il glucosio e dare come prodotto  $H_2O_2$** , la quale può essere rilevata con un elettrodo di Clark.

## Forme anomeriche del D-glucosio



# Il glucosio

La reazione generale che porta alla formazione di  $H_2O_2$  partendo dal glucosio è la seguente:



Necessaria la presenza  
di ossigeno...

# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

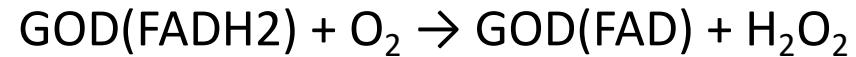
---

## Passaggi dettagliati.

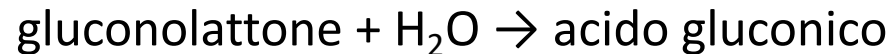
L'enzima glucosio-ossidasi GOD catalizza l'ossidazione del beta-glucosio in gluconolattone, mentre il cofattore redox del GOD (il FAD glucosio-deidrogenasi in questo caso) viene ridotto in FADH<sub>2</sub>:



Il cofattore ridotto è ri-ossidato dall'interazione con l'ossigeno, portando alla formazione di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):



Il gluconolattone è invece idrolizzato, diventando acido gluconico:



# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

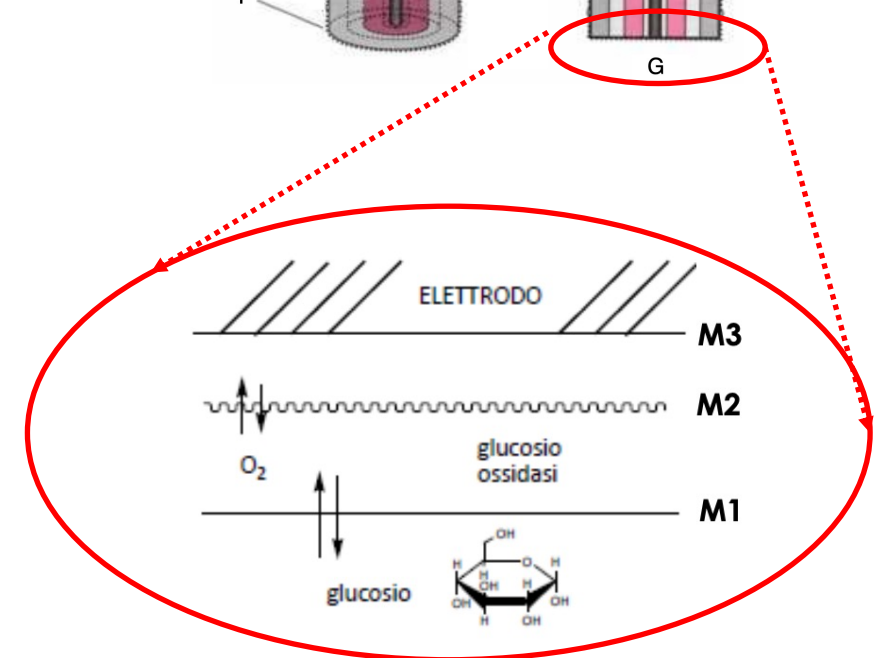
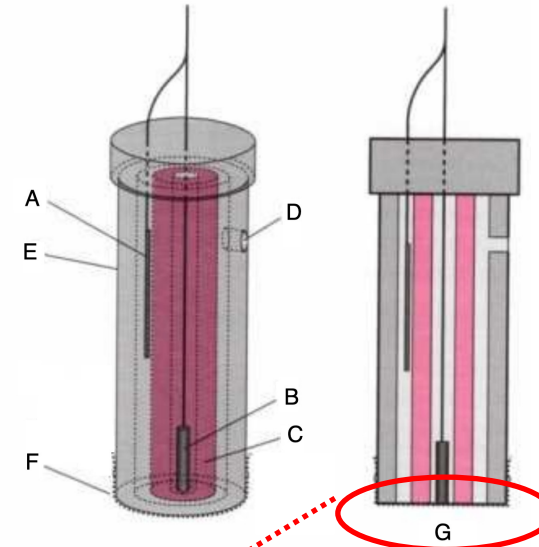
Il primo esempio di sensore di glucosio è quello sviluppato da Clark e Lyons nel 1962, i quali integrarono in un elettrodo per l'ossigeno di Clark una **membrana da dialisi in cui era immobilizzato l'enzima glucosio ossidasi (GOD)**.

In una sua primissima versione, il fenomeno sfruttato è la **diminuzione dell'ossigeno** dovuta alla reazione enzimatica:



In questa versione, la polarizzazione della cella è quella dell'elettrodo di Clark (Pt - catodo - negativo rispetto all'Ag/AgCl - anodo).

**Una diminuzione dell'O<sub>2</sub> determina una diminuzione della corrente nella cella proporzionale alla concentrazione di Glu.**



# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

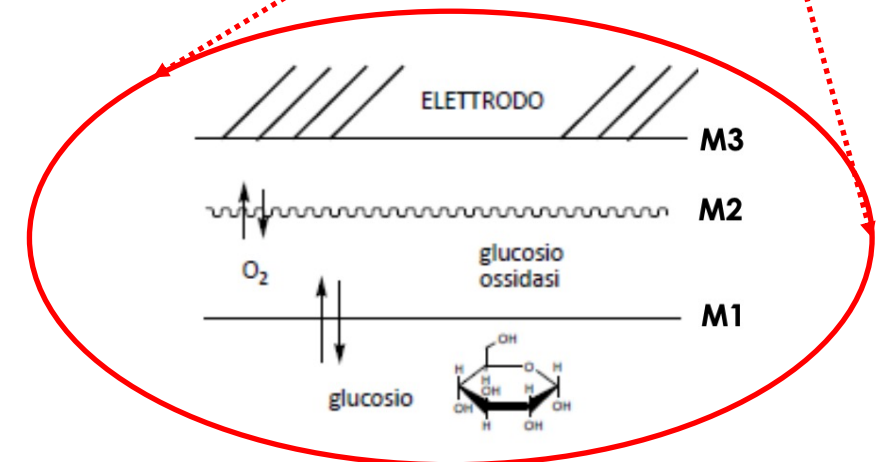
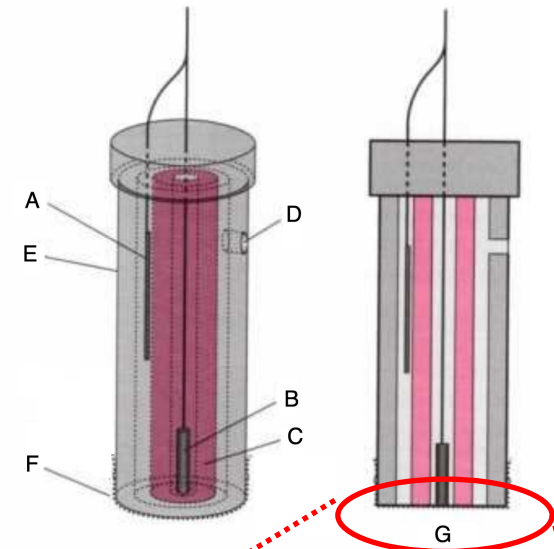
Il primo esempio di sensore di glucosio è quello sviluppato da Clark e Lyons nel 1962, i quali integrarono in un elettrodo per l'ossigeno di Clark una **membrana da dialisi in cui era immobilizzato l'enzima glucosio ossidasi (GOD)**.

Un successivo approccio sfrutta invece **l'ossidazione del perossido di idrogeno** che avviene quando il Pt viene **polarizzato positivamente rispetto all'Ag/AgCl: +0.68 V** (il Pt diventa dunque l'anodo, secondo convenzione).

Pt anodo:  $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2 + 2e^-$

Ag/AgCl catodo:  $2AgCl + 2e^- \rightarrow 2Ag^+ + 2Cl^-$

La corrente era dunque proporzionale alla concentrazione di  $H_2O_2$ , a quale a sua volta dipende dalla concentrazione di glucosio.

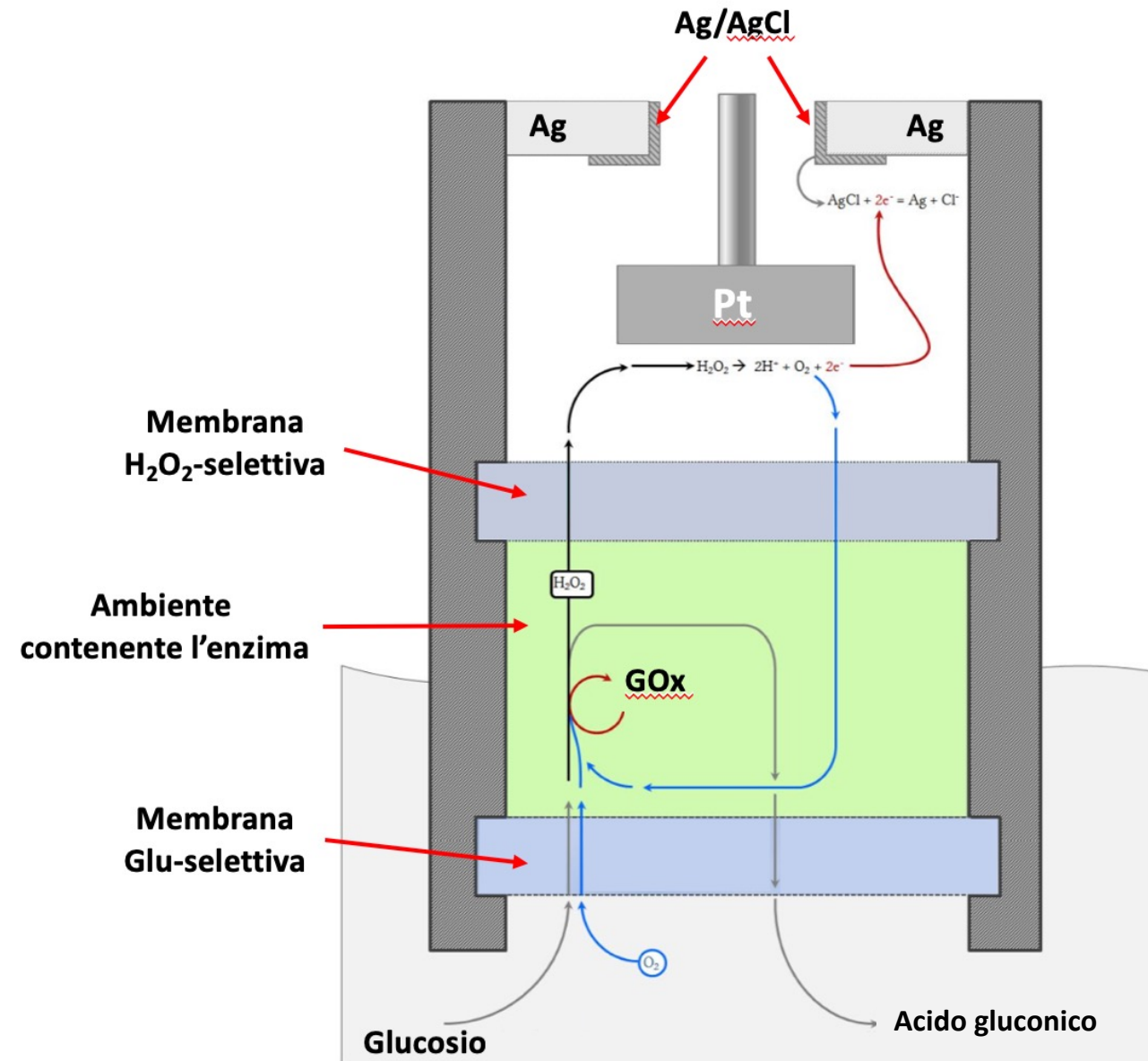


# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

Una generico sensore di glucosio da laboratorio per applicazioni biomedicali prevede la presenza di un sistema multimembrana:

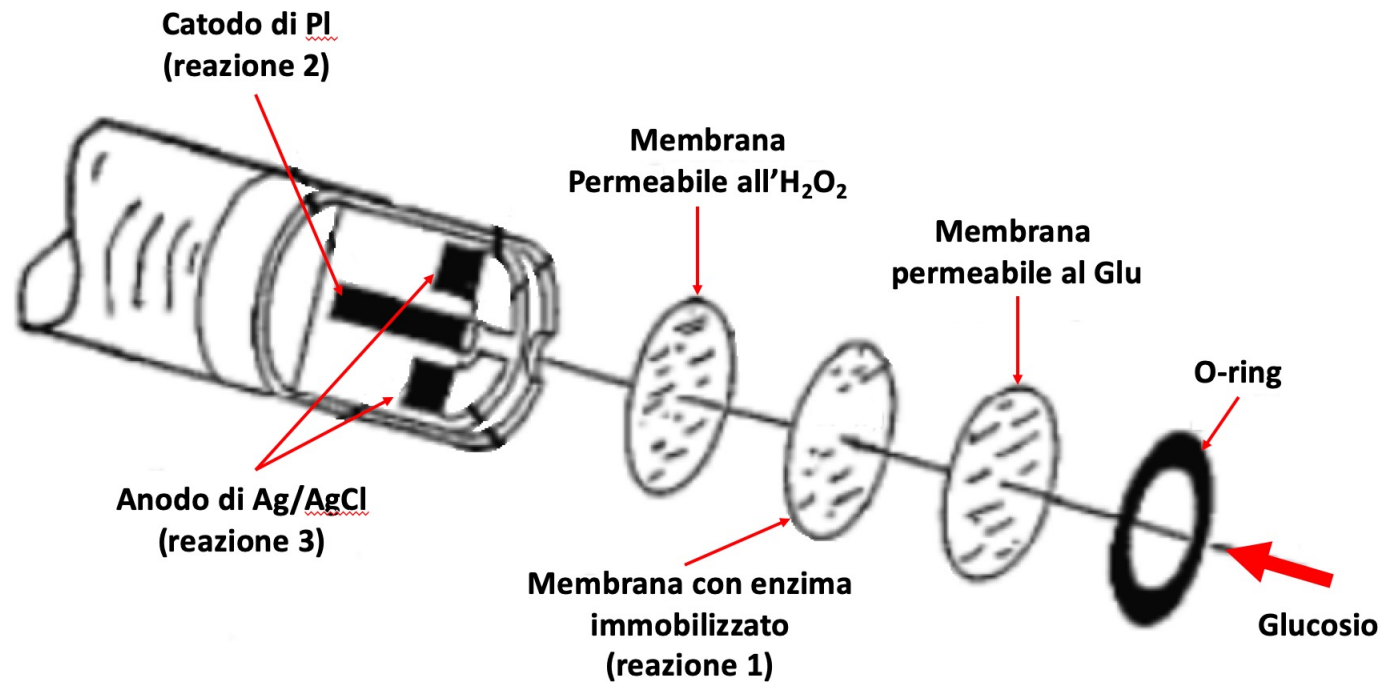
- Una membrana esterna permeabile al glucosio
- Un layer intermedio in cui è presente l'enzima
- Una membrana interna permeabile all' $\text{H}_2\text{O}_2$

Nella reale pratica clinica la "camera enzimatica interna" è in realtà **integrata nella stessa membrana esterna**, nella quale è immobilizzato l'enzima. Questo approccio aiuta a minimizzare una delle problematiche principali di questo tipo di elettrodi che è la **degradazione dell'enzima**.

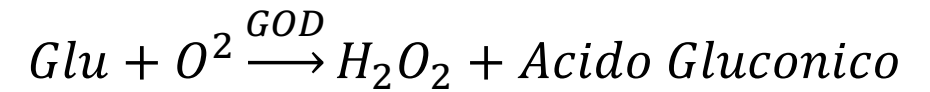


# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

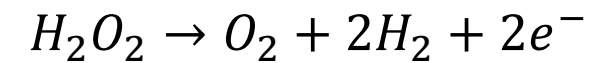
Insieme completo di reazioni in un sensore di glucosio di **prima generazione** (con riferimento in Ag/AgCl):



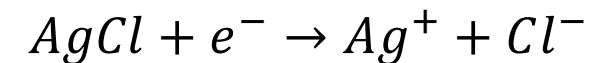
Reazione 1: membrana



Reazione 2: anodo di Pt

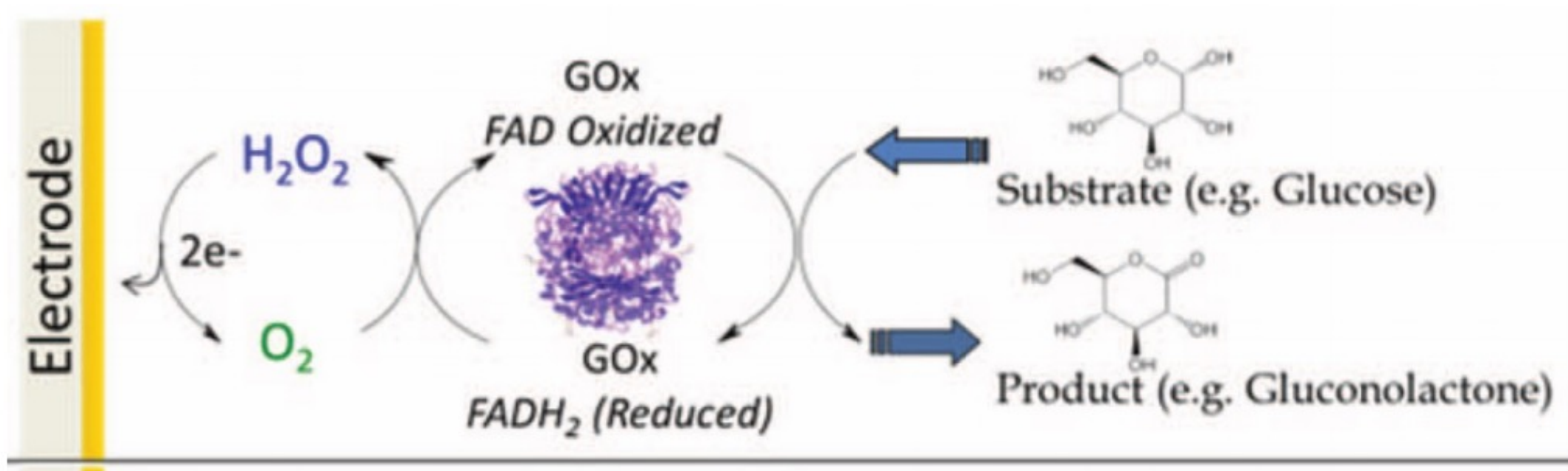


Reazione 3: Catodo di Ag/AgCl



# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

Dunque nei sensori di prima generazione l'ossigeno e l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sono **direttamente coinvolti nello scambio elettronico** a livello dell'elettrodo:



# Biosensori amperometrici - Il sensore per il glucosio

---

Dipendenza dall'ossigeno.

