

**Mamei mele, Elena,
Tatalui meu, Marian,
Surorilor mele, Dana si Delia.**

Capitolo I - Introduzione

Biosensori

Il termine *biosensore* risale all'anno 1956, quando Leland Clark ne enunciò per primo il concetto.¹ Agli inizi degli anni 1960, Clark e Lyons² introdussero il principio di accoppiare la selettività data dall'elettrodo con la specificità caratteristica di un enzima, costruendo il primo elettrodo ad enzima per la misura del glucosio in soluzioni biologiche, utilizzando la glucosio ossidasi come elemento di riconoscimento biologico. Due anni più tardi, Guilbault e Montalvo,³ descrissero la realizzazione di un biosensore per la misura dell'urea. La storia dello sviluppo dei biosensori ricorda Mosbach⁴ nel 1974, Divis⁵ nel 1975, Liedberg⁶ nel 1983, e più recentemente Vo-Dinh⁷ nel 2000, per aver aperto la via nel campo dei termistori enzimatici, biosensori microbici, immunosensori e nanobiosensori, rispettivamente.

Definizione e classificazione

Un biosensore è un dispositivo analitico che incorpora un elemento di riconoscimento biologico (o di derivazione biologica) *integrato o intimamente associato* ad un trasduttore di segnale chimico-fisico.

Lo scopo del biosensore è di produrre un segnale digitale elettronico, discreto o continuo, proporzionale alla concentrazione di un singolo analita o gruppo di analiti.⁸

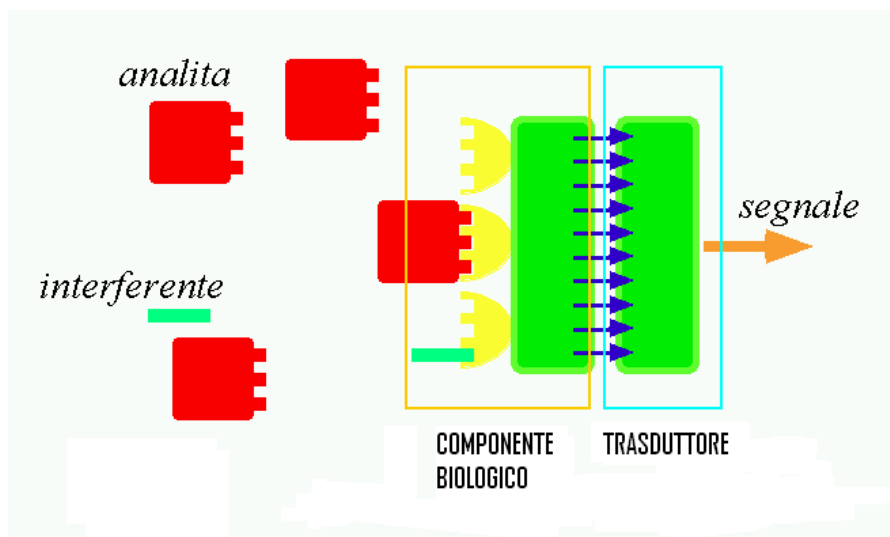


Figura A. Schema generale di un biosensore.

Generalmente, i biosensori sono stati classificati sia in base alla natura del mediatore biologico sia in funzione del tipo di trasduzione impiegata. Inizialmente, la componente biologica è quasi sempre stata rappresentata da un enzima. In seguito, anche al progredire delle tecniche di separazione e purificazione in ambito biologico e chimico, la componente

biologica disponibile per essere utilizzata nel campo dei biosensori si è diversificata. Si è passato così ad utilizzare tessuti animali⁹ o vegetali,¹⁰ cellule intere¹¹ o microrganismi,¹² proteine come recettori,¹³ per finire ai giorni d'oggi con il DNA¹⁴, RNA¹⁵ e aptameri.¹⁶

In base alla componente biologica si distinguono:

- biosensori biocatalitici;
- biosensori di affinità:-immunosensori;
 - chemorecettori;
 - sensori a DNA e RNA;
 - sensori ad aptameri (*gene chips*).

Dal punto di vista dei trasduttori di segnale più comunemente usati, si suddividono in:

- biosensori elettrochimici:-amperometrici (elettrodo di Clark);
 - potenziometrici (EIS, FET);
 - conduttometrici (elettrodi di Pt, Au);
- biosensori ottici (fotodiodi, fibra ottica);
- biosensori acustici (cristalli piezoelettrici);
- biosensori calorimetrici (termistori o termopile).

Enzimi

Classificazione e caratteristiche

Esiste un'ampia gamma di sistemi biologici che possono essere integrati in un trasduttore di segnale per trasformarlo in un biosensore. I componenti biologici più importanti per la costruzione dei biosensori sono gli enzimi (più di 2500 utilizzati attualmente), molecole proteiche che presentano attività catalitica.¹⁷

La Commissione sugli Enzimi (EC) dell'Unione Internazionale di Biochimica (IUB) ha elaborato il sistema di nomenclatura e numerazione degli enzimi,¹⁸ che suddivide in sei classi principali, ognuna con i sottogruppi che ne definiscono la funzione:

- *ossidoriduttasi* (catalizzano reazioni di ossidoriduzione);
- *transferasi* (catalizzano il trasferimento di interi gruppi di atomi);
- *idrolasi* (catalizzano reazioni di idrolisi);
- *liasi* (catalizzano la rimozione o l'aggiunta di un gruppo di atomi ad un doppio legame o altre scissioni con conseguenti riarrangiamenti elettronici);
- *isomerasi* (catalizzano riarrangiamenti molecolari);
- *ligasi* (catalizzano reazioni di fusione molecolare).