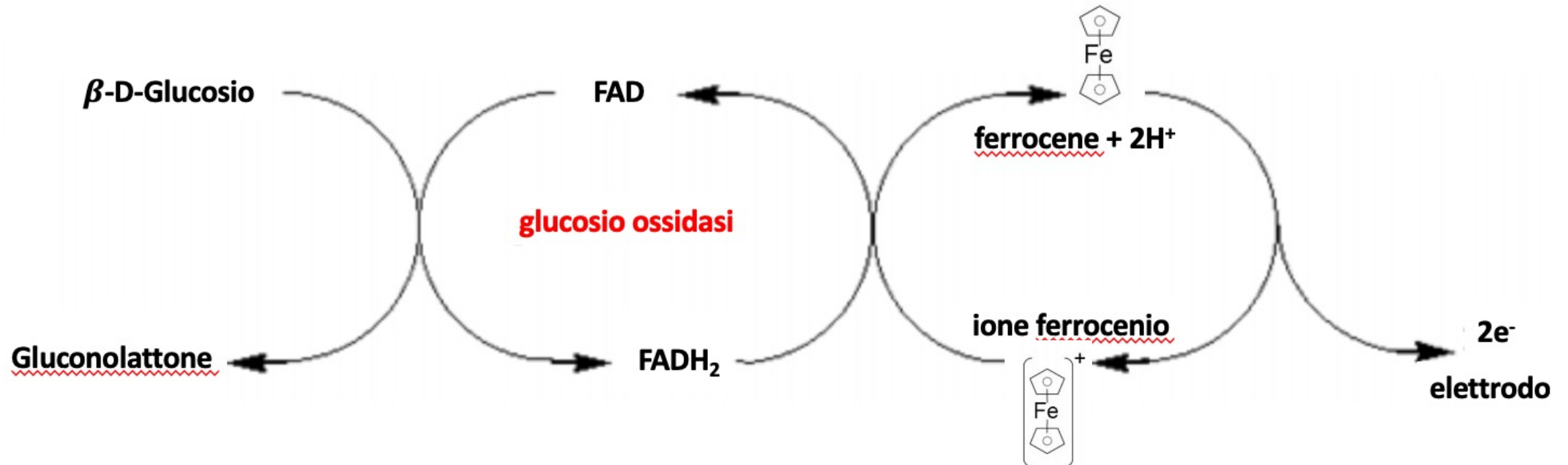
Nei sensori di glucosio di prima generazione una **problematica è legata alla dipendenza della reazione dalla presenza di ossigeno**. Un campione ben ossigenato permetterà infatti una lettura rapida dovuta ad una ottimale catalizzazione enzimatica della reazione.

Poche nano moli di ossigeno sono sufficienti per far partire la reazione, e la riduzione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  all'anodo garantisce che la reazione proceda. Nonostante ciò, **la dipendenza dall'ossigeno costituiva un fattore limitante in questa prima tipologia di sensori**.

# Il sensore per il glucosio di seconda generazione

Al fine di risolvere questa problematica, venne introdotta una **seconda generazione** di sensori per il glucosio. In questa nuova famiglia di biosensori, l'utilizzo di **opportune coppie redox chiamate "mediatori"** permette il trasferimento di elettroni all'elettrodo **senza bisogno di passare per la riduzione dell'ossigeno**.

I mediatori più utilizzati sono storicamente i ferroceni. **L'enzima viene riossidato dal mediatore**, il quale a sua volta viene **riossidato all'elettrodo**.



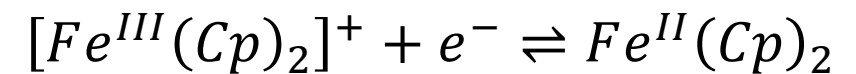
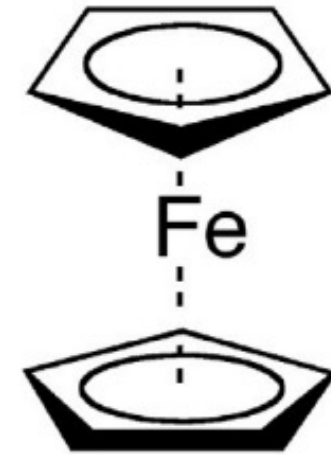
# Il sensore per il glucosio di seconda generazione

Perché il ferrocene?

- Reagisce rapidamente con la forma ridotta dell'enzima
- Buona solubilità (rapida diffusione)
- Bassi potenziali di riduzione e ossidazione
- La sua attività non è dipendente dal pH
- Stabile sia nella forma ossidata che in quella ridotta
- La forma ridotta non reagisce con l'O<sub>2</sub>
- Non è tossico



Ferrocene

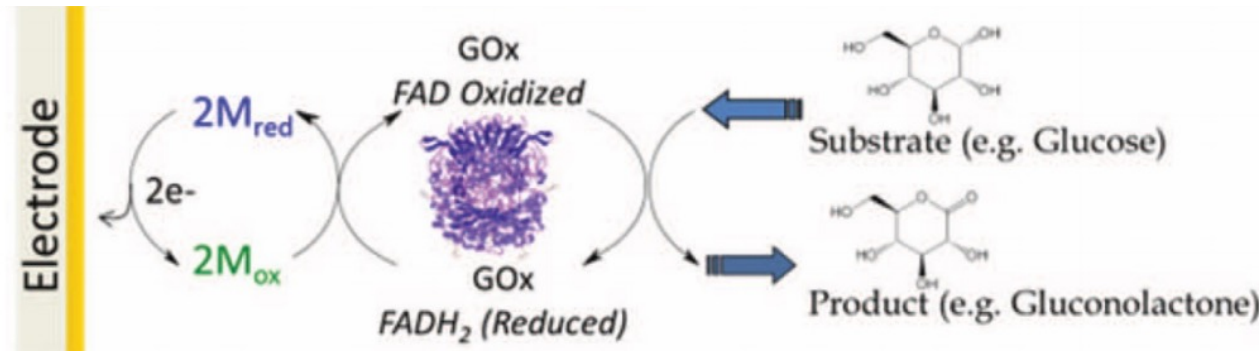
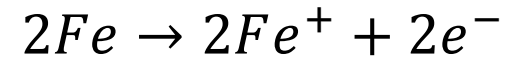
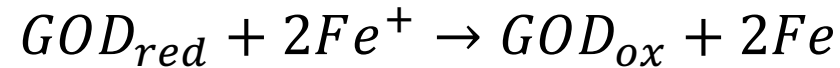
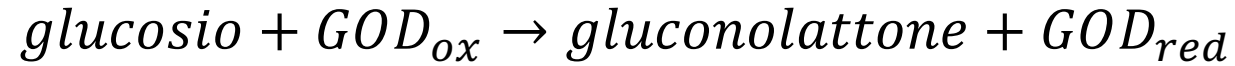


$$E_p(Ox) = +0.193 V$$

$$E_p(Red) = +0.137 V$$

# Il sensore per il glucosio di seconda generazione

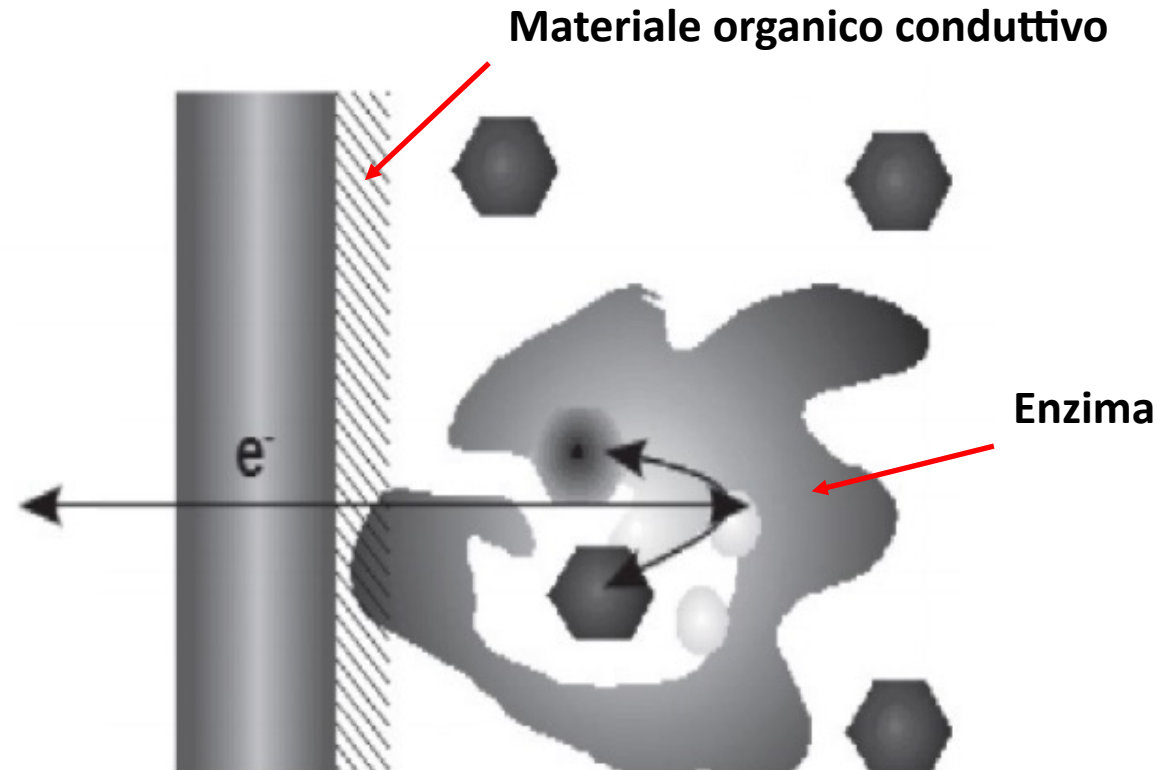
La reazione mediata dal ferrocene sarà dunque:



# Il sensore per il glucosio di terza generazione

Una terza generazione di sensori di glucosio si basa sul **trasferimento diretto di carica** da uno strato enzimatico immobilizzato direttamente sull'elettrodo di lavoro. Nessun mediatore necessario.

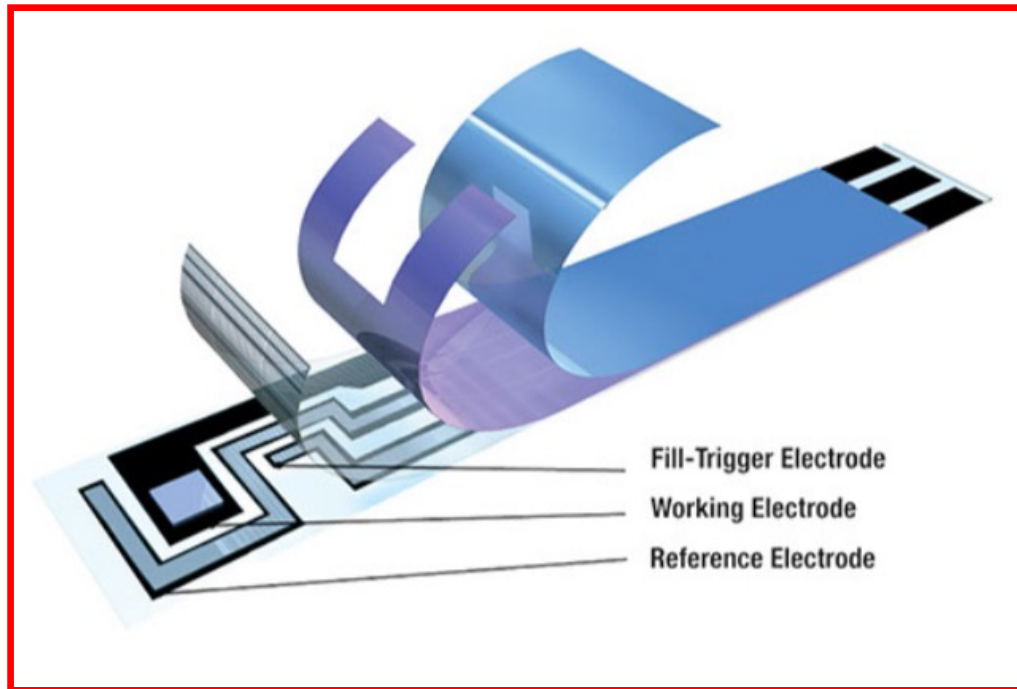
Questo tipo di sensori hanno spianato la strada per la realizzazione dei **primi sensori di glucosio ad ago impiantabili per il monitoraggio continuo in vivo**.



# Sensori di glucosio a singola strip

Sono i più comuni strumenti per la misura del livello di glucosio nel sangue:

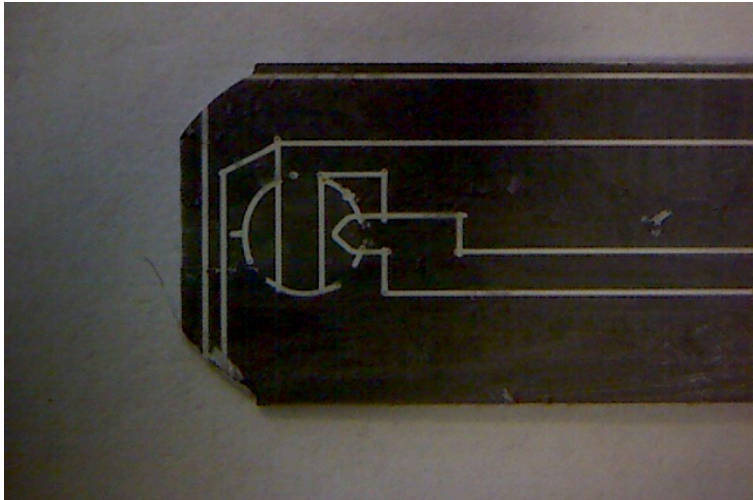
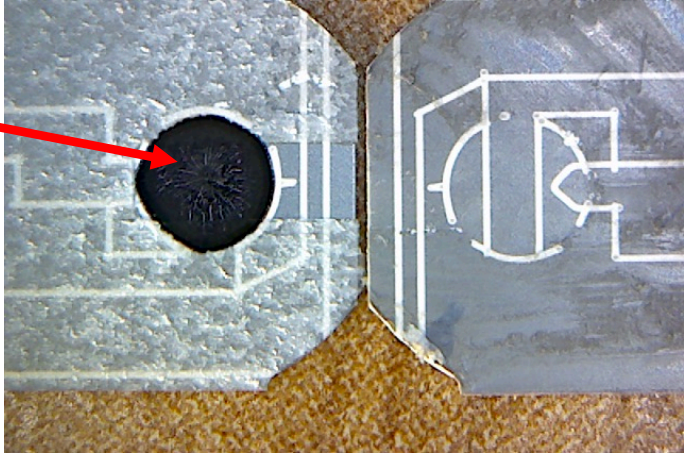
- Facili da usare
- Portatili
- Sufficientemente accurati



# Sensori di glucosio a singola strip

Attività di laboratorio: taratura di un sensore di glucosio a singola strip.

Enzima immobilizzato

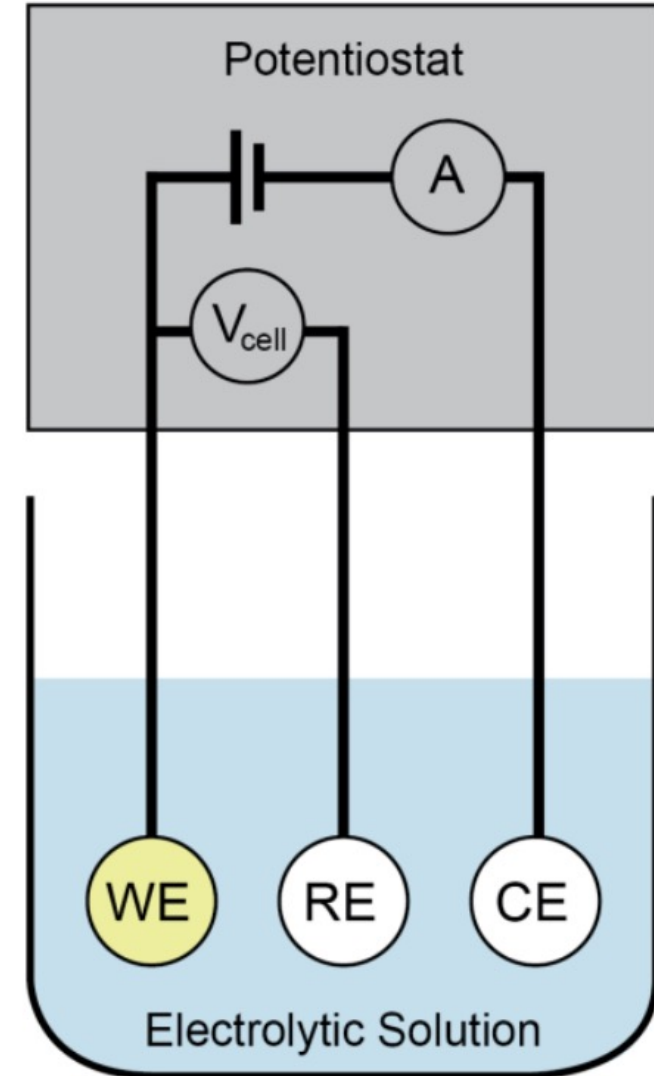


# Biosensori amperometrici – cella a tre elettrodi

In ambito biosensoristico la cella elettrochimica più comunemente utilizzata è quella a tre elettrodi:

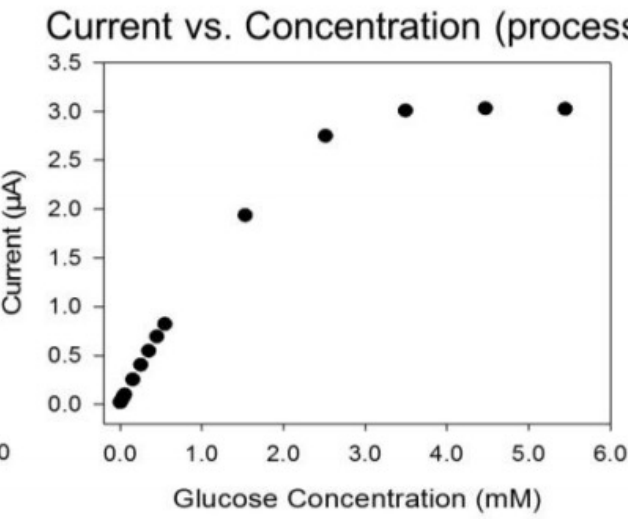
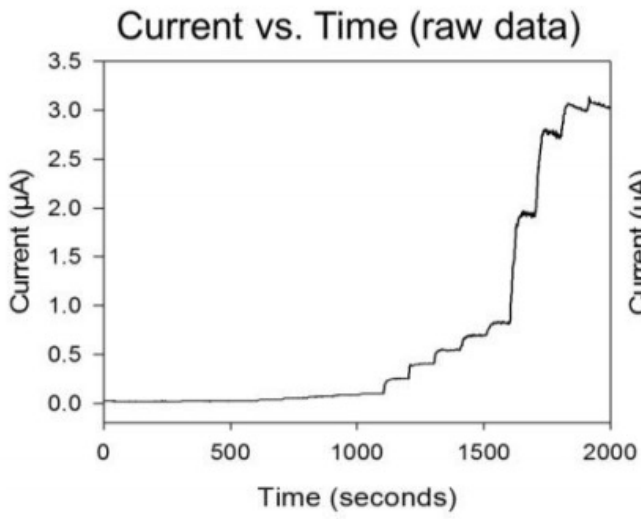
- Elettrodo di lavoro (WE)
- Elettrodo di riferimento (RE)
- Controelettrodo (CE)

In questa configurazione **la corrente viene fatta passare tra il WE e il CE** mentre **il potenziale di cella viene fissato tra il WE e il RE**. In questo modo il potenziale del tra WE e RE può venire controllato con maggior accuratezza, sopprimendo possibili effetti parassiti e fluttuazioni dovute alla corrente.