Gli enzimi sono proteine che, in alcuni casi, richiedono per il loro corretto funzionamento la presenza di gruppi non proteici, intimamente legati alla struttura enzimatica dotati di un'elevata specificità. La parte proteica è detta *apoenzima*, mentre la frazione non proteica è conosciuta come *gruppo prostetico*. Il *co-enzima* (flavina-adenina dinucleotide, flavina mono nucleotide, nicotinammide adenin dinucleotide, riboflavina, etc.) che partecipa insieme all'enzima nel processo di catalisi ed in seguito si rigenera, insieme all'apoenzima forma l'*oloenzima*. Il *cofattore* è un termine generico che di solito indica piccole molecole organiche essenziali per il buon funzionamento enzimatico, come per esempio lo ione cloruro per l'enzima amilasi.

L'*attività enzimatica*, espressa in $\mu\text{moli}/\text{min.}$, è definita come la quantità di substrato convertito nell'unità di tempo (minuto) in condizioni standard di temperatura, pH e forza ionica.

L'*attività specifica enzimatica*, espressa in $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteina, è l'attività enzimatica per unità di massa di 1 mg di proteina equivalente.

La *costante catalitica* o il *numero di turnover*, espressa in $\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mole}^{-1}$, è l'attività enzimatica per mole di enzima.

La velocità di una reazione enzimatica è, in molti casi, descritta dall'equazione A:

$$v = V \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Equazione A.

dove:

v: velocità di reazione, al minuto o al secondo, misurata sperimentalmente;

V: velocità massima di reazione;

[S]: concentrazione del substrato enzimatico, espressa in μmoli ;

K_M : costante di Michaelis-Menten.

Quando la concentrazione del substrato è molto più grande della K_M , la velocità di reazione v sarà uguale alla velocità massima di reazione, V:

$$v = V, \text{ quando } [S] \gg K_M$$

Equazione B.

La velocità di reazione è indipendente dal tempo e dipende solamente dalla quantità di enzima che si trova nel sistema, nel momento della reazione tra il substrato specifico e l'enzima. La K_M non è altro che la concentrazione del substrato corrispondente alla concentrazione del substrato enzimatico per cui la velocità di reazione è la metà del valore della velocità massima di reazione.

Trasduzione del segnale elettrochimico

Potenziometria

La potenziometria è una tecnica elettroanalitica in cui i trasduttori di segnale (elettrodi) misurano una differenza di potenziale che si viene a formare, in condizioni di flusso di corrente molto vicina a zero, tra l'elettrodo di riferimento e quello indicatore. Essenziali per la misura potenziometrica sono l'accuratezza e la stabilità del potenziale dell'elettrodo di riferimento.

La relazione tra la forza elettromotrice della cella e l'attività dello ione di interesse in soluzione deriva dall'equazione di Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln a_i$$

Equazione C.

dove:

E: differenza di potenziale tra l'elettrodo di misura e quello di riferimento;

E° : potenziale standard, V;

R: la costante universale dei gas, $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$;

T: temperatura, K;

n: carica elettrica dello ione i;

F: costante di Farady, 96485 C mol^{-1} ;

a_i : attività in soluzione dello ione i.

In pratica, il coefficiente di attività (γ) dello ione, si assume uguale all'unità. Riscrivendo l'equazione di Nernst:

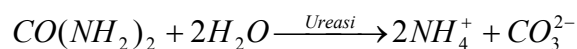
$$E = K + S \log c$$

Equazione D.

si osserva che la forza elettromotrice E della cella varia linearmente con il logaritmo della concentrazione dello ione i, con una pendenza (S) ed una intercetta K, dove K è una costante numerica. A 25°C si osserva una differenza di potenziale di 0.059 V per una variazione di concentrazione di una decade, nel caso di uno ione monovalente.

Il sensore potenziometrico classico per eccellenza e nello stesso tempo il più diffuso è l'elettrodo a vetro per la misura del pH. Il suo funzionamento si basa su una membrana di vetro speciale, altamente selettiva allo ione H^+ .

Il primo analita determinato con un biosensore potenziometrico è stato l'urea. Come trasduttore di segnale si è utilizzato l'elettrodo a pH, in quanto l'urea in presenza dell'enzima ureasi provoca una variazione di pH secondo la seguente reazione enzimatica:



Equazione E.

La misura potenziometrica dell'urea può anche essere effettuata utilizzando un elettrodo iono-selettivo (EIS) per lo ione ammonio, oppure un sensore a gas per l'ammoniaca, in quanto lo ione NH_4^+ può facilmente trasformarsi in NH_3 gassoso, in ambiente alcalino.

Amperometria

L'amperometria è una applicazione della voltammetria (o polarografia) mantenendo un potenziale fisso tra due elettrodi, per poter seguire una variazione di corrente, in condizioni di diffusione convettiva, in funzione della concentrazione di una data specie elettroattiva:

$$i_l = nF A m_o c_o$$

Equazione F.

dove:

i_l : corrente limite, A;

n: numero di elettroni;

F: costante di Farady, 96485 C mol^{-1} ;

A: area dell'elettrodo di lavoro, cm^2 ;

m_o : coefficiente di trasporto di massa;

c_o : concentrazione della specie elettroattiva in soluzione, mol L^{-1} .

L'Equazione F può essere riscritta in una forma ridotta:

$$i_l = k c_o$$

Equazione G.

dove k è una costante numerica.

Tale tecnica analitica richiede l'uso di un sistema a tre elettrodi, anche se a volte, se ne usano due per motivi pratici. La cella elettrochimica utilizzata nelle misure amperometriche è costituita da un elettrodo di lavoro (*working electrode*, WE), un elettrodo di riferimento (*reference electrode*, RE) e un elettrodo ausiliario, spesso chiamato anche contro elettrodo (*counter electrode*, CE), tutti immersi in una soluzione elettrolitica. L'uso della configurazione a due elettrodi prevede solo l'impiego dell'elettrodo di riferimento e di lavoro, in questo modo il potenziale applicato ai due elettrodi tende a variare nel tempo, ma per brevi

periodi operativi, questo inconveniente è trascurabile. La concentrazione della specie elettroattiva sotto investigazione è misurata rilevando la corrente che passa tra l'elettrodo di lavoro e ausiliario, mentre è applicata una differenza di potenziale costante tra l'elettrodo di lavoro e quello di riferimento. Il potenziale di lavoro è scelto in modo tale che l'analita di interesse possa essere ossidato o ridotto all'elettrodo di lavoro, in quanto ogni reazione di ossidoriduzione è caratterizzata da un diverso potenziale elettrochimico ben definito. La scelta del potenziale di lavoro è condizionata dal materiale impiegato per la costruzione degli elettrodi di lavoro, dalle eventuali interferenze elettrochimiche e anche dalla sensibilità di misura che si desidera ottenere.

Nel particolar caso dei biosensori, usando come rivelatore di segnale un normale amperometro, si misura la corrente generata indirettamente dall'interazione dell'analita con il componente biologico. Il prodotto di questa reazione costituisce la specie elettroattiva, che diffondendo sulla superficie elettrodica subisce una reazione redox.

Conduttimetria

La conduttimetria si basa sulla misura della conducibilità elettrica di una soluzione elettrolitica e/o della sua variazione al variare del tipo o della concentrazione delle specie ioniche.

La conducibilità (o conduttanza, Λ) di una soluzione è l'inverso della sua resistenza elettrica (R):

$$\Lambda = \frac{1}{R}$$

Equazione H.

In base alla seconda legge di Ohm, la conducibilità diventa:

$$\Lambda = \frac{1}{\rho \frac{l}{S}} = \frac{1}{\rho} \frac{S}{l} = \chi \frac{S}{l}$$

Equazione I.

dove:

ρ : resistività ($\Omega \text{ cm}$);

l : lunghezza del conduttore (cm);

S : area della sezione (cm^2);

χ : conduttività (S);

La conducibilità elettrica di una soluzione è misurata mediante un conduttimetro, collegato alla cella conduttimetrica, costituita da due elettrodi, in genere di Pt, immersi nella soluzione elettrolitica. I materiali (platino platinato o platino palladiato) che costituiscono l'elettrodo presentano una superficie effettiva maggiore di quella geometrica; per questo motivo, nelle misure, si indica come costante di cella K (cm), il rapporto S/l :

$$\Lambda = \chi K$$

Equazione J.

dove:

Λ : conducibilità della soluzione (S;)

χ : conducibilità specifica (S/cm).

I fattori che agiscono sui meccanismi di conduzione sono:

- la concentrazione degli ioni in soluzione;
- le cariche ioniche;
- la velocità di migrazione degli ioni in soluzione;
- la temperatura.

Alcune reazioni enzimatiche ($CO(NH_2)_2 + 2H_2O \xrightarrow{Ureasi} 2NH_4^+ + CO_3^{2-}$), ed anche quelle che implicano i recettori biologici di membrana, possono essere monitorate per via conduttimetrica o impedimetrica, utilizzando microelettrodi interdigitati.^{19,20}

Immobilizzazione del componente biologico

La modalità con cui il componente biologico (enzima, chemorecettore, cellule, etc.) è immobilizzato non deve essere mai sottovalutata, in quanto può generare fenomeni di inattivazione, denaturazione o malfunzionamento del processo di catalisi. Nel campo dei biosensori esistono cinque metodi principali con cui, generalmente, un enzima è immobilizzato sulla superficie di un elettrodo:

- adsorbimento;
- incapsulamento;
- intrappolamento;
- reticolazione (*cross-linking*);
- legame covalente.

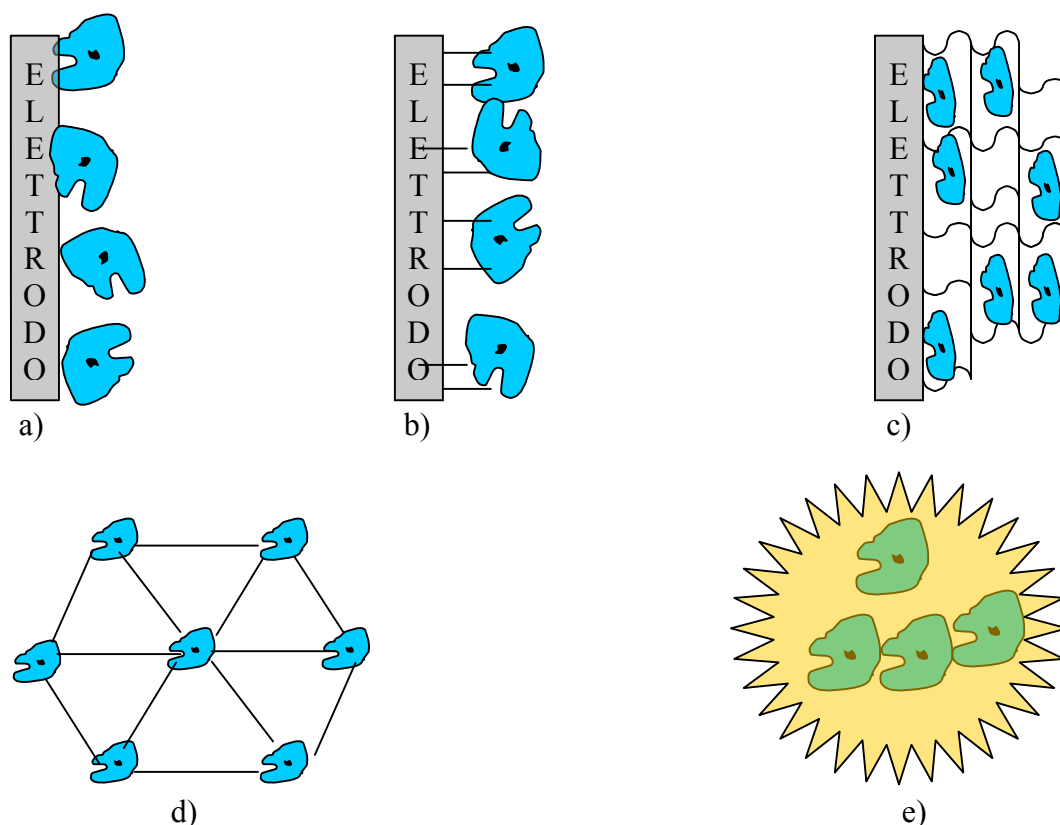


Figura B. Metodi di immobilizzazione dell'enzima: a) adsorbimento; b) legame covalente; c) intrappolamento; d) reticolazione; e) incapsulamento.