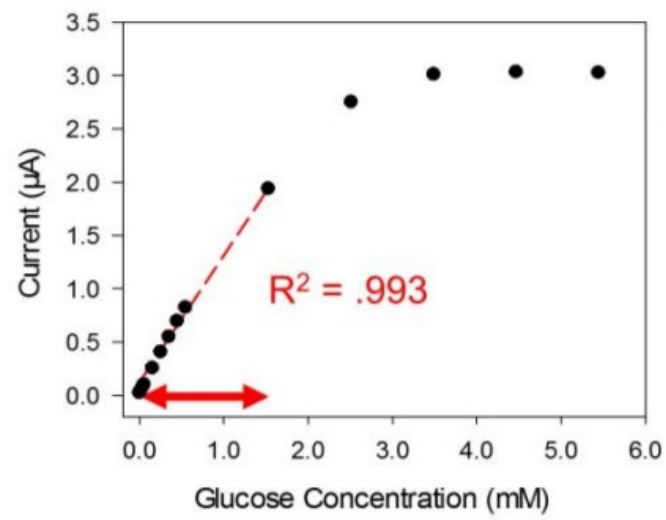
# Sensori di glucosio – caratteristiche

## Biosensor Characterization Parameters



### Linear Range

- Range in analyte concentration where the response is predictable (linear)
- Characterized by  $R^2$  value near 1

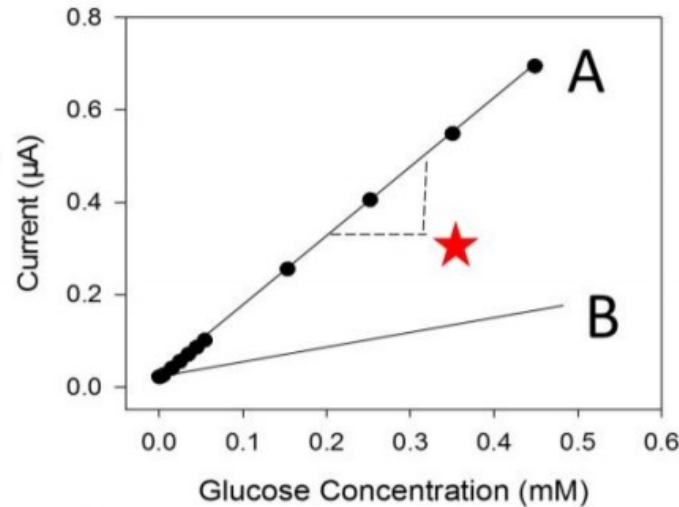


# Sensori di glucosio – caratteristiche

## Biosensor Characterization Parameters

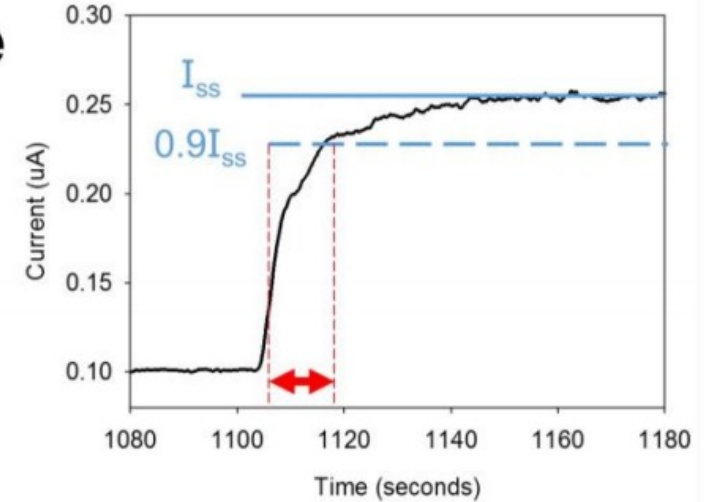
### Sensitivity

- Slope of the calibration curve
- Response per unit analyte
- Sensor A is more sensitive than sensor B



### Response Time

- Time from analyte addition to achieve 90% of steady state signal

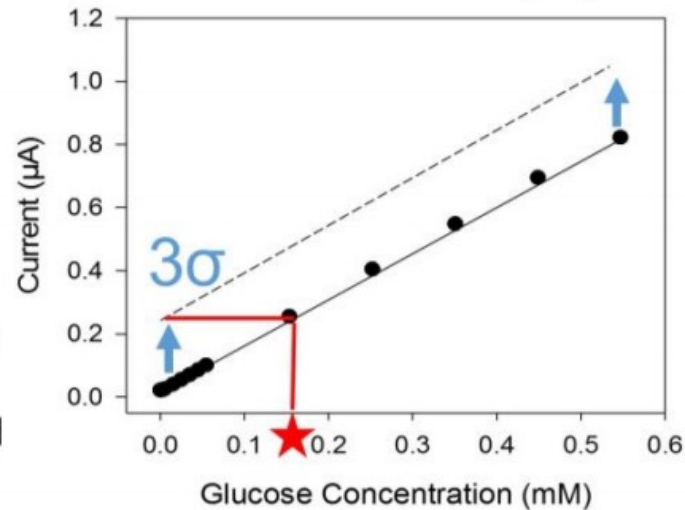


# Sensori di glucosio – caratteristiche

## Biosensor Characterization Parameters

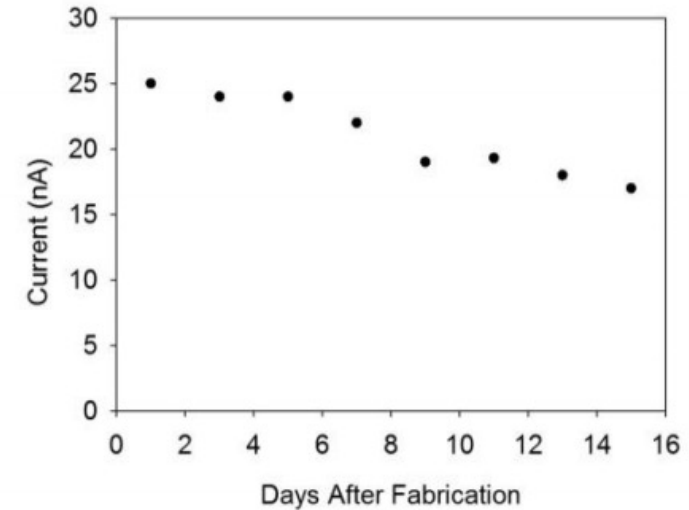
### Detection Limit

- Response that can be confidently (99%) distinguished from the background signal
- Response at 0 concentration shifted up by 3 standard deviations ( $3\sigma$ ) and projected



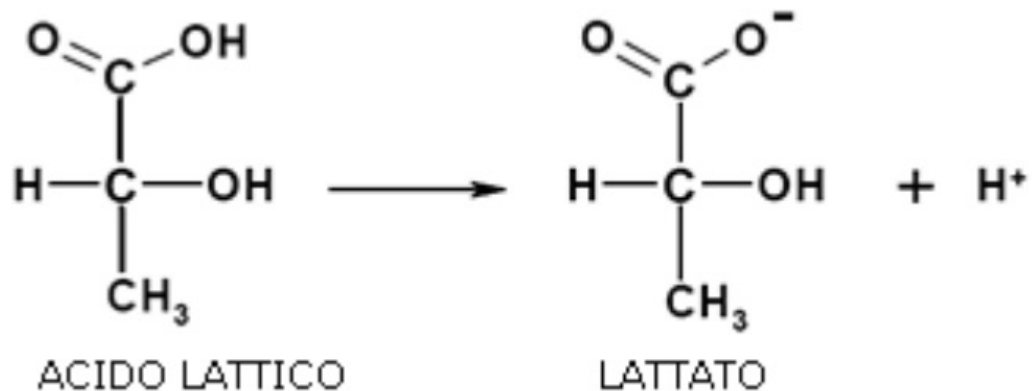
### Stability (Shelf Life)

- How much does the sensor decay with time?
- Importance depends on application

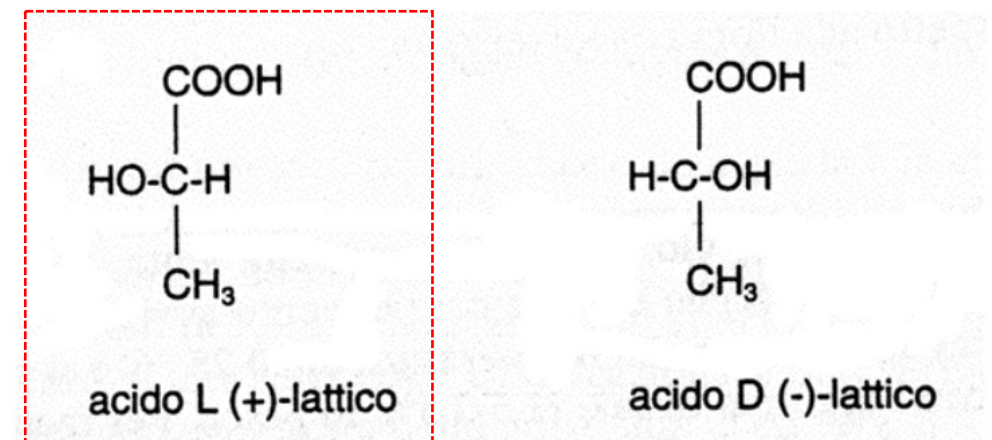


# Elettrodo per la misura del lattato

Il test del **livello di lattato nel sangue** è utile per valutare il livello di **acidosi lattica**, una situazione che, se protratta nel tempo, può portare alla **distruzione dell'equilibrio acido-base metabolico**. L'acidosi lattica può essere causata da condizioni di **ipossia** (inadeguata ossigenazione del sangue), **shock, avvelenamento da monossido di carbonio, farmaci e/o tossine, insufficienza epatica**. Un suo monitoraggio è particolarmente importante per pazienti in terapia intensiva o sotto intervento chirurgico. Sono considerati normali valori di acido lattico compresi tra 4,5 e 19,8 mg/100 ml per il sangue venoso e 4,5 e 14,4 mg/100 ml per quello arterioso (equivalenti a circa 1 – 2 mmol/l).



Enantiomeri dell'acido l'attico

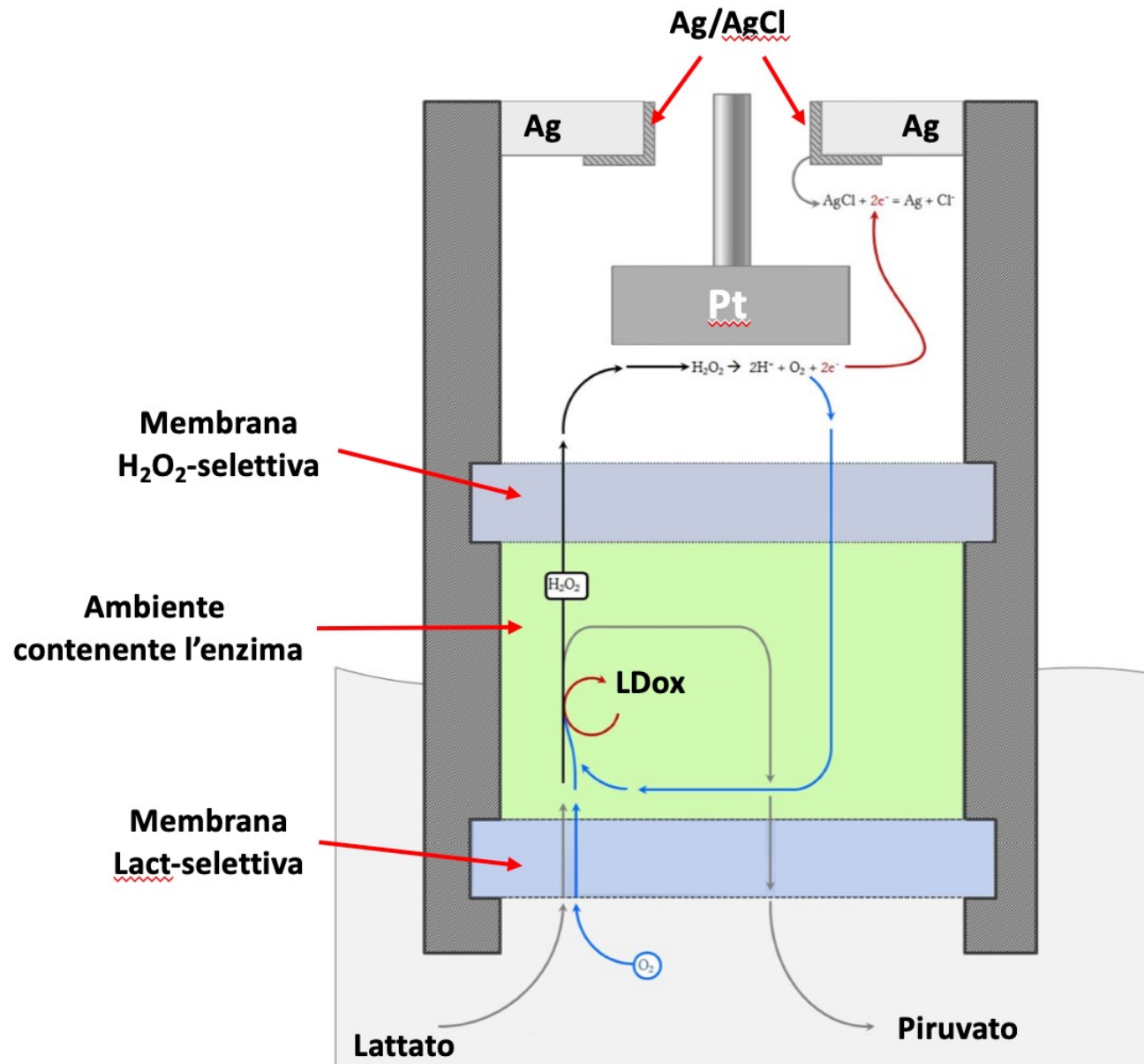


# Elettrodo per la misura del lattato

Come fatto per il generico sensore amperometrico per il glucosio, anche per il lattato è possibile utilizzare la configurazione generica multimembrana:

- Una membrana esterna permeabile al lattosio
- Un layer intermedio in cui è presente l'enzima
- Una membrana interna permeabile all' $\text{H}_2\text{O}_2$

Anche in questo caso la reale pratica clinica prevede l'**integrazione dell'enzima nella stessa membrana esterna**.

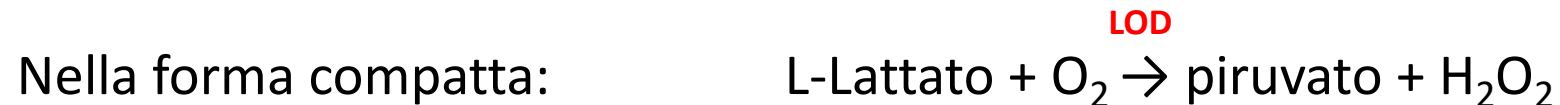
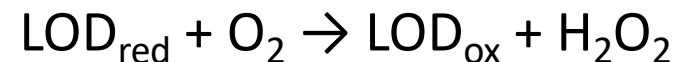


# Elettrodo per la misura del lattato

---

Vengono tipicamente utilizzati due diversi enzimi per la rilevazione del lattato. Uno è la lattato deidrogenasi (LDH) e l'altro è la lattato ossidasi (LOD). Nel caso del LOD, il **lattato viene ossidato in piruvato, consumando ossigeno e producendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**.

L' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffonde nella membrana interna e viene ridotto al catodo producendo O<sub>2</sub> il quale viene riusato nell'ossidazione del lattato.



# Elettrodo per la misura del lattato

---

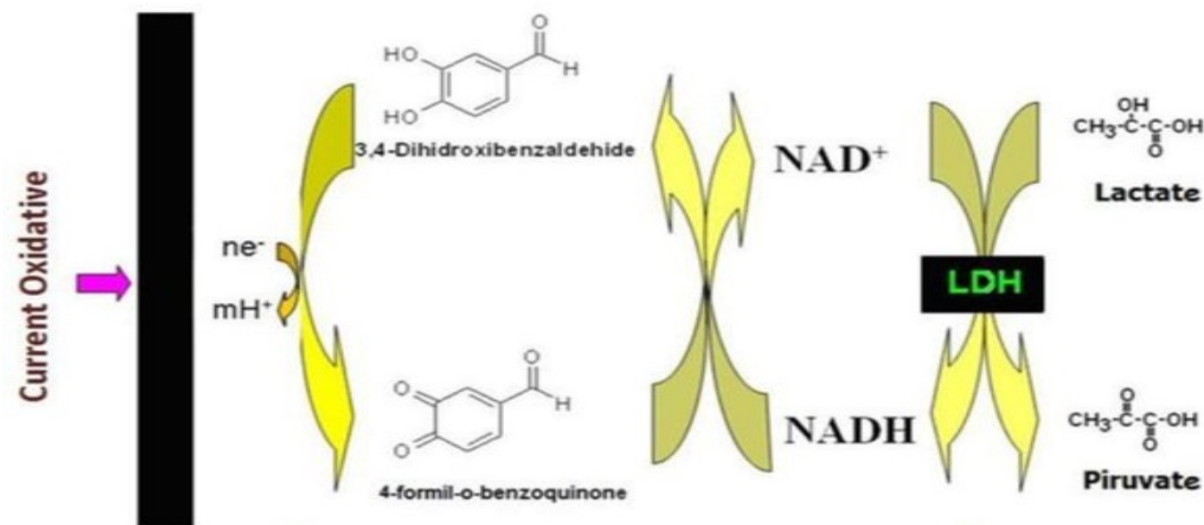
Oltre alla **dipendenza della reazione dall'ossigeno**, risolta con l'utilizzo di opportuni **mediatori redox**, un'altra problematica è legata alla sua cross-sensibilità ad altre molecole tra cui acido ascorbico, bilirubina, citrato, etanolo, eparina, glucosio, paracetamolo e urea.

La più consistente fonte di cross-interazione è data dalla presenza di **acido glicolico**, un prodotto del metabolismo dell'etilene glicole. **L'acido glicolico infatti è anch'esso un substrato per l'enzima lattato ossidasi** e questo può portare a letture del sensore più elevate della reale concentrazione di lattato.