Adsorbimento

Il metodo più semplice e meno costoso per fissare sulla superficie del sensore il componente biologico (enzima, cellule, tessuti, anticorpi, etc.) è l'adsorbimento. Esso

necessita di una preparazione minima, l'interazione con il supporto solido è debole, non esiste un orientamento preferenziale, e dipende da:

- proprietà della proteina (peso e dimensioni molecolari, stabilità conformazionale, distribuzione delle catene idrofili e idrofobe, etc.);
- proprietà della superficie solida (carica superficiale, carattere idrofobo o idrofilico, presenza di vari gruppi funzionali, grado di idratazione, etc.);
- proprietà delle soluzioni (pH, forza ionica, presenza di additivi, etc.);
- altri parametri (temperatura, condizioni idrodinamiche, etc.).

I legami che si formano sono per lo più di tipo van der Waals, talvolta legami idrogeno e trasferimento di carica, con evidenti ripercussioni sulla stabilità del biosensore.

Per descrivere questo tipo di fenomeni, l'espressione matematica più utilizzata è l'isoterma di adsorbimento di Langmuir:

$$v_a = k_a p_a N(1 - \Theta)$$

Equazione K.

$$v_d = k_d N\Theta$$

Equazione L.

dove: v_a , v_d sono la velocità di adsorbimento e desorbimento, rispettivamente;

k_a , k_d sono le costanti di velocità per il processo diretto e indiretto, rispettivamente;

N è il numero dei siti disponibili sulla superficie;

Θ è la frazione di superficie ricoperta;

p_a è la pressione parziale sulla superficie, ad una data temperatura.

All'equilibrio le v_a e v_d si uguagliano, il rapporto k_a/k_d si esprime sotto forma di una costante termodinamica globale (K) del processo ed il grado di copertura si calcola secondo l'equazione M:

$$\Theta = \frac{K \times p_a}{1 + K \times p_a}$$

Equazione M.

Incapsulamento

Il primo biosensore a glucosio fu assemblato disponendo l'enzima da un lato di una membrana semipermeabile mentre il flusso del substrato e del prodotto di reazione avveniva dall'altro lato. Le membrane utilizzate per questo tipo di applicazione sono di diverso tipo: acetato di cellulosa, policarbonato, collagene, politetrafluoroetilene, Nafion[®], poliuretani,

etc.²¹ Sfere concentriche di membrane lipidiche, chiamate liposomi, sono utilizzate per incapsulare enzimi con applicazioni pratiche all'interno dei bioreattori.²² I vantaggi di questa tecnica sono:

- minima distanza tra elettrodo e biocomponente;
- tecnica semplice ed affidabile.

L'enzima inoltre risente meno le variazioni di pH, temperatura, forza ionica e conformazionali, offrendo un alto grado di specificità. Lo svantaggio di questa tecnica è rappresentato dal lento processo di diffusione del substrato all'enzima e del prodotto di reazione all'elettrodo, che si traduce in un tempo di risposta lungo del biosensore.²³

Intrappolamento

Il materiale biologico (batteri, cellule animali e vegetali, enzimi, etc.) è immobilizzato in una “gabbia fisica” o coinvolgente legami covalenti, formata da *gels* (poliacrilammide, agar, poliuretano, alcol polivinilico, sol-gel, idrogel redox come l'[Os(bpy)₂]^{2+/3+}),²⁴ polimeri conduttori²⁵ (polianilina, polipirrolo), polimeri non conduttori²⁶ o monostrati auto-assemblati²⁷ (*self-assembled*, SAMs) ed anche in membrane lipidiche a doppio strato.²⁸

Questo metodo è conveniente per processi che coinvolgono substrati e/o prodotti di reazione di basso peso molecolare, ma presenta due grossi svantaggi:

- la presenza di barriere molto spesse con conseguente influenza sul tempo di risposta;
- parziale perdita del componente biologico che influisce sulla sensibilità del biosensore.

Reticolazione (cross-linking)

La caratteristica di questo metodo di immobilizzazione è l'impiego di reagenti bifunzionali o multifunzionali come la glutaraldeide (GAD), la polietilenimina (PEI), l'1,6-esandiisotiocianato, il 2,6-difluoro-1,3-dinitrobenzene, etc., che legano chimicamente i composti biologici di interesse su di un supporto solido o altro materiale di supporto come il gel. Il *cross-linking* è un'immobilizzazione meno blanda, che può produrre l'inattivazione dell'enzima, la modificazione della conformazione sterica conferendo inoltre scarsa resistenza meccanica.²⁹

Il reagente più utilizzato è sicuramente la glutaraldeide, in grado di reagire con le catene laterali dei residui di lisina dell'enzima, come mostrato in Figura C.

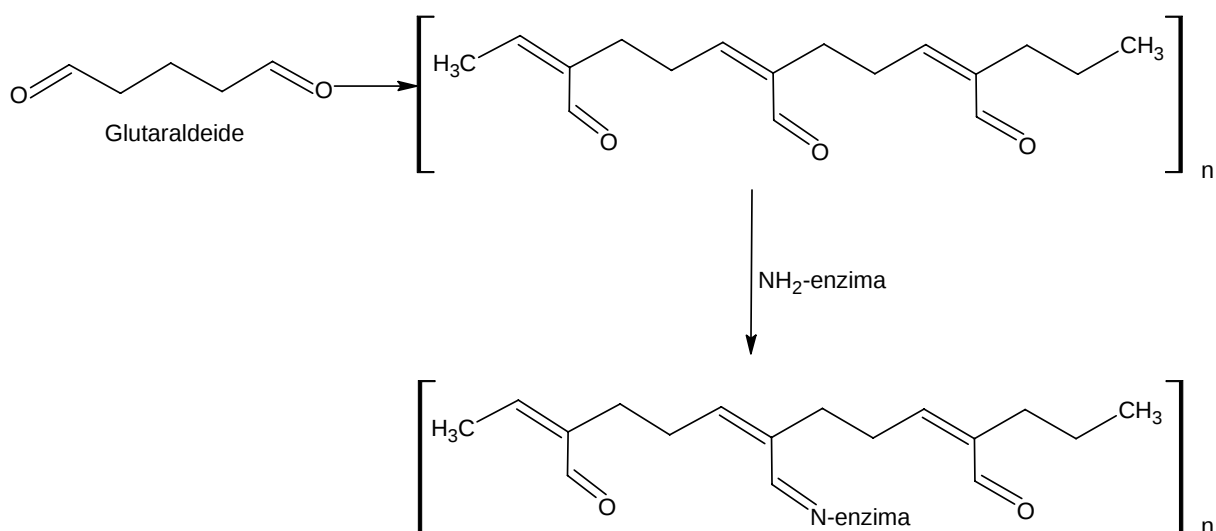


Figura C. Illustrazione schematica del funzionamento del reagente bifunzionale glutaraldeide.

Legame covalente

L'accoppiamento covalente tra il supporto solido (trasduttore di segnale) o membrana ed il componente biologico attivo dipende dai gruppi funzionali presenti nella struttura proteica:

- amminici;
- tiolici;
- carbossilici;
- aldeidici.

L'utilità dei vari gruppi funzionali dipende dalla loro disponibilità ed attività (nucleofilità). La reattività delle catene laterali nucleofile è determinata dal loro stato di protonazione, e grossolanamente segue la sequenza:



dove la carica totale si stima dai valori di pK_a dei gruppi ionizzabili e dal pH della soluzione. Generalmente, per le reazioni di legame covalente, sono preferiti i residui di lisina grazie alla loro ampia esposizione superficiale e alla loro alta reattività, specialmente in soluzioni alcaline, ma anche per il fatto che raramente fanno parte del sito attivo dell'enzima. L'immobilizzazione covalente risulta essere molto stabile, conferisce all'enzima legato una maggiore stabilità e non risente delle particolari condizioni ambientali (pH, temperatura, forza ionica, etc.). Le reazioni di questo tipo devono sempre essere intese come reazioni blande, che non devono apportare modificazioni alla struttura quaternaria, non devono alterare il sito catalitico degli enzimi e devono concedere una minima libertà di movimento al composto immobilizzato. Uno dei principali vantaggi del legame covalente è che, limitando la perdita

del materiale biologico immobilizzato, migliora la sensibilità ed il tempo di vita del biosensore.

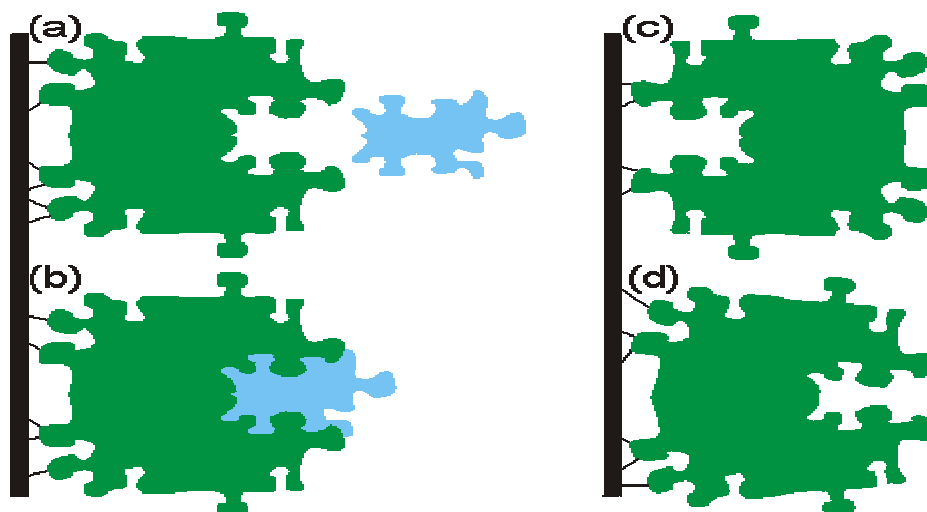
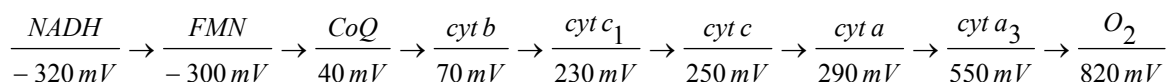


Figura D. Illustrazione schematica del processo di immobilizzazione covalente dell'enzima sulla superficie dell'elettrodo: (a) enzima immobilizzato con il suo sito attivo intatto e pronto ad accettare la molecola substrato, come mostrato in (b); (c) enzima legato in modo non-produttivo a causa dell'inaccessibilità del sito attivo; (d) la distorsione del sito attivo produce un enzima immobilizzato inattivo.

Trasportatori biologici di elettroni³⁰

Nicotinammide adenin dinucleotide (NAD^+)

Il trasporto biologico di elettroni (e^-) consiste in una serie di ossidazioni e riduzioni, che forniscono l'energia necessaria per la sintesi dell'adenosintrifosfato (ATP). I principali trasportatori di elettroni della catena respiratoria ed i loro rispettivi potenziali formali redox sono:



Il nicotinammide adenin dinucleotide ridotto (NADH) viene ossidato nel primo passaggio del trasporto di elettroni dal complesso mitocondriale I, o NADH deidrogenasi, che contiene come co-enzima il flavin adenin mononucleotide (FMN) e catalizza la seguente reazione:



Equazione N.