# Elettrodo per la misura del lattato

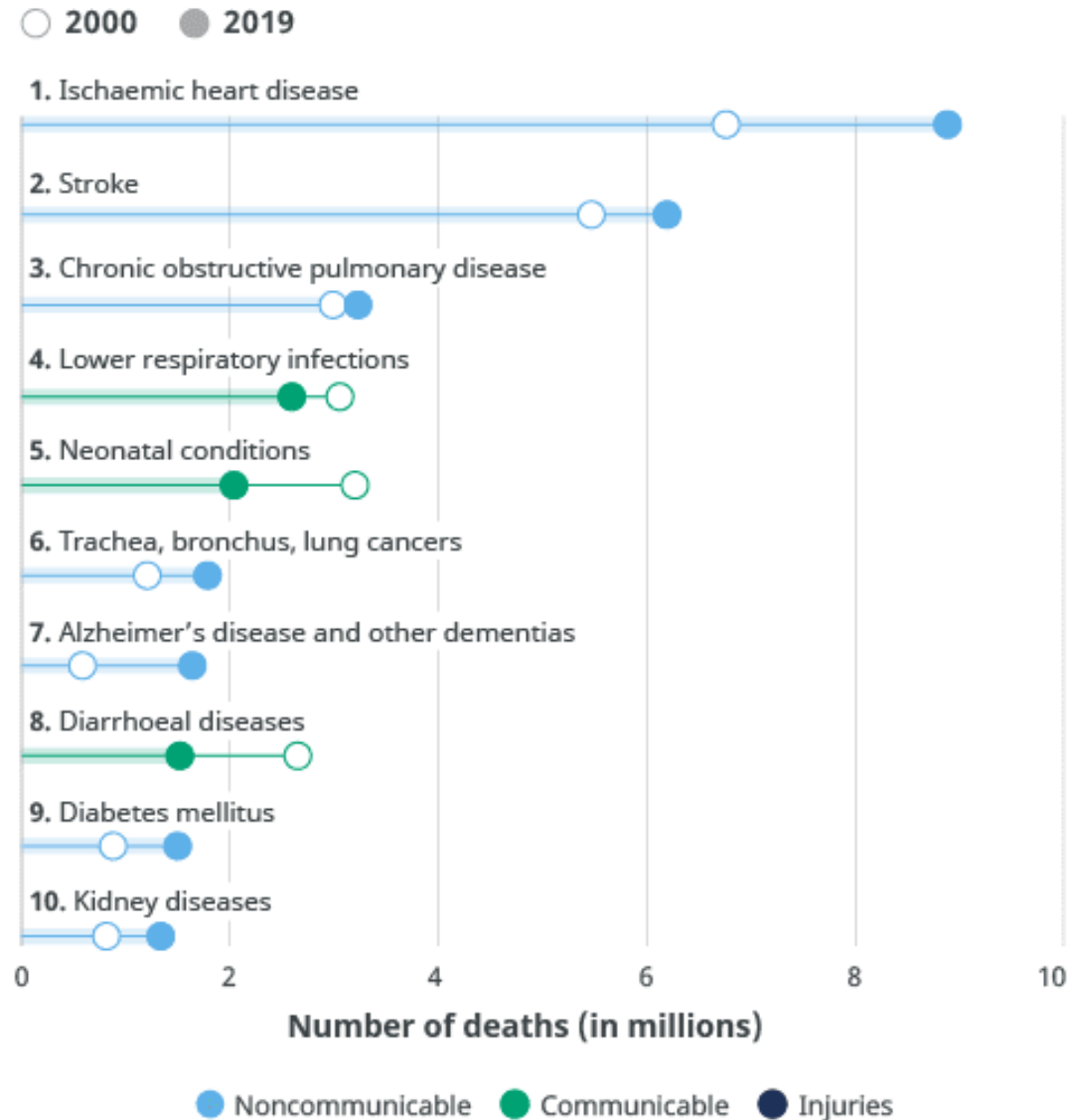
L'utilizzo dell'enzima LDH è solitamente preferito in applicazioni di laboratorio grazie alla sua **maggiore specificità**. L'LDH ossida l'acido lattico in piruvato e riduce l' $\text{NAD}^+$  in NADH con successiva produzione di due elettroni. Anche in questo caso possono venire utilizzati opportuni mediatori.

LDH



# Elettrodo per la misura del colesterolo

## Leading causes of death globally



<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

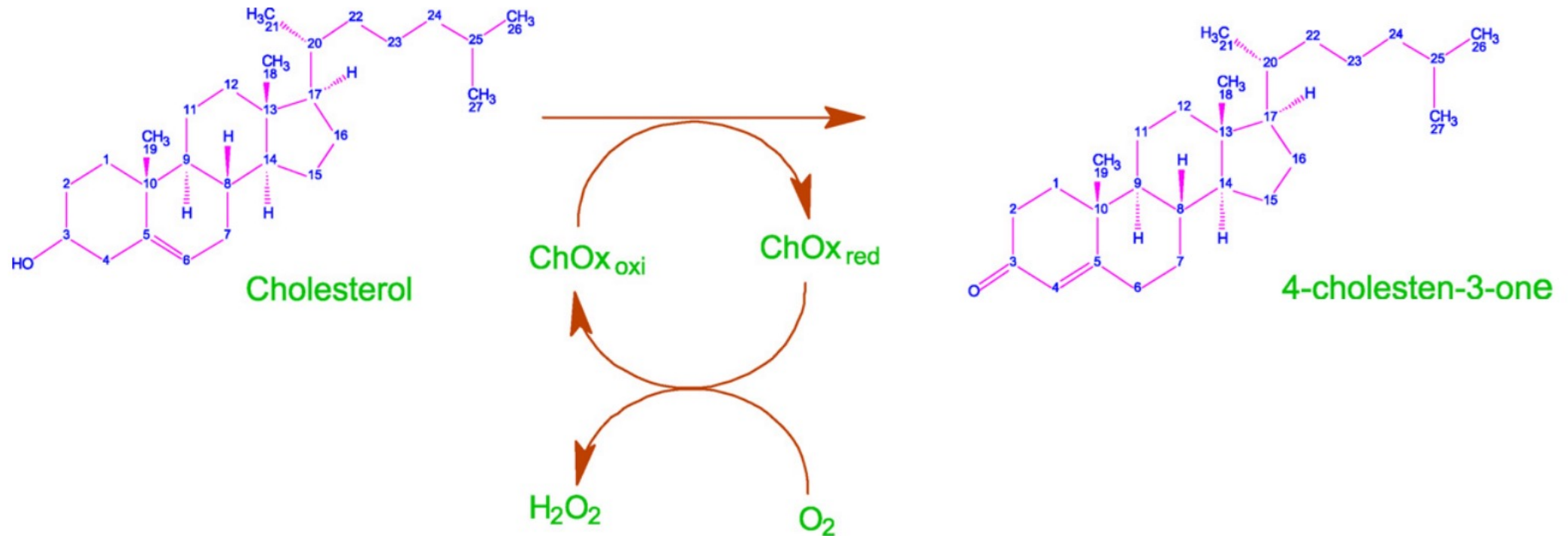
# Elettrodo per la misura del colesterolo

---

I decessi legati a patologie cardiovascolari sono in continua crescita, specialmente nel mondo industrializzato. Tra le possibili cause ci sono condizioni quali **ipertensione**, **arteriosclerosi** e **trombosi cerebrale** tutti disturbi collegati in qualche modo a **ipercolesterolemia**. Una stima della concentrazione di colesterolo nel sangue è dunque un importante indicatore clinico per la prevenzione e il trattamento tempestivo di queste condizioni.

Un metodo molto utilizzato per la rilevazione del colesterolo nel plasma è **amperometrico**, e si basa sull'utilizzo dell'enzima **colesterolo ossidasi (ChOx)**, che catalizza la reazione che porta alla formazione del metabolita cholest-4-ene-3-one a partire dal colesterolo libero.

# Elettrodo per la misura del colesterolo



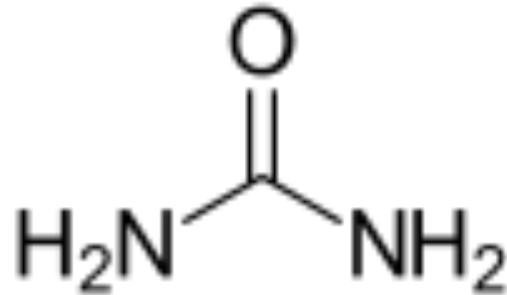
Anche questa reazione **dipende dalla presenza di  $O_2$** . Come nei casi analizzati in precedenza (biosensori per il glucosio e il lattato) l'utilizzo di opportuni mediatori contribuisce a risolvere il problema.

# Biosensori enzimatici – urea

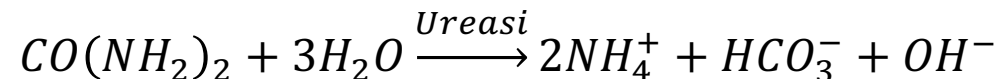
---

L'urea è un **prodotto del metabolismo dell'azoto**, e rappresenta un altro importante indicatore utilizzato per la **diagnosi di disfunzioni renali**. La sua concentrazione nel siero di un individuo sano è 15-40 mg/dl (pari a 2.5-7.5 mM), mentre valori da 180 a 480 mg/dl indicano uno stato più o meno grave di insufficienza renale.

Il suo monitoraggio è importante anche in **applicazioni ambientali** (l'urea gioca infatti un ruolo fondamentale nel ciclo nell'azoto marino; un suo eccesso, dovuto principalmente all'utilizzo di fertilizzanti azotati, è inoltre responsabile dell'acidificazione del terreno).



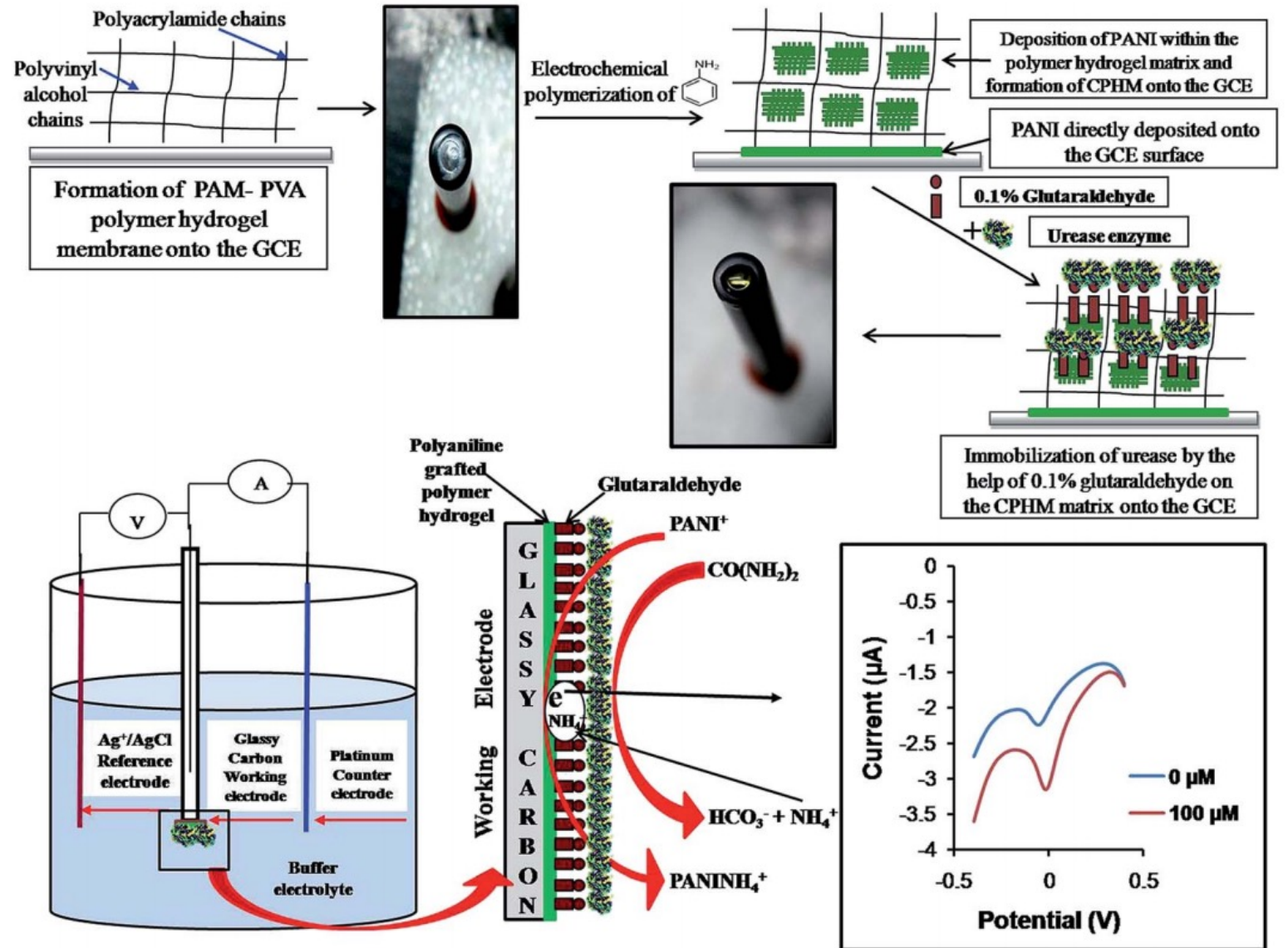
## Idrolisi dell'urea



# Biosensori enzimatici – urea (approccio amperometrico)

[...]The hydrolysis of urea by urease produced ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{OH}^-$ ) which increased the solution pH and hence protonated PANI...[...] There is an increase in the reduction peak current in the DPV for the UCPHM bioelectrode.

DPV: Differential Pulsed Voltammetry



# Biosensori enzimatici – urea (approccio amperometrico)

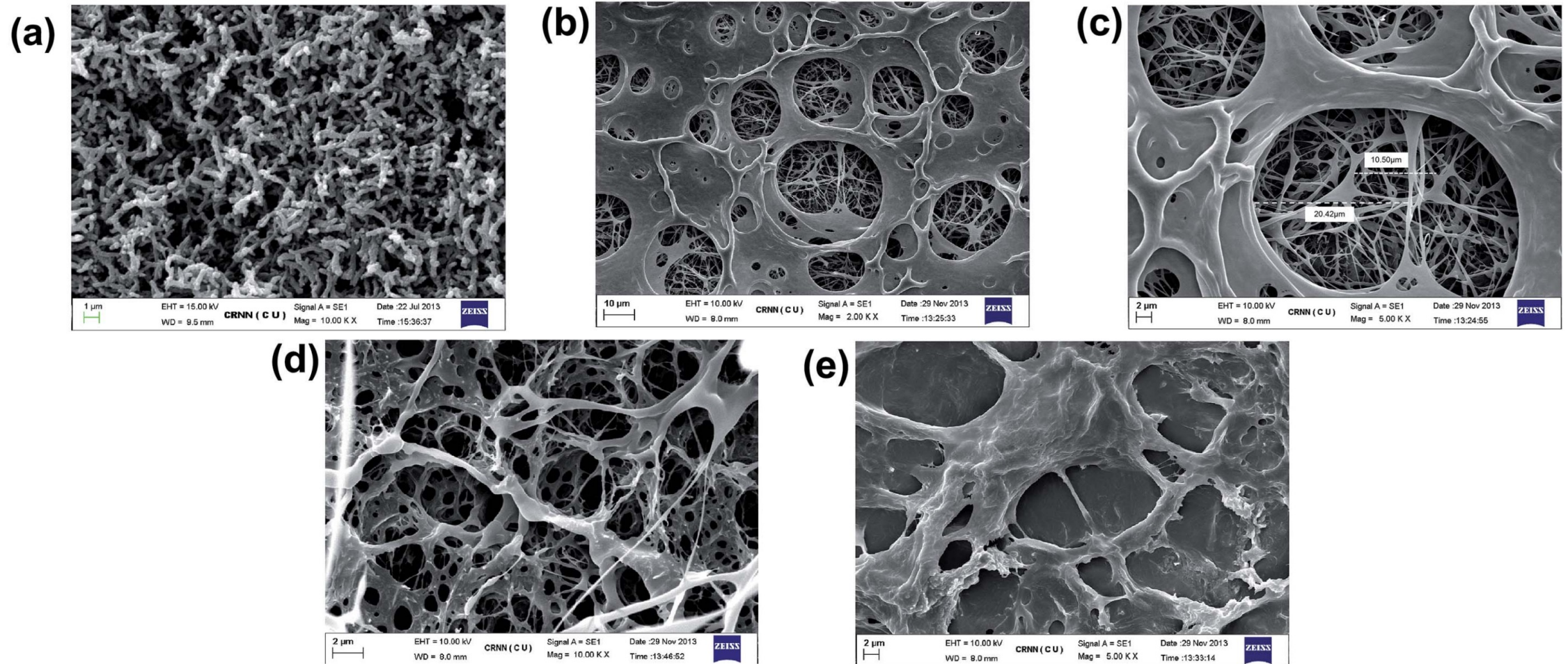
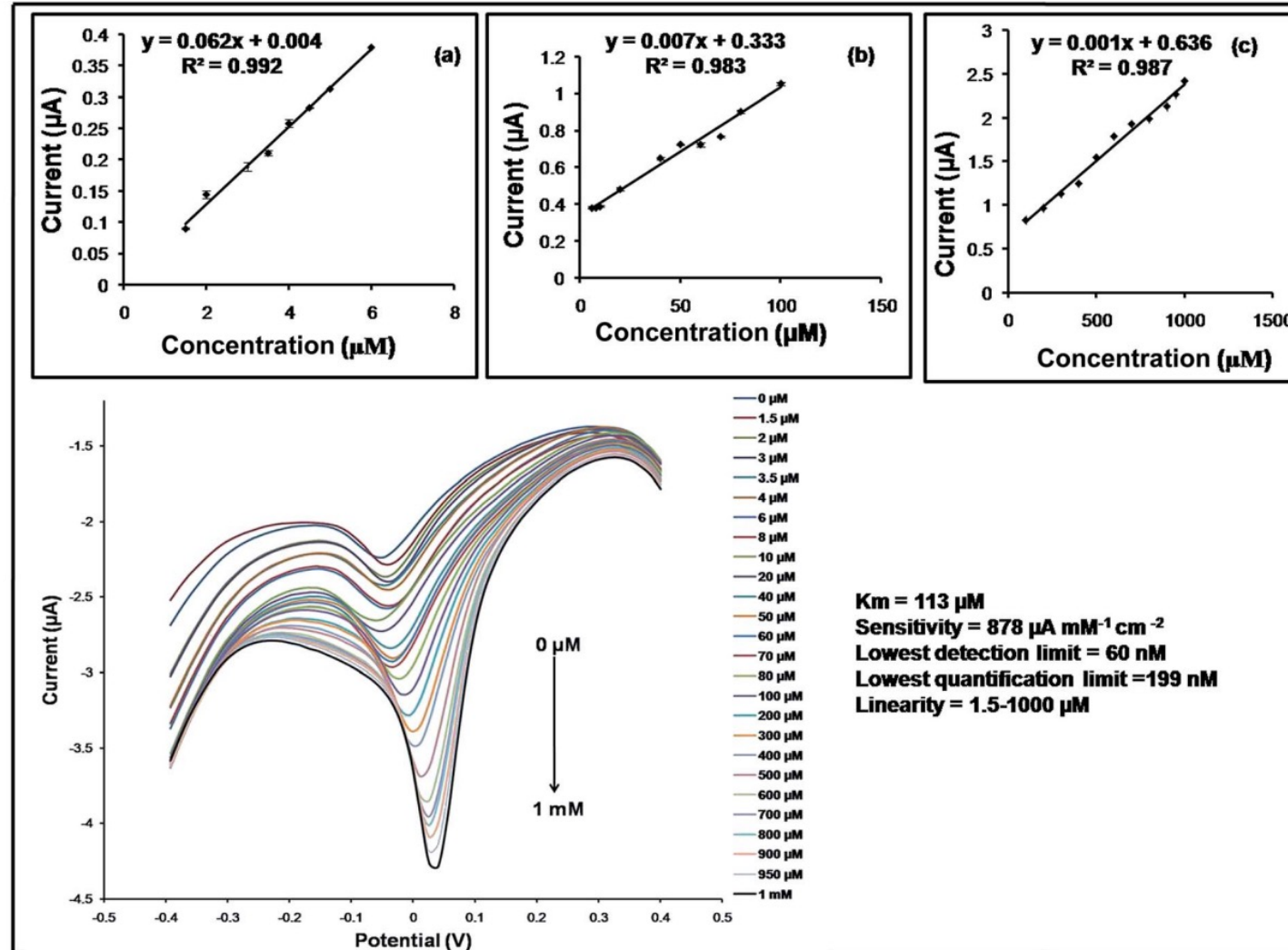


Fig. 3 SEM images of (a) PANI fibrous rod like structure, (b) and (c) porous PAM–PVA composite hydrogel membrane showing a smooth surface, (d) CPHM showing a rough surface due to the grafting of PANI in the porous PAM–PVA hydrogel, and (e) UCPHM.