Il complesso contiene vari centri ferro-zolfo, che trasferiscono e^- dalla flavina ridotta ad un altro trasportatore della catena respiratoria, il co-enzima Q. I centri ferro-zolfo consistono di un ferro non-eme complessato con lo zolfo in tre possibili modi. La forma più semplice (FeS) coinvolge un atomo di ferro complessato secondo una geometria tetraedrica con gli atomi di zolfo tiolico appartenenti a quattro residui di cisteina. La seconda forma (Fe_2S_2), contiene due atomi di ferro, ciascuno in forma di complesso con due residui di cisteina e due atomi di zolfo inorganici. La terza forma (Fe_4S_4) è anche la più complessa, contiene quattro atomi di ferro, quattro di zolfo e quattro residui di cisteina. La NADH deidrogenasi contiene sia centri Fe_2S_2 , sia centri Fe_4S_4 . La rappresentazione grafica dell'intero processo è raffigurata in Figura E.

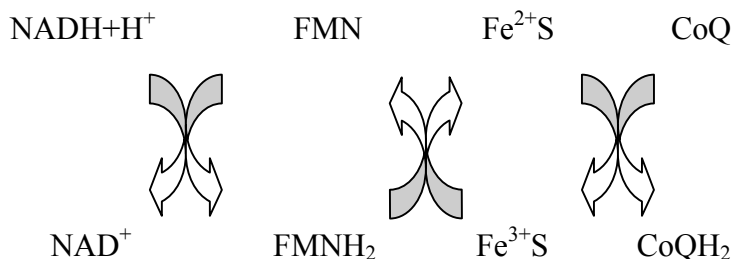
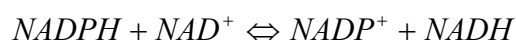


Figura E. Rappresentazione del processo di trasferimento elettronico tra NADH e CoQ.

La NADH deidrogenasi può anche accettare elettroni dal NADPH, anche se con efficienza piuttosto bassa. Una possibile via di ossidazione, mediata dalla transidrogenasi, è costituita dal trasferimento di due equivalenti di riduzione dal NADPH al NAD^+ :



Equazione O.

Co-enzima Q

Il co-enzima Q (ubichinone, CoQ) è un trasportatore di elettroni estremamente lipofilo, debolmente legato alla componente proteica. Di fatto è un benzochinone legato ad un certo numero di unità isopreniche, di solito 10 nelle cellule di mammifero, e 6 in quelle batteriche. Il termine Q_{10} indica la forma del CoQ contenente 10 unità isopreniche, che conferiscono il carattere apolare, permettendo così al CoQ di diffondere rapidamente attraverso la membrana mitocondriale interna.

Il co-enzima Q trasporta e^- nella catena respiratoria non solo a partire dal NADH, ma anche dal succinato e dagli intermedi dell'ossidazione degli acidi grassi. La succinato deidrogenasi può trasferire direttamente elettroni dal co-enzima ridotto (FADH_2) al CoQ attraverso dei centri ferro-zolfo.

I citocromi

I citocromi (*cyt*) costituiscono un gruppo di proteine di colore rosso o bruno, contenente un gruppo eme. I principali citocromi respiratori sono classificati come citocromo *a* (*a* e a_3), citocromi di tipo *b* e citocromo *c* (*c* e c_1), a seconda della lunghezza d'onda dei picchi di assorbimento. I citocromi *b*, *c* e c_1 contengono tutti lo stesso tipo di gruppo eme dell'emoglobina e della mioglobina, cioè un atomo di ferro complessato con la protoporfirina IX. Nei citocromi *c* e c_1 l'eme è legato covalentemente alla componente proteica. I citocromi *a* e a_3 contengono una forma modificata del gruppo eme, detto eme A. Sono costituiti da due identiche unità eme A legate alla stessa catena polipeptidica, poste però in microambienti diversi nella membrana interna e di conseguenza dotate di diverso potenziale redox. Ciascuno dei gruppi eme è associato a uno ione rame, situato vicino all'atomo di ferro dell'eme stesso.

I citocromi possono subire reazioni di ossidoriduzione grazie al metallo complessato, che passa ciclicamente da +2 a +3 per il ferro eminico, e da +1 a +2 per il rame dei citocromi *a* e a_3 .

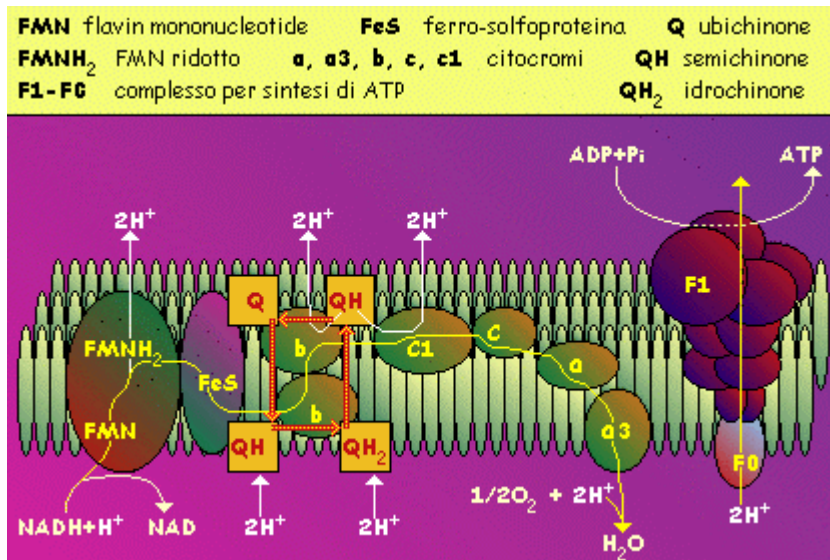


Figura F. Rappresentazione dei processi ossidoriduttivi nella membrana mitocondriale.³¹

Biosensori biocatalitici di prima, seconda e terza generazione

I sensori enzimatici, in funzione del meccanismo di trasporto elettronico, si suddividono in:

I generazione: il componente biologico è mantenuto in contatto con la superficie elettrodica mediante l'ausilio di membrane, che lo immobilizzano fisicamente o chimicamente, e nello stesso tempo bloccano gli eventuali interferenti che potrebbero influire sulla misura elettrochimica; i tempi di risposta sono lunghi, il substrato enzimatico ed il prodotto di reazione devono diffondere attraverso le membrane per arrivare all'enzima intrappolato oppure per ridursi/ossidarsi all'elettrodo, rispettivamente;

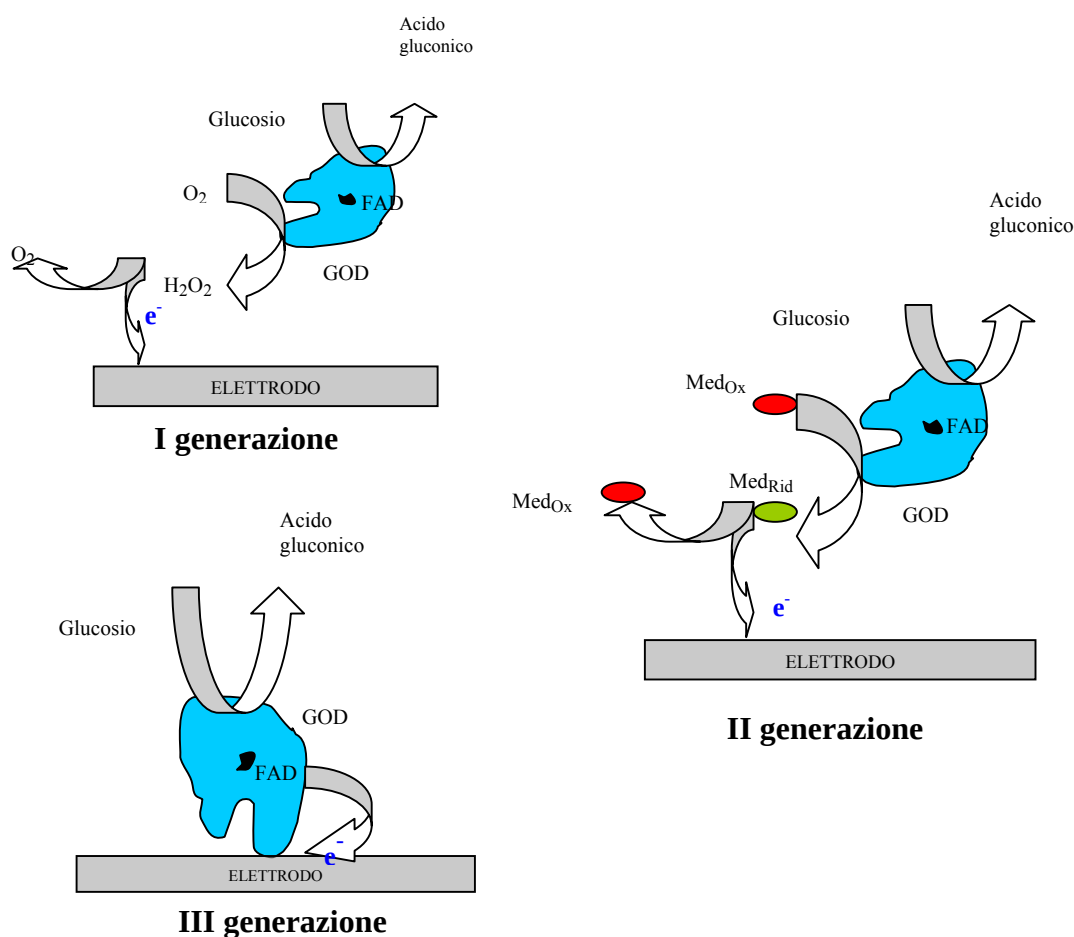


Figura G. Schema dell'evoluzione del biosensore a glucosio.

II generazione: caratteristico di questi biosensori è l'utilizzo dei mediatori redox, sistemi molecolari/complessi biologici/metalli nobili, che fungono da sistema navetta per gli elettroni tra l'enzima e l'elettrodo, diminuendo notevolmente il tempo di risposta del biosensore;

III generazione: il trasferimento elettronico avviene direttamente, in quanto vi è un accoppiamento diretto tra la superficie elettrodica ed enzima; la risposta del biosensore è pressoché istantanea.

Ogni reazione che implica un trasferimento di elettroni è caratterizzata da un dato potenziale formale standard (E°), oltre il quale è energeticamente favorita:

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$$

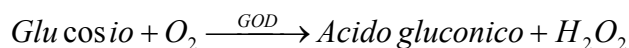
Equazione P.

Gli enzimi abbassano il livello di energia libera richiesto per la reazione redox del substrato specifico. Una cinetica elettronica rapida dipende dall'accessibilità del sito attivo enzimatico da parte delle specie in soluzione, dalla distanza che lo separa dalla superficie enzimatica, dal tipo di gruppo prostetico, dalla stabilità intrinseca della proteina e anche dalla possibilità di essere immobilizzata su di un sensore. Gli elettroni coinvolti nel processo di catalisi enzimatica possono essere sia immagazzinati dal gruppo prostetico integrato all'enzima, oppure scambiati con un opportuno co-enzima all'interno del sito attivo. I meccanismi con cui si effettua il trasferimento redox dal sito attivo enzimatico alla superficie del trasduttore sono:

- sistema navetta (*electronic shuttle*), caratteristico per i biosensori di I e II generazione;
- diretto (*tunnelling*), specifico per i biosensori di III generazione;
- diretto (*wired*) mediante polimeri redox o conduttori, che connettono l'enzima all'elettrodo; specifico per i biosensori di III generazione.