# Biosensori enzimatici – urea (approccio amperometrico)



$$\text{LOD} = (3 \text{ SD})/S$$
$$\text{LOQ} = (10 \text{ SD})/S$$

“...SD is the standard deviation in the peak reduction current of the blank and S is the slope of the calibration plot for the urea concentration range of 1.5–6 mM.”

## Performance

“DPV could detect 1.5–1000 mM urea with the **lowest detection limit (LOD)** of 60 nM and **sensitivity** of 878 mA mM<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>. The relatively low **Michaelis–Menten constant (K<sub>m</sub>)** value of 113 mM indicates the high affinity of the enzyme for urea.”

Fig. 7 Electrochemical response of the UCPHM GCE as a function of urea concentration in the range of 0 to 1000 µM in 100 mM phosphate buffer solution, at pH = 7.1, and the corresponding calibration curve is shown in the inset as (a–c).

# Biosensori enzimatici – urea (approccio amperometrico)

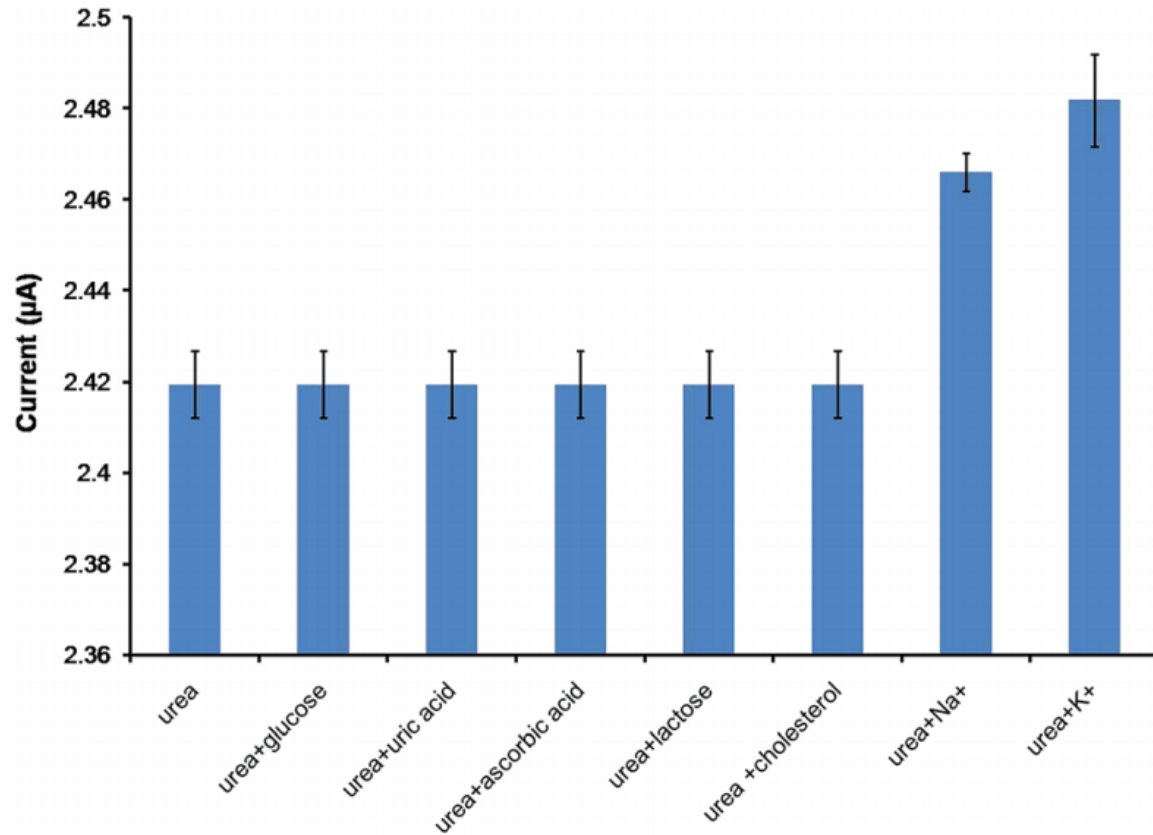


Fig. 9 Effect of interferences on the electrochemical response of the UCPHM GCE bioelectrode.

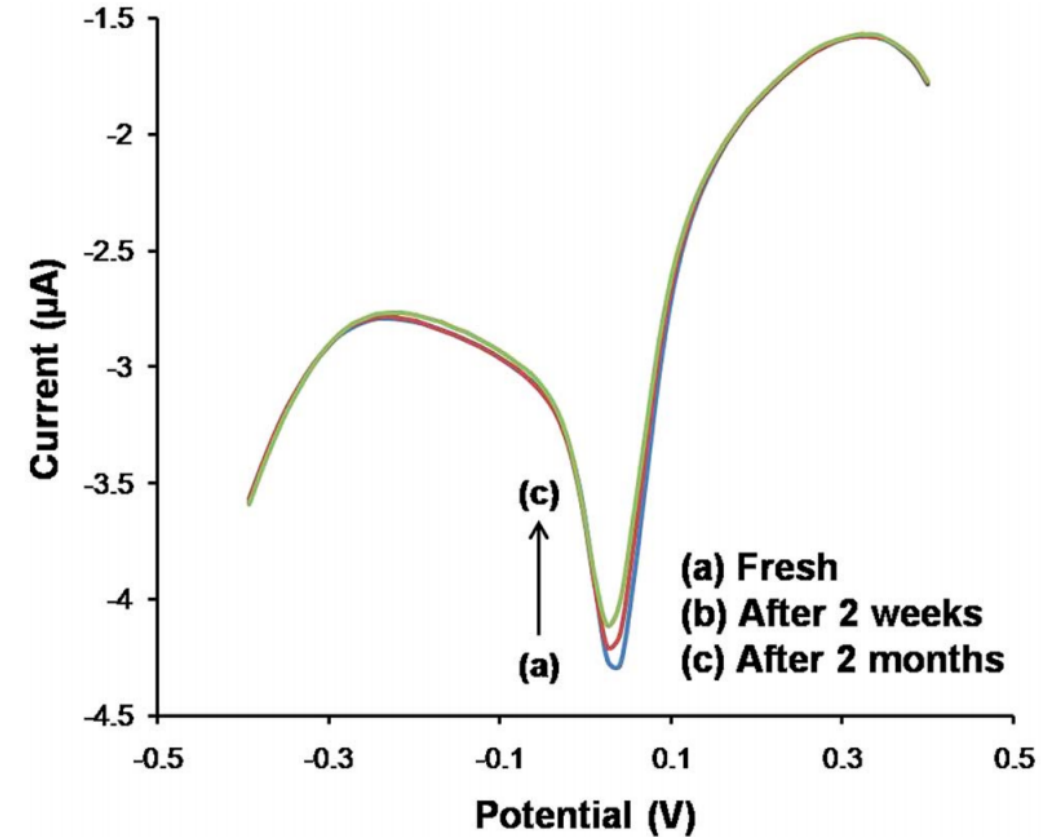


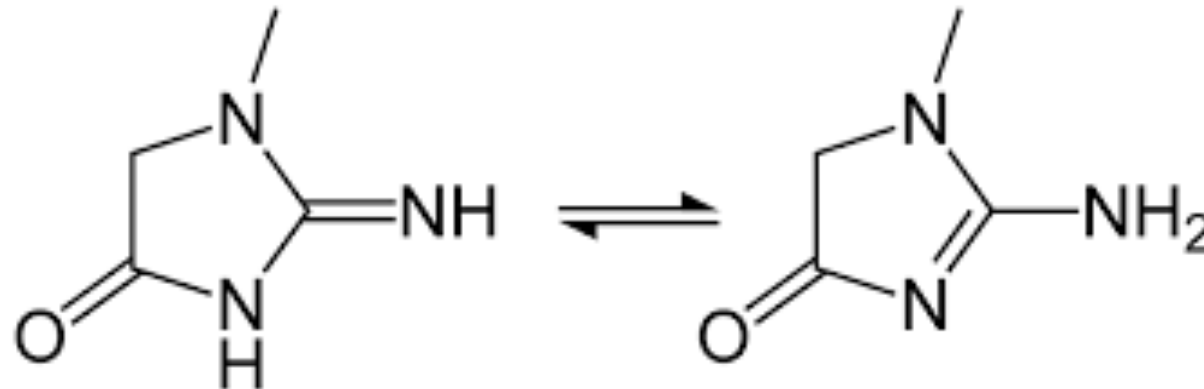
Fig. 10 Stability of the UCPHM GCE (fresh, after 2 weeks and after 2 months) in the presence of 1 mM urea in 100 mM phosphate buffer solution, at pH = 7.1.

# Biosensori enzimatici – creatinina

---

La creatina è un **prodotto del metabolismo degli aminoacidi** e costituisce una fonte di energia a livello muscolare. È trasportata nel sangue nella sua forma deidrogenata che prende il nome di **creatinina** e la sua concentrazione nel plasma di un individuo sano si aggira tra 0.7 e 1.2 mg/dl per l'uomo (corrispondente ad una concentrazione molare di 60-110  $\mu\text{mol/l}$ ) e 0.5 e 1 mg/dl per la donna (corrispondente ad una concentrazione molare di 45-90  $\mu\text{mol/l}$ ).

È prodotta dall'organismo ad un rate costante dipendente in parte dalla quantità di massa muscolare. **Una sua rilevazione a concentrazioni maggiori può essere indice di funzionalità renale compromessa.**

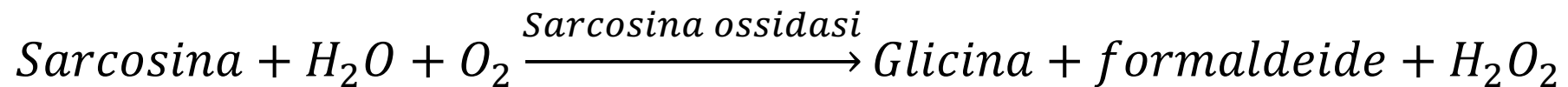
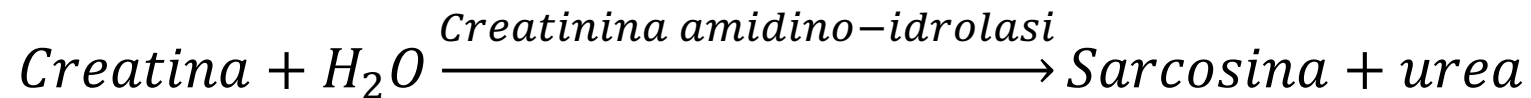
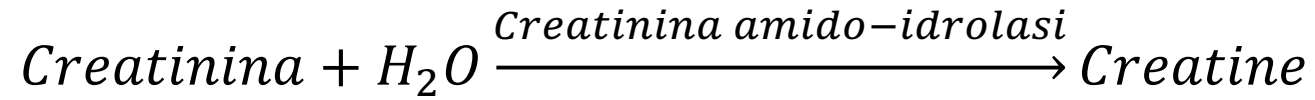


# Biosensori enzimatici – creatinina (approccio amperometrico)

---

## Biosensori amperometrici per la creatinina.

La maggioranza dei biosensori amperometrici per la creatinina si basano sull'utilizzo di un **sistema a tre enzimi**:



L'  $\text{H}_2\text{O}_2$  verrà coinvolta nella reazione di ossidazione sull'elettrodo di platino e la corrente generata sarà proporzionale alla concentrazione di creatinina iniziale.

# Biosensori enzimatici

---

## Approccio a tre enzimi

**PRO.** L'approccio a tre enzimi **augmenta la selettività.**

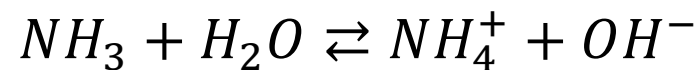
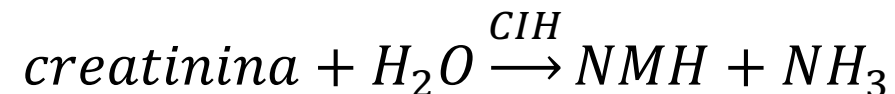
**CONTRO.** Maggior complessità (maggiori costi). **Diminuzione della sensibilità** dovuta alla presenza di più step catalitici.

# Biosensori enzimatici – creatinina (approccio potenziometrico)

---

Il primo biosensore potenziometrico per la creatinina è stato sviluppato nel 1976 da Meyerhoff e Reichnitz e si basava su un **elettrodo ionoselettivo sensibile allo ione ammonio  $NH_4^+$** .

L'elettrodo conteneva una **membrana ionoselettiva allo ione  $NH_4^+$**  in serie ad una membrana contenente **l'enzima creatinina iminoidrolasi**, il quale catalizza la seguente reazione che porta alla **formazione di N-metil-idantoina (NMH) e  $NH_4^+$**  a partire da creatinina e acqua:



# Biosensori enzimatici – creatinina (approccio potenziometrico)

La ricerca di nuovi ionofori per la realizzazione di **elettrodi ionoselettivi (dunque approccio potenziometrico)** per la creatinina sono ancora in corso...




Biosensors and Bioelectronics

Volume 87, 15 January 2017, Pages 587-592



## Characterization of a new ionophore-based ion-selective electrode for the **potentiometric** determination of creatinine in urine

Tomàs Guinovart <sup>a</sup>, Daniel Hernández-Alonso <sup>b</sup>, Louis Adriaenssens <sup>b, c</sup>, Pascal Blondeau <sup>a</sup>, F. Xavier Rius <sup>a</sup>, Pablo Ballester <sup>b, d</sup>, Francisco J. Andrade <sup>a</sup>  

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.025>

[Get rights and content](#)

### Abstract

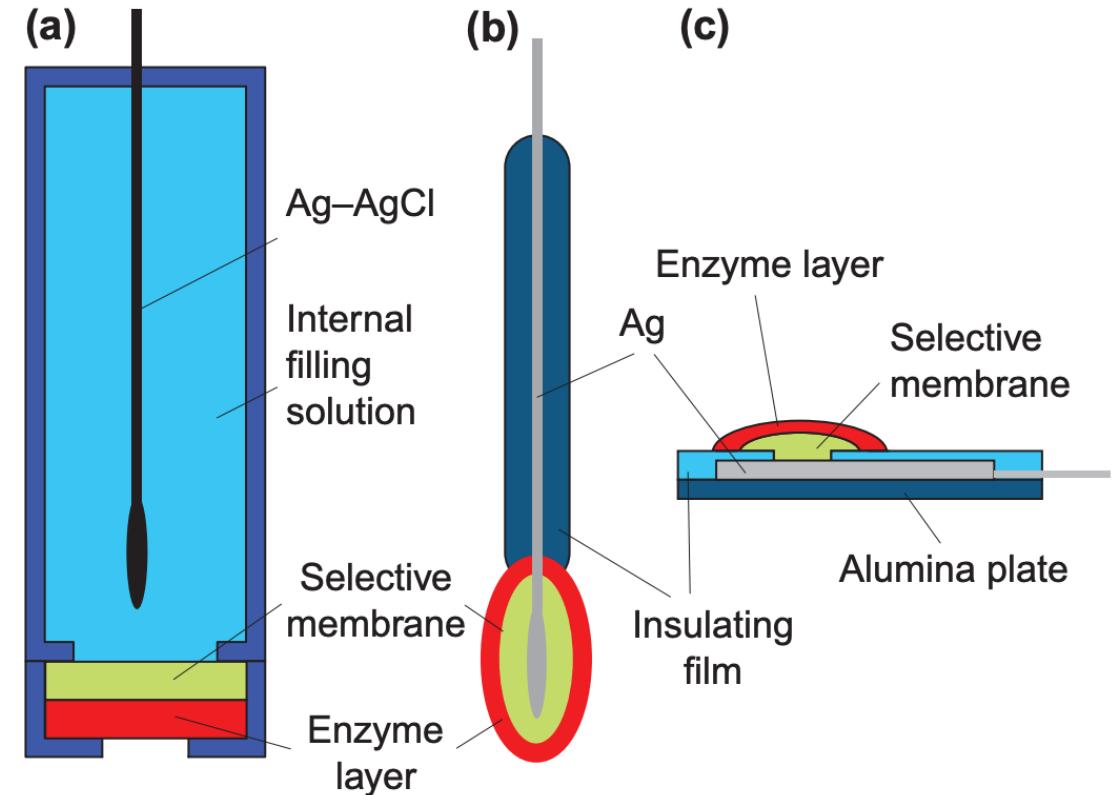
The optimization, analytical **characterization** and validation of a novel **ion-selective electrode** for the highly sensitive and selective determination of **creatinine** in urine is presented. A newly synthesized calix[4]pyrrole-based molecule is used as an **ionophore** for the enhanced recognition of creatininium **cations**. The calculation of the complex **formation constants** in the polymeric membrane with creatininium, potassium and sodium confirms the strong selective interactions between the ionophore and the target. The optimization of the **potentiometric** sensor presented here yields an outstanding analytical performance, with a **linear range** that spans from 1  $\mu\text{M}$  to 10 mM and limit of detection of  $10^{-6.2}$  M. The calculation of the selectivity coefficients against most commonly found interferences also show significant improvements when compared to other sensors already reported. The performance of this novel sensor is tested by measuring creatinine in real **urine samples** (N=50) and comparing the values against the standard colorimetric approach (Jaffé's reaction). The results show that this sensor allows the fast and accurate determination of creatinine in real samples with minimal sample manipulation.

# Biosensori enzimatici – creatinina (approccio potenziometrico)

I moderni sensori potenziometrici per la rilevazione della creatinina sono basati sullo stesso principio (sfruttano quindi l'enzima **creatinina iminoidrolasi - CIH**).

Possono essere principalmente di 3 tipi:

- La configurazione classica (macroelettrodo con riferimento in Ag/AgCl)
- Elettrodo compatto con riferimento in Ag
- Sensore allo stato solido con elettrodo in Ag.



# Biosensori enzimatici – creatinina

---

## Approccio a singolo enzima

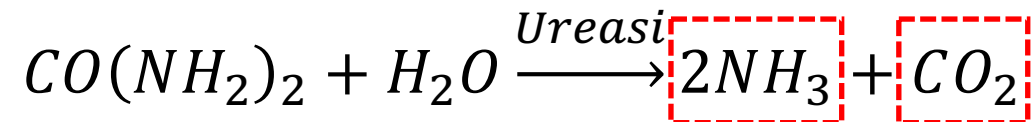
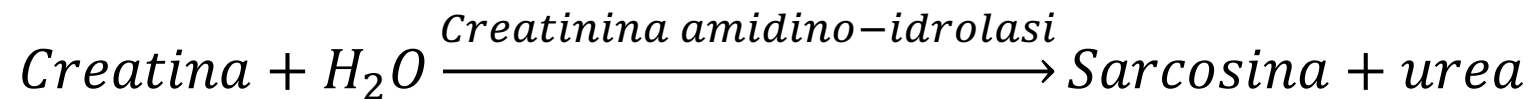
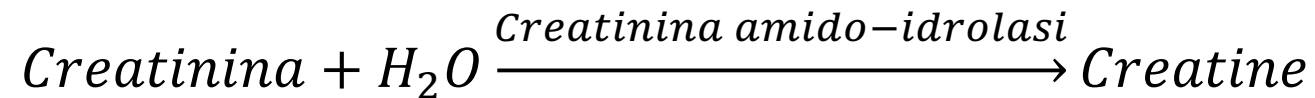
**PRO.** Semplicità: sono basati sull'ormai ben noto principio degli elettrodi ione selettivi.

**CONTRO.** Sono soggetti ad **interferenze significative** dovute alla presenza di  $NH_4^+$  endogeno (in particolare se utilizzato su campioni di urina).

# Biosensori enzimatici potenziometrici – creatinina e urea

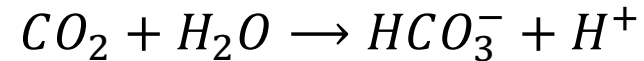
---

**Approccio a tre enzimi.** Sfrutta la **decomposizione della creatinina in creatina**, della **creatina in urea** e dell'**urea in ammoniaca e CO<sub>2</sub>**:

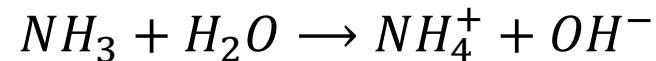


# Biosensori enzimatici potenziometrici – creatinina e urea

La  $\text{CO}_2$  reagisce con l'acqua secondo la ben nota reazione:

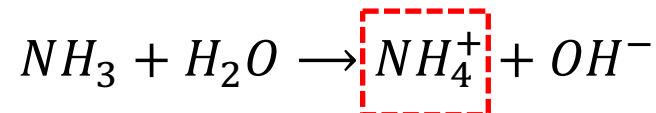
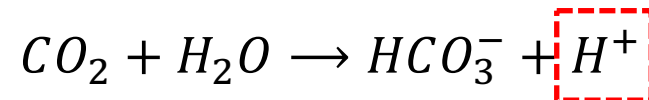
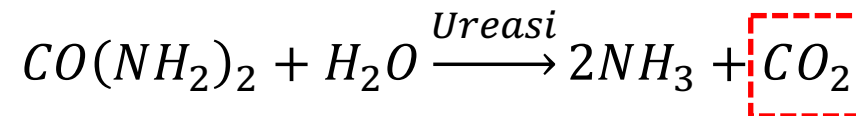


Mentre l'ammoniaca darà la seguente reazione:



L'urea (così come la creatinina) può dunque essere rilevata utilizzando diversi approcci tra cui

- sensori di  $\text{CO}_2$  (**Severinghaus**)
- **Elettrodi ionoselettivi per l'ammonica**
- Elettrodi per il **pH**



# Biosensori enzimatici – Pros and Cons generali

---

Biosensori enzimatici (o catalitici). Sfruttano la **capacità degli enzimi di catalizzare in modo specifico alcune reazioni chimiche** diminuendone l'energia di attivazione e dunque accelerandole.

**PRO.** Come per tutti i catalizzatori, **gli enzimi non vengono consumati dalla reazione** e dunque non alterano l'equilibrio chimico del sistema. Generalmente presentano **bassi costi. Rapido avanzamento tecnologico** negli ultimi 20 anni (grande interesse nella ricerca in questo campo). **Numero elevato di enzimi disponibili. Facilità di utilizzo:** essenziale nell'ambito di applicazioni point-of-care.

**CONTRO.** Gli **enzimi sono molto sensibili a variazioni conformazionali (problema nella loro immobilizzazione)**. La loro **durata è tipicamente limitata a qualche mese**. Possibili **risposte aspecifiche. Sensibilità dipendente dalla forza ionica della soluzione.**

# Biosensori enzimatici – Pros and Cons 2

---

## Specifici dei sensori enzimatici amperometrici

### Vantaggi

- Sensibilità solitamente più alta di quelli potenziometrici
- Risposta meno influenzata dal drift dell'elettrodo di riferimento
- Facilità di utilizzo: essenziale nell'ambito di applicazioni **point-of-care**

### Svantaggi

- Ogni analita ha un suo **potenziale di lavoro che potrebbe però avere in comune con altri analiti**
- L'analita si consuma durante la reazione, riducendo il tempo di utilizzo del sensore

# Tecniche di funzionalizzazione - enzimi

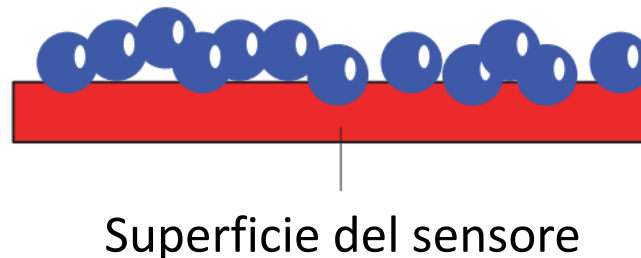
---

Metodi di immobilizzazione **fisica**.

**Adsorbimento:** si basa su **interazioni reversibili a lungo raggio** (van der Waals) tra enzima e supporto. senza modifiche chimiche. La resa dell'adsorbimento è strettamente legata alla concentrazione di enzima esposto per unità di superficie del supporto stesso durante il processo di immobilizzazione.

I **vantaggi** dell'adsorbimento sono la **facilità** di realizzazione della procedura, l'**economicità**, la **minimizzazione dei danni arrecati all'enzima** e l'**assenza di reagenti**.

Gli **svantaggi** sono dovuti principalmente alla **debolezza dei legami coinvolti**, effetto che può portare alla desorbimento dell'enzima e dunque contaminazione della soluzione.



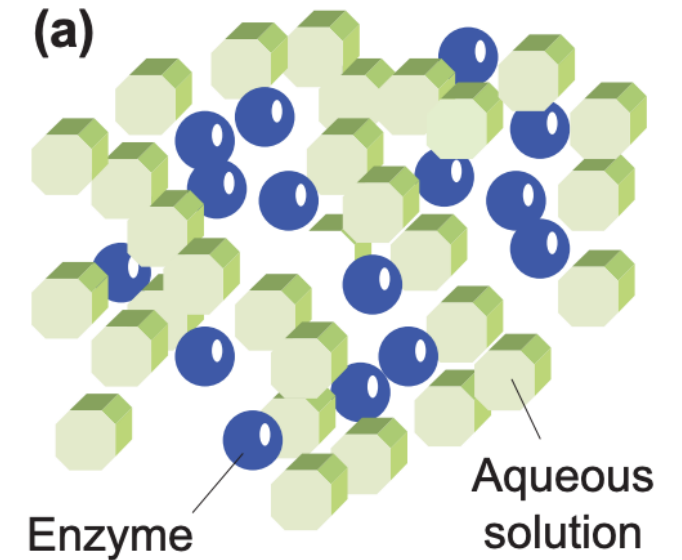
# Tecniche di funzionalizzazione - enzimi

Metodi di immobilizzazione **fisica**.

**Intrappolamento in matrici gel:** si basa sull'integrazione delle molecole enzimatiche nel reticolo di una matrice gel. Tale matrice è ingegnerizzata in modo da permettere la **diffusione dei substrati e dei prodotti ma non il rilascio dell'enzima**.

I **vantaggi** sono la versatilità (è utilizzabile con praticamente tutti i tipi di enzimi), la semplicità, l'economicità e la stabilità.

Gli **svantaggi** principali sono spesso legati alla necessità della **radiazione ultravioletta in fase di polimerizzazione della matrice**, radiazione che può portare a denaturazione di una parte dell'enzima immobilizzato con conseguente perdita dell'attività e dunque diminuzione della sensibilità globale del sensore.



# Tecniche di funzionalizzazione- enzimi

---

Metodi di immobilizzazione **chimica**.

**Immobilizzazione mediante legame covalente:** questa tecnica di immobilizzazione consiste nell'**ancoraggio** delle molecole di bioriconoscimento sulla superficie del supporto **tramite legami covalenti** fra i gruppi funzionali della molecola e gruppi presenti sulla superficie del supporto.

**Vantaggi:** il legame covalente rende il **sistema di immobilizzazione estremamente stabile**, anche in presenza di condizioni operative non ideali e campioni ad alta forza ionica.

Gli **svantaggi** sono ovviamente legati alla **complessità** di questa tecnica di immobilizzazione (una parte importante del processo è quella di garantire al sito attivo, per esempio, di un enzima di essere disponibile per la reazione in cui è coinvolto).

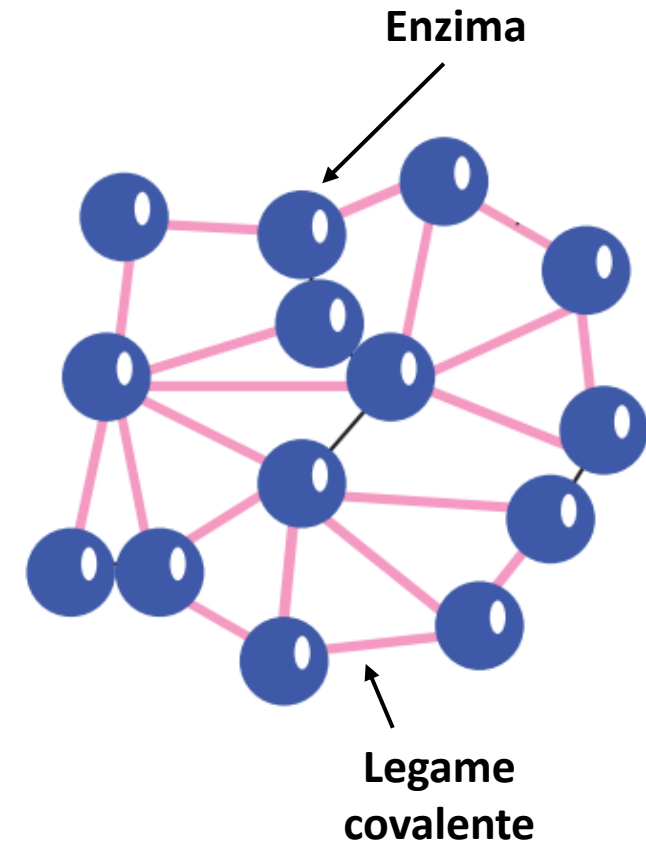
# Tecniche di funzionalizzazione - enzimi

Metodi di immobilizzazione **chimica**.

**Cross-linking:** vengono creati **legami covalenti tra gli enzimi** in modo da formare degli aggregati tridimensionali insolubili in acqua.

Il **vantaggio** principale di questa tecnica è il **forte legame tra le biomolecole**. Questo preserva l'enzima e impedisce la sua fuoriuscita in soluzione.

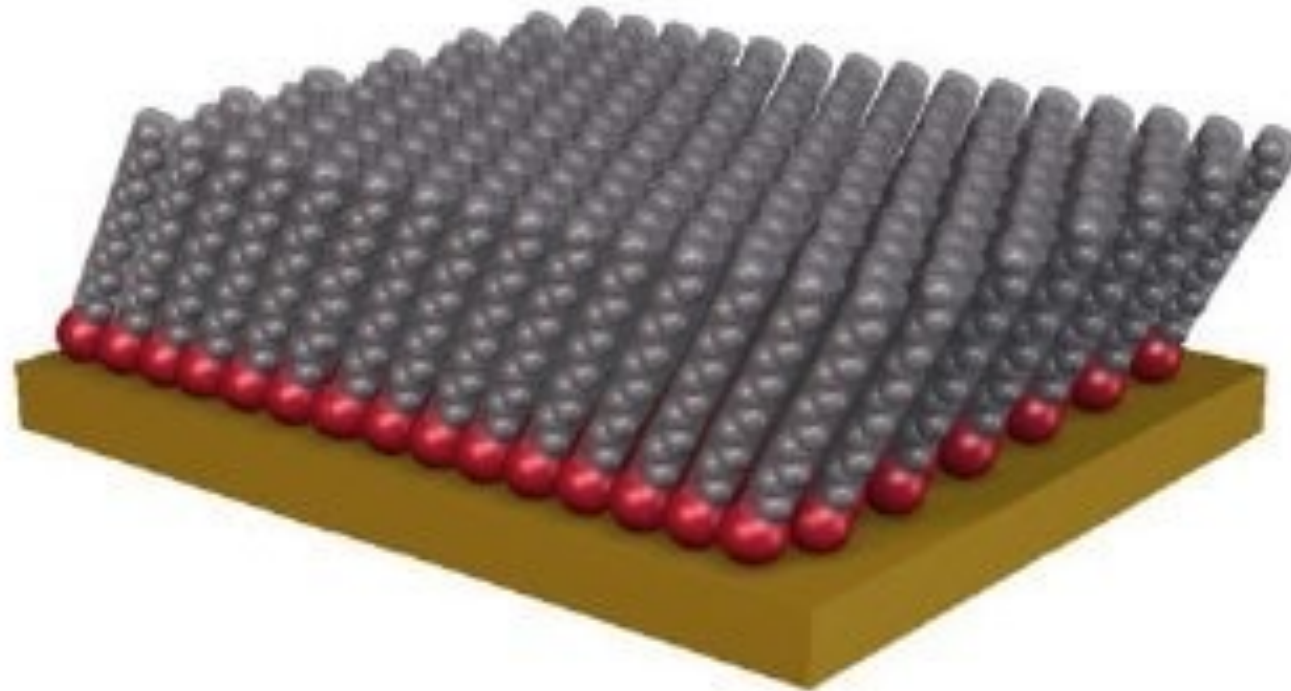
Gli **svantaggi** sono invece principalmente legati al fatto che la conformazione di alcuni di questi aggregati **limita parzialmente la diffusione del substrato verso l'enzima e dei prodotti verso l'elettrodo**.



# Tecniche di funzionalizzazione – layer molecolari

---

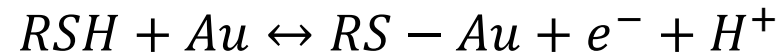
**Self Assembled Monolayer (SAM).** Il processo di auto-assemblamento (self-assembly) avviene in natura in situazioni quali la **formazione di membrane lipidiche** o fenomeni di ibridazione (es. DNA). Il self-assembly è governato da forze inter e intra molecolari quali **ponti idrogeno, interazioni elettrostatiche e forze di van der Waals.**



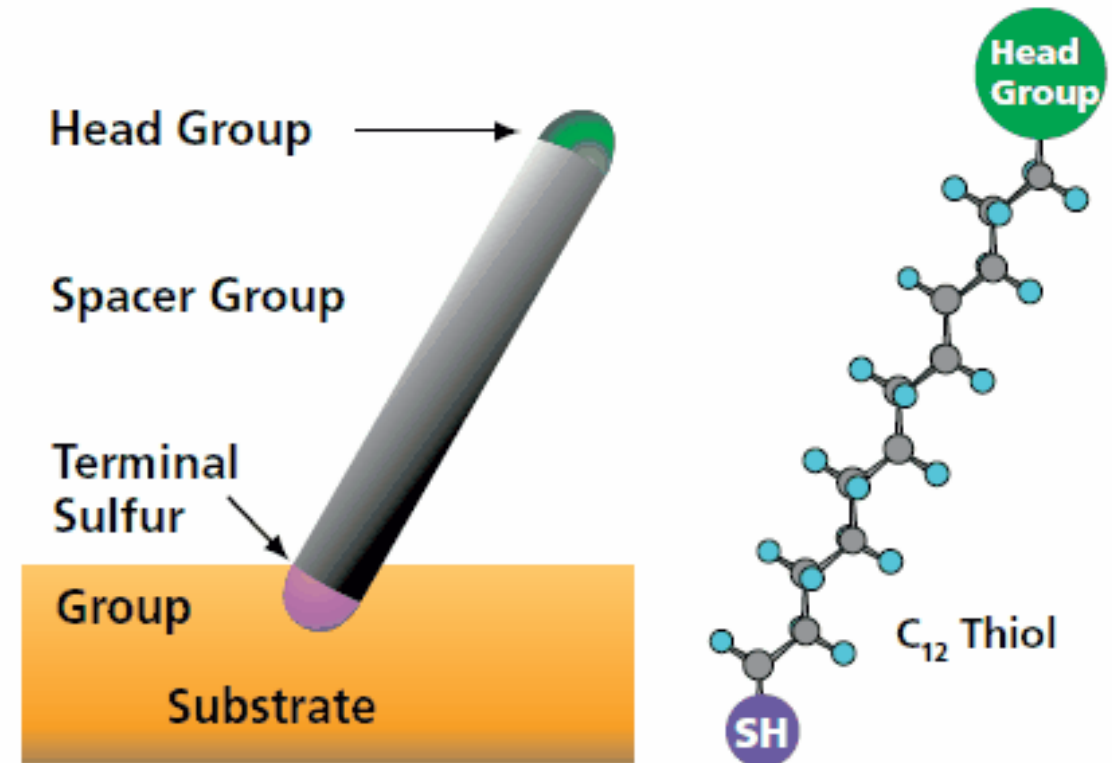
# Tecniche di funzionalizzazione – layer molecolari

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/material-matters/self-assembled-monolayers.html>

Esempio: legame **Tiolo-Au**



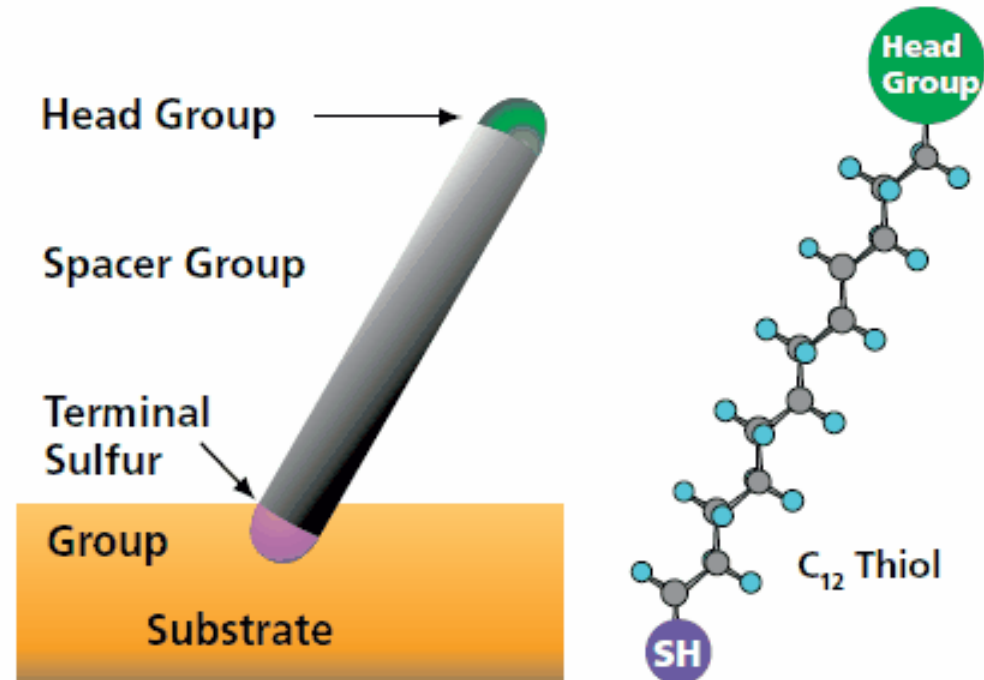
Nel caso di molecole tiolate che presentano una catena alchilica, un'altra forza che entra in gioco è l'interazione idrofobica tra le catene. Questa interazione porta al caratteristico "tilt" delle catene stesse (massimizzazione dell'interazione e diminuzione dell'energia superficiale).



L'interazione tra oro e gruppi tiolo, pur non essendo covalente, è caratterizzata da alte forze di legame (45 kcal/mol, contro i circa ~83 kcal/mol del legame C—C).

# Tecniche di funzionalizzazione – layer molecolari

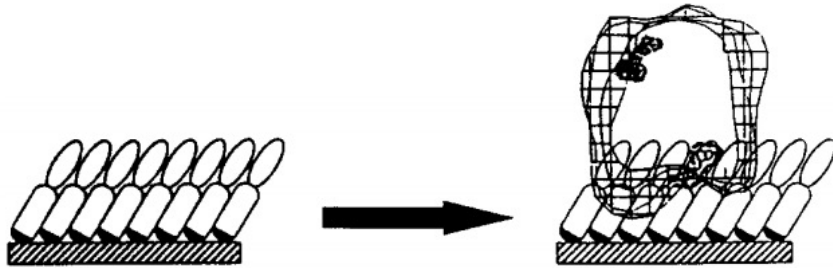
I tioli vengono comunemente utilizzati come **molecole di ancoraggio per la funzionalizzazione di superfici d'oro** (dunque comuni in biosensori basati su SPR e QMB, ma anche basate su FET in alcuni casi particolari). **Il terminale –SH funge da “ancora”** mentre il gruppo di testa viene usato per ancorare la molecola di bioriconoscimento d'interesse.



# Tecniche di funzionalizzazione – layer molecolari

**WARNING:** spesso l'impacchettamento (che comunque si tende a voler massimizzare) provoca problematiche dovute all'ingombro sterico delle molecole di bioriconoscimento. **Soluzione:** spacer.

**A**



Esempio. Immobilizzazione di molecole di streptavidina.

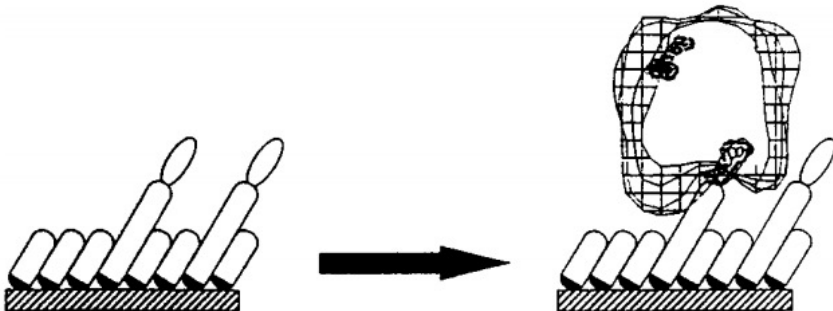
**Caso A.** Nessuno spacer. La struttura (e dunque la funzionalità) della molecola è alterata dalla sua interazione con il SAM di tioli

**B**



**Caso B.** Spacer 1. alternanza tioli funzionalizzati e non funzionalizzati. Minor interazione ma ancora situazione non ideale.

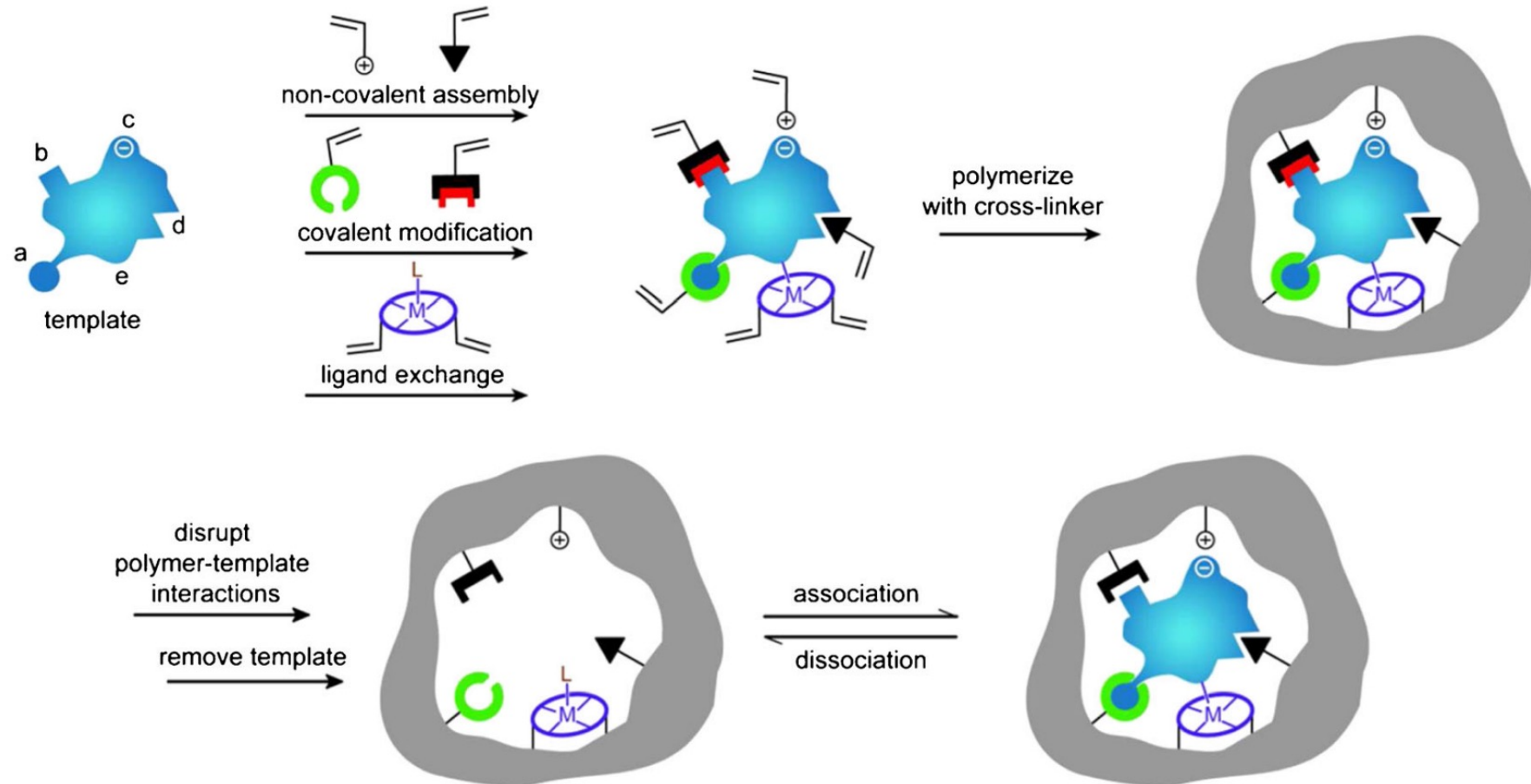
**C**



**Caso C.** Spacer 2. Tioli a diversa lunghezza. L'interazione della streptavidina con le altre molecole del SAM è minimizzata.

# Tecniche di funzionalizzazione – Molecular imprinting

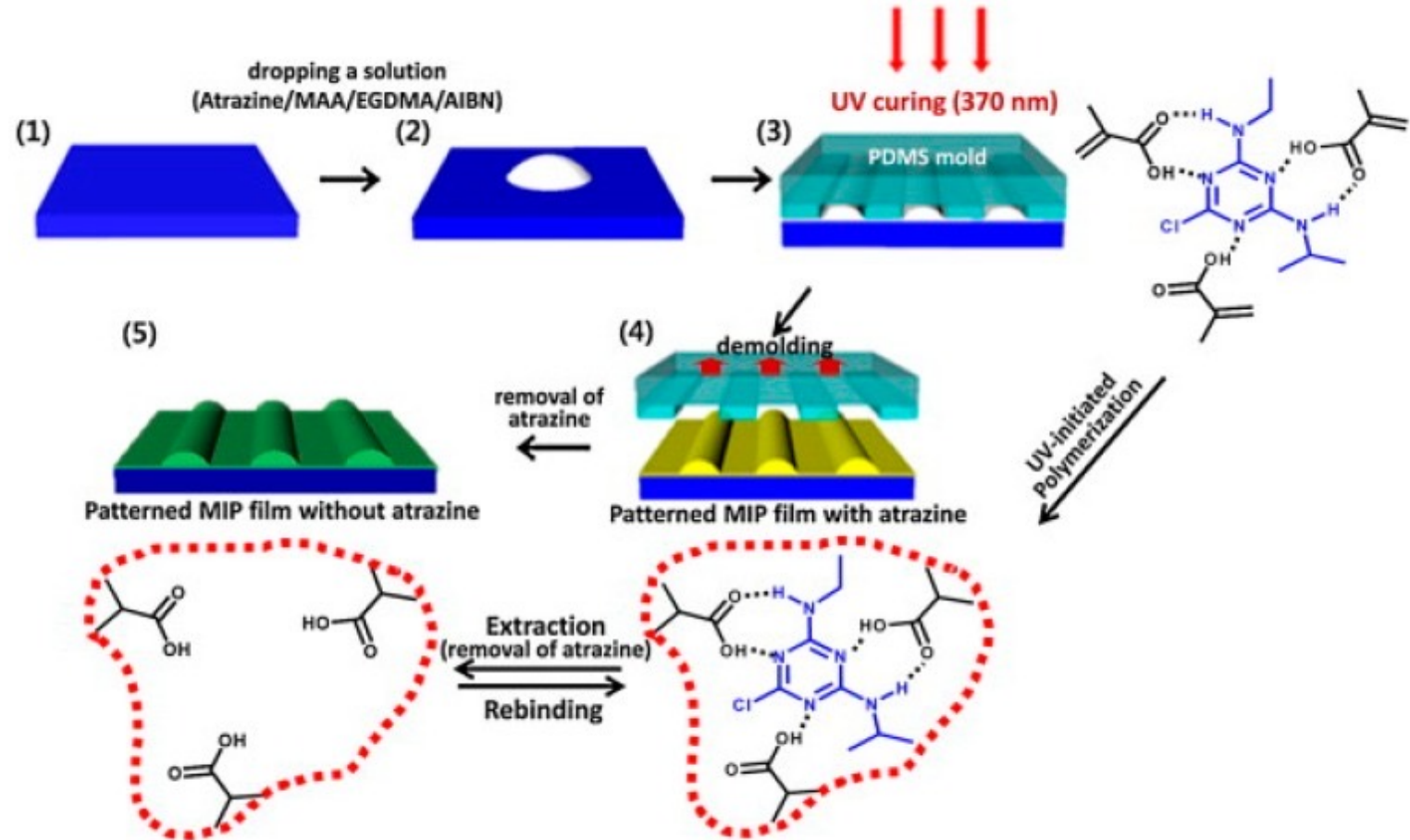
**Molecular imprinting** è una tecnica che permette di creare siti di rilevazione artificiali in matrici polimeriche. Questo siti sono complementari in termini di **dimensioni**, **forma** e **disposizione di gruppi funzionali**.



# Tecniche di funzionalizzazione – Molecular imprinting

Realizzazione di film MIP **tramite soft**

**lithography e polimerizzazione UV.** (1–2) Una soluzione contenente le molecole target e agenti di cross-link viene depositata sulla superficie da funzionalizzare. (3) Uno stampo (tipicamente di PDMS) viene posizionato sopra la soluzione e una certa pressione viene applicata allo stesso. In questa fase viene effettuata la polimerizzazione UV. (4) Dopo l'asciugatura, lo stampo viene rimosso e le molecole target vengono rimosse chimicamente dalla superficie, lasciando la superficie **patternata e funzionalizzata**.

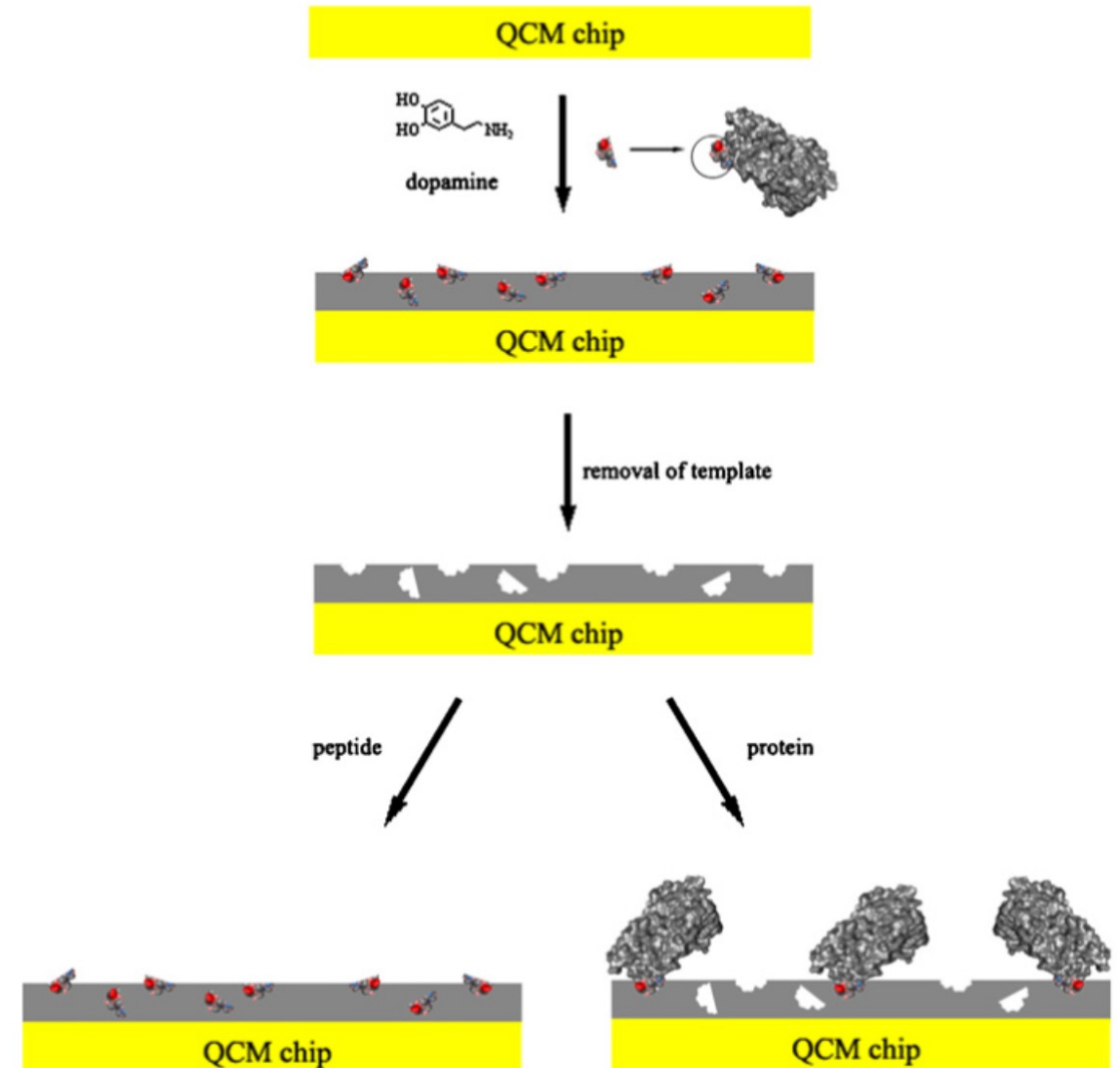


Yang J.C., Shin H.-K., Hong S.W., Park J.Y. Lithographically patterned molecularly imprinted polymer for **gravimetric detection** of trace atrazine. *Sens. Actuators B Chem.* 2015;216:476–481. doi: 10.1016/j.snb.2015.04.079.

# Tecniche di funzionalizzazione – Molecular imprinting

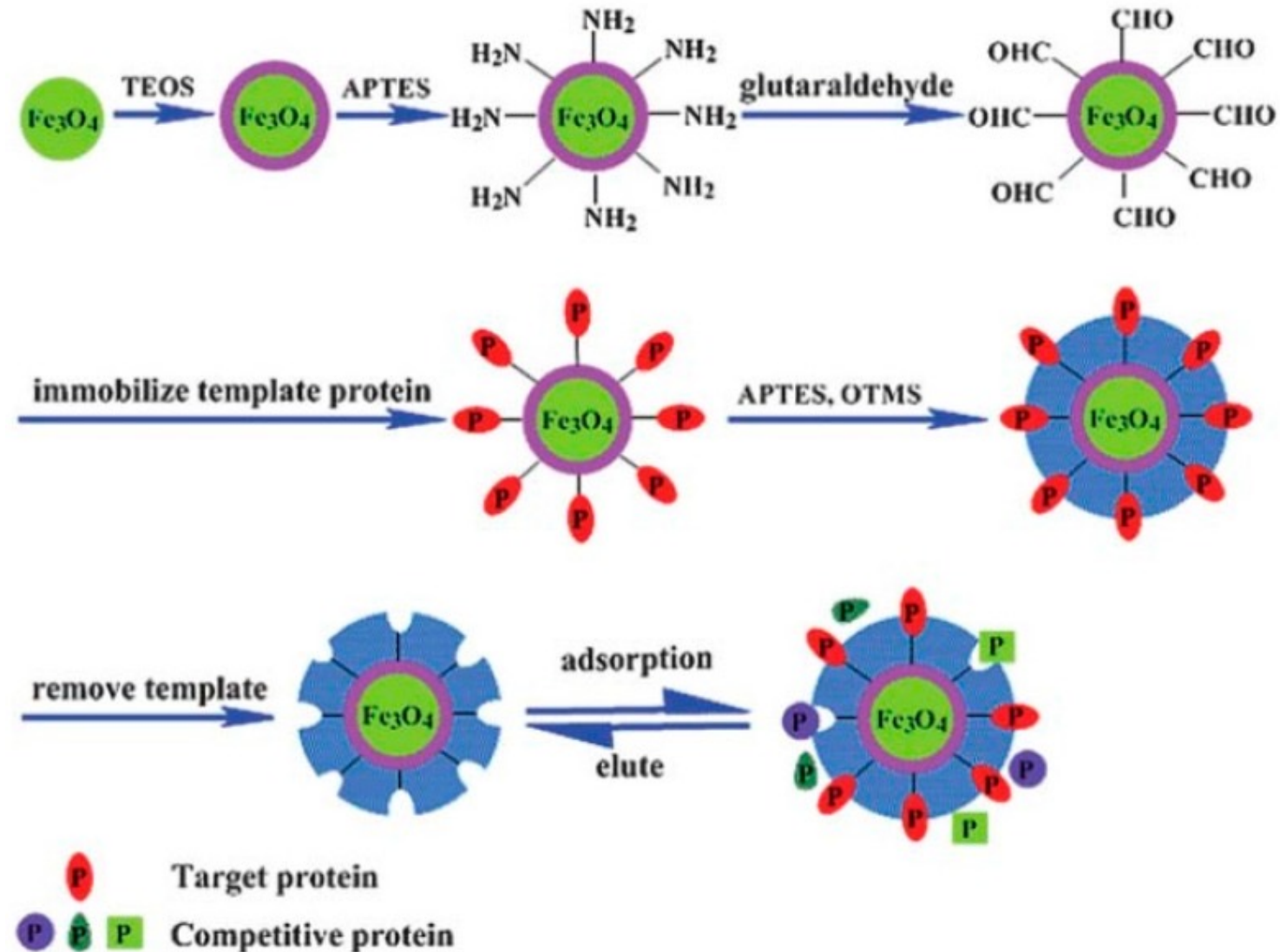
“Epitope imprinting”. Una sequenza relativa ad un epitopo della molecola target è utilizzato come template.

In questo esempio, un layer di **polydopamina** viene usato come agente cross-linkante, mentre un peptide sintetico, analogo dei residui 579–613 della proteina HIV-1 gp41 (glicoproteina presente nella membrana del Human immunodeficiency virus - HIV), viene incorporato nel film, il quale è depositato sulla superficie di un sensore QCM. In seguito alla rimozione del template, i siti sulla superficie saranno altamente specifici per l’epitopo specifico della proteina target.



# Tecniche di funzionalizzazione – Molecular imprinting

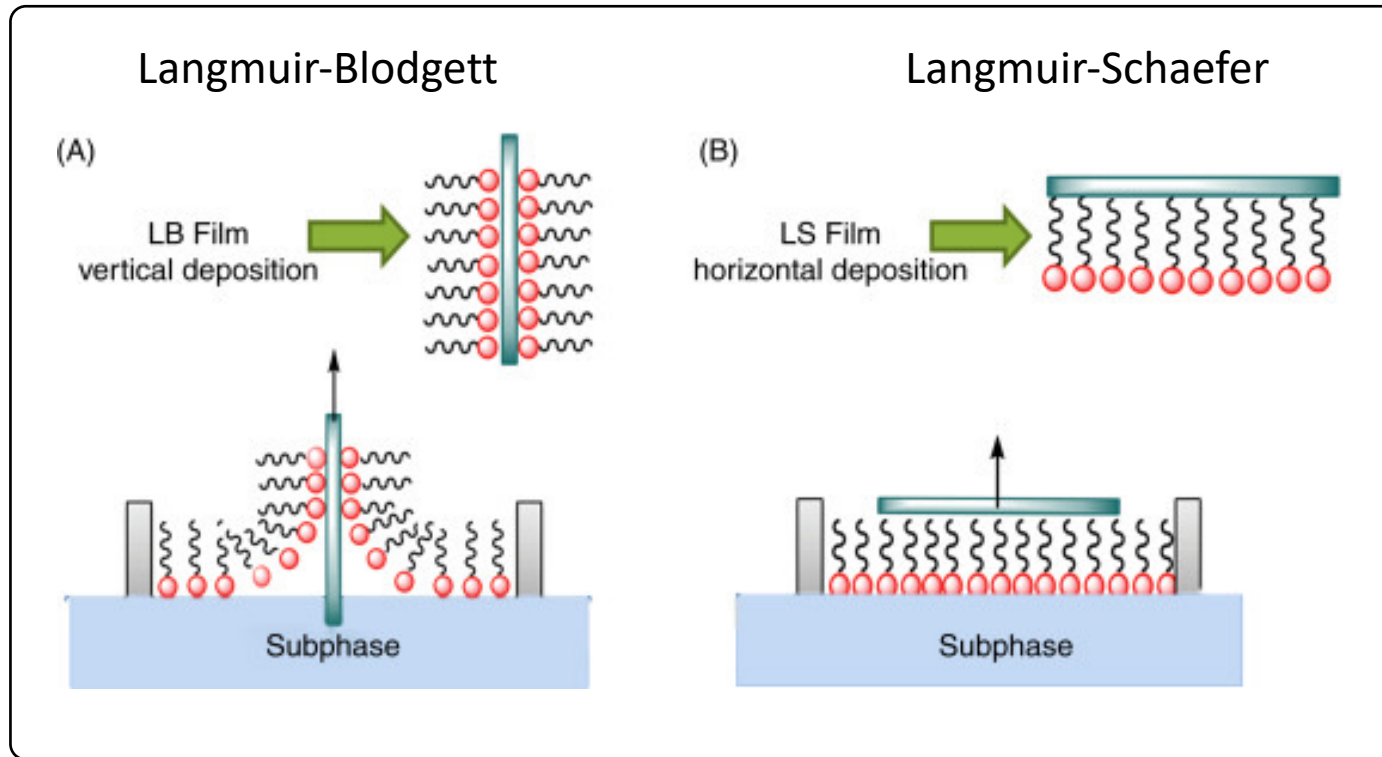
Nanoparticelle (NP) MIP. Esempio: NP magnetiche di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funzionalizzate tramite MIP. La superficie delle NP viene modificata in modo da esporre **gruppi funzionali aldeidici (CHO)** sui quali la proteina template viene **immobilizzata covalentemente**. Il template viene successivamente rimosso dalla superficie delle NP ottenendo dei **siti superficiali complementari al target** in termini di dimensioni, forma e gruppi funzionali esposti.



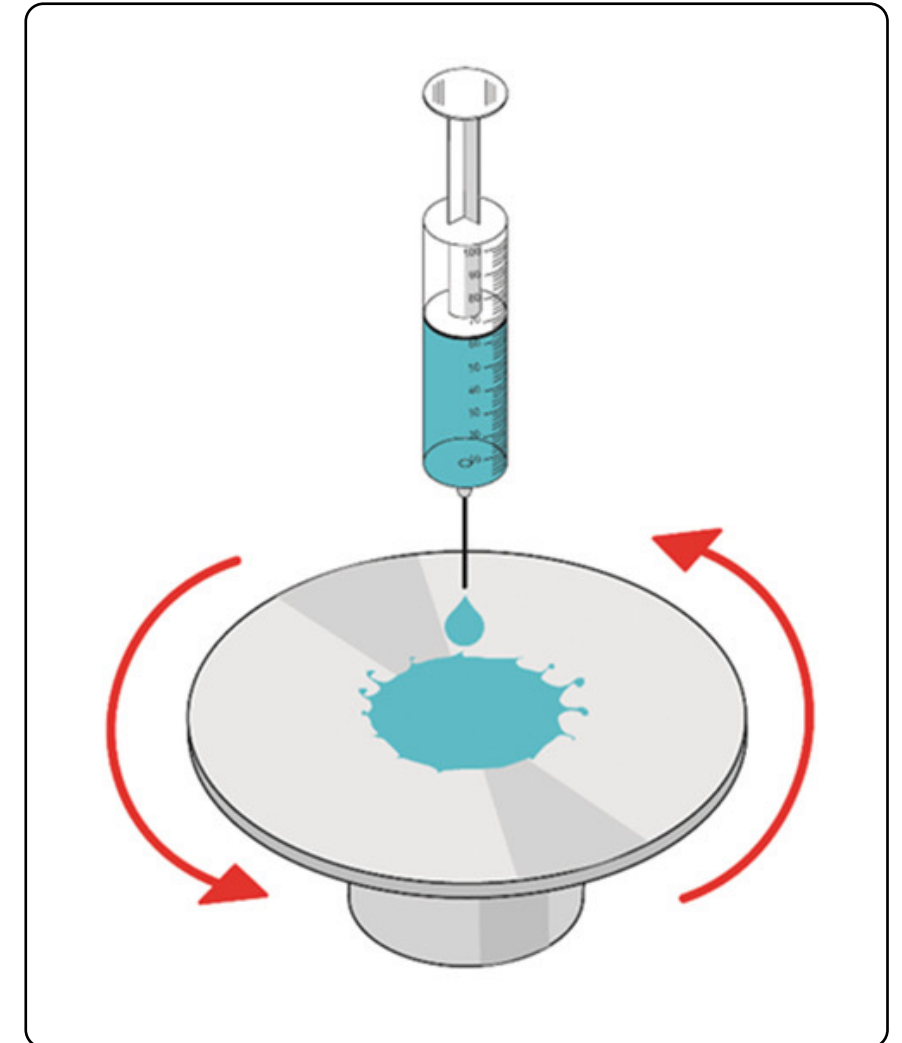
# Tecniche di funzionalizzazione – layer molecolari

## Dip Coating

Molecole anfifiliche: coda idrofobica e testa idrofilica

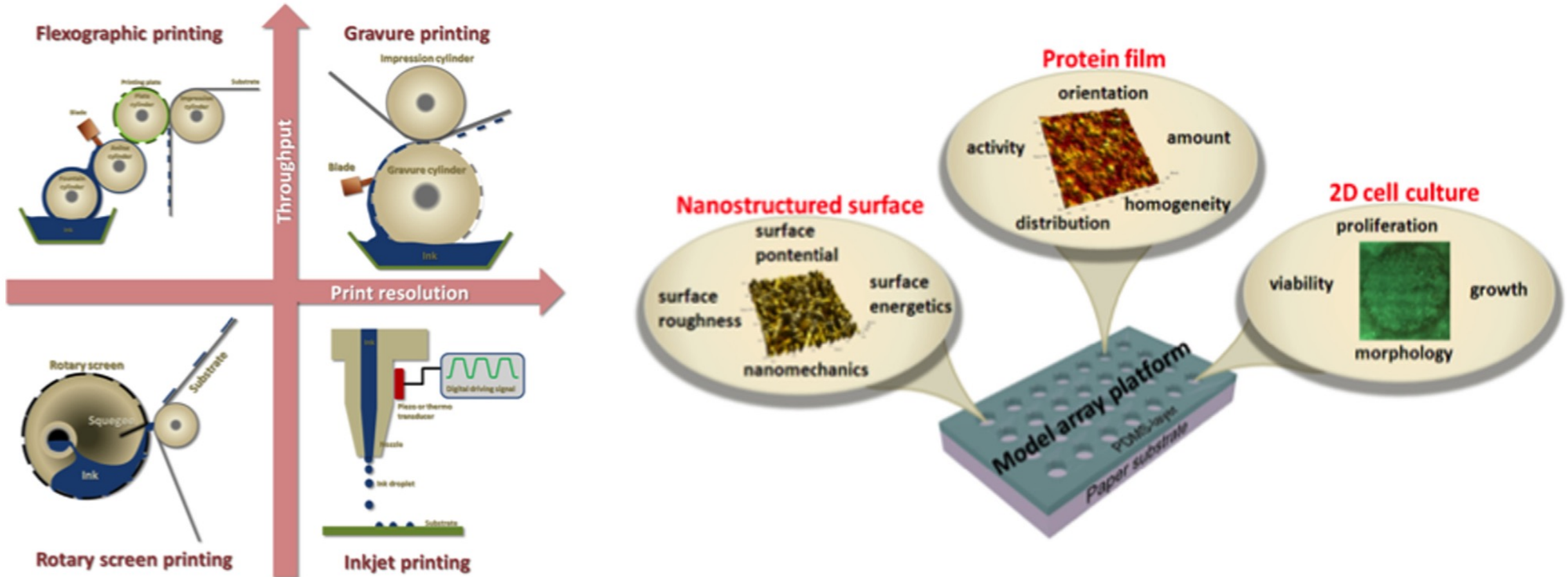


## Spin Coating



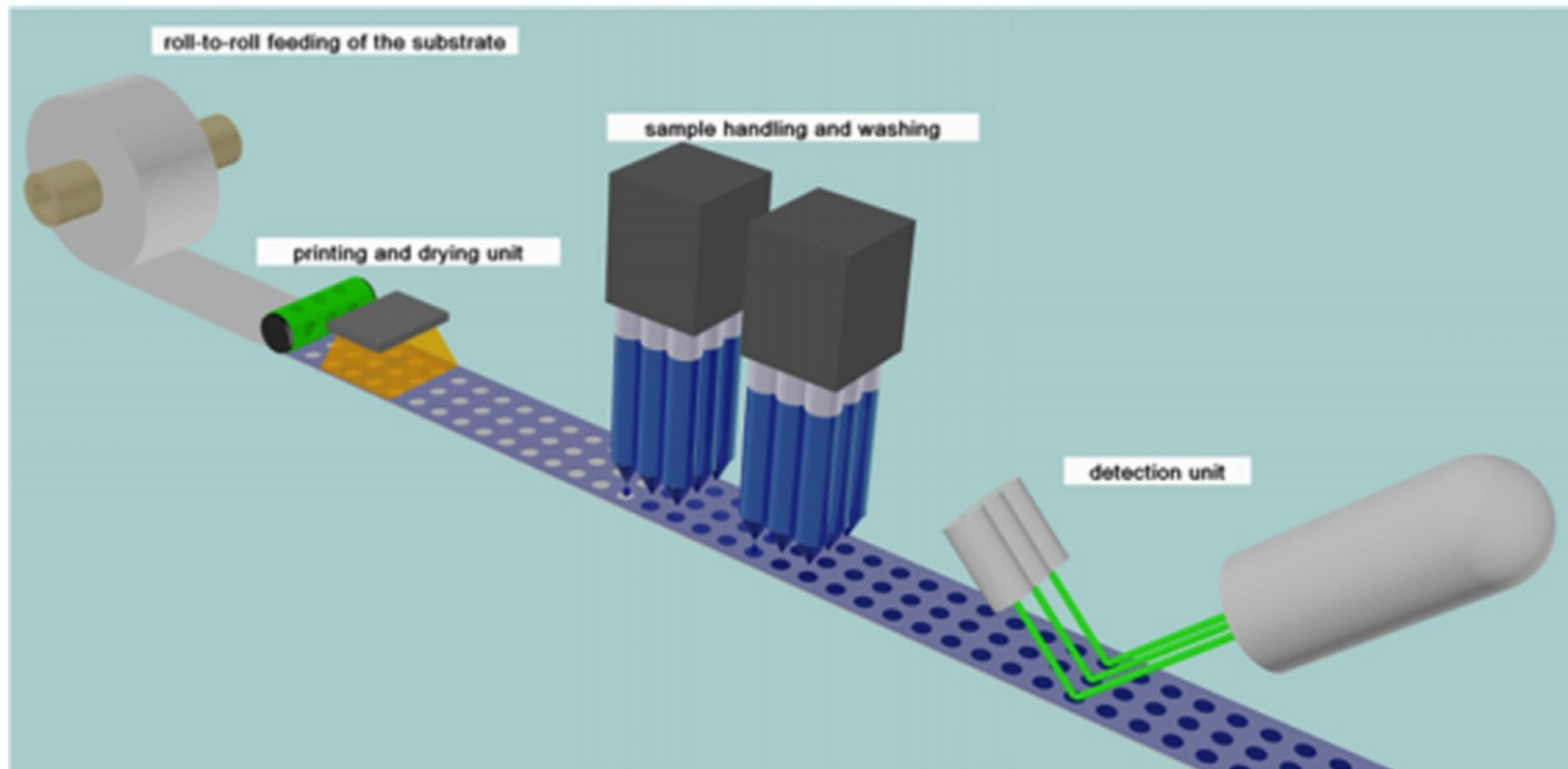
# Tecniche di funzionalizzazione – tecniche di stampa

La possibilità di realizzare “**bio-inchiostri**” contenenti le molecole d’interesse ha permesso lo sviluppo di diverse tecniche di stampa. I vantaggi sono principalmente i bassi costi di produzione dovuti all’altissima resa di questi processi (chiamati “**a larga area**”).



# Tecniche di funzionalizzazione – tecniche di stampa

La possibilità di realizzare “**bio-inkiostr**” contenenti le molecole d’interesse ha permesso lo sviluppo di diverse tecniche di stampa. I vantaggi sono principalmente i bassi costi di produzione dovuti all’altissima resa di questi processi (chiamati “**a larga area**”).



# Tecniche di funzionalizzazione

---

## Altre tecniche

- **Elettrodeposizione.** Sfrutta il fatto che alcune proteine presentino una carica netta diversa da zero e possano dunque essere fatte "migrare" verso un elettrodo di lavoro in seguito all'applicazione di un campo (Esempio: Johnson, Kirk W. "Reproducible electrodeposition of biomolecules for the fabrication of miniature electroenzymatic biosensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* 5.1-4 (1991): 85-89.).
- **Attivazione al plasma.** Modifica fisica di una superficie polimerica in seguito a trattamento al plasma. La superficie espone gruppi funzionali che possono essere protonati o deprotonati in funzione del pH (non biosensore ma tecnica interessante per la funzionalizzazione di superfici).