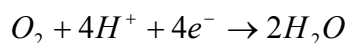
Biosensore a glucosio di I generazione

Il primo biosensore per la misura del glucosio, descritto da Clark e Lyons, sfrutta l'elettrodo a ossigeno e l'enzima glucosio ossidasi (GOD):



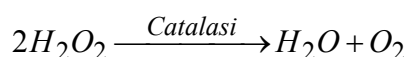
Equazione Q.

La misura amperometrica della concentrazione di glucosio, in questo caso, si basa sulla diminuzione dell'ossigeno in soluzione. Applicando un potenziale di riduzione di -650 mV, all'elettrodo di lavoro si genera una corrente, la cui intensità è direttamente correlata alla concentrazione di glucosio, in quanto:



Equazione R.

L'enzima glucosio ossidasi è immobilizzata fisicamente sull'elettrodo a ossigeno mediante l'uso di una membrana semipermeabile, fissata con degli *o-ring*. La Figura H mostra lo schema costruttivo utilizzato per i biosensori di I generazione. La misura del glucosio con i biosensori di I generazione è fortemente dipendente dalla presenza dell'ossigeno stesso in soluzione e dalle eventuali interferenze elettrochimiche che si possono manifestare a così alti potenziali di lavoro. Alcuni tentativi per la regolazione del livello di ossigeno nel campione da analizzare si basano sull'utilizzo della catalasi,³² enzima in grado di decomporre l'acqua ossigenata in acqua e ossigeno, tuttavia con scarse rese, in quanto la quantità di ossigeno prodotta è due volte inferiore a quella dell'acqua:



Equazione S.

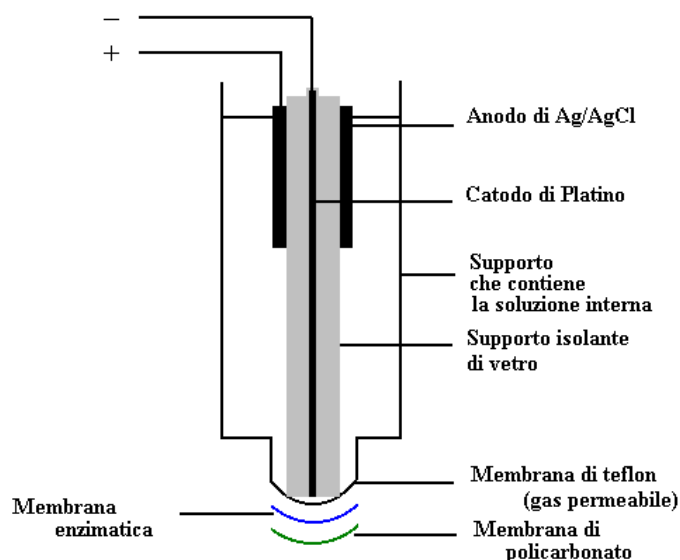
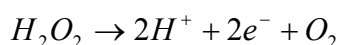


Figura H. Rappresentazione schematica di un biosensore di prima generazione basato sull'elettrodo a ossigeno di Clark.

L'alternativa all'elettrodo di Clark è rappresentata dal normale elettrodo di Pt, in quanto la concentrazione di glucosio si può misurare anche ossidando, ad un potenziale di +650 mV, l'acqua ossigenata che si genera nel processo di catalisi enzimatica:



Equazione T.

Tuttavia, l'alto potenziale di lavoro applicato aumenta la probabilità che eventuali interferenti, come l'acido ascorbico e l'acido urico presenti nei fluidi biologici, interferiscano

con la misura elettrochimica. Inoltre, come si può ben osservare dall'Equazione T, il valore di pH influisce anch'esso nella misura dell'acqua ossigenata.

Anche i tempi di risposta sono lenti, in quanto il processo di diffusione del substrato all'enzima e delle specie elettroattive all'elettrodo sono fortemente limitate dalla presenza delle membrane utilizzate per la costruzione dei biosensori di I generazione.

Biosensore a glucosio di II generazione

I biosensori di seconda generazione sostituiscono l'ossigeno con un altro agente ossidante, in grado di agire come sistema navetta per gli elettroni tra l'enzima e l'elettrodo, diminuendo notevolmente il tempo di risposta del biosensore. Generalmente cationi di metalli di transizione e loro complessi, coloranti organici e complessi biologici servono a questo scopo e vengono chiamati generalmente mediatori. Il mediatore ideale, per essere sfruttato nel campo dei biosensori deve possedere le seguenti caratteristiche:

- interagire rapidamente con l'enzima;
- avere cinetiche di trasferimento elettronico rapide, ovvero reversibili;
- il sovrapotenziale di rigenerazione deve essere di basso valore;
- indipendente da variazioni di pH;
- stabilità chimica, sia nella forma ossidata che in quella ridotta;
- la forma ridotta non deve interagire con l'ossigeno presente in soluzione;
- non deve essere tossico.

Quasi mai vengono soddisfatte l'insieme delle caratteristiche sopra elencate, e quindi si deve sempre trovare un certo compromesso tra le condizioni reali di lavoro e le caratteristiche desiderate per la costruzione dei biosensori.

Il potenziale di lavoro di un sensore ad enzima è determinato in questo caso dal potenziale formale redox della coppia ossidoriduttiva che svolge la funzione di mediatore elettrochimico, un potenziale di lavoro ridotto, che diminuisce così la possibilità di interferenze nella misura. Un altro fattore importante che non è più limitativo, come per i biosensori di I generazione, e purché il sensore sia inerte nei confronti dell'ossigeno, lo è il fatto che la misura elettroanalitica è indipendente dalla pressione parziale dell'ossigeno, dato che non è più l'unico accettore di elettroni.

Il meccanismo di funzionamento del biosensore a glucosio di II generazione è illustrato in Figura I.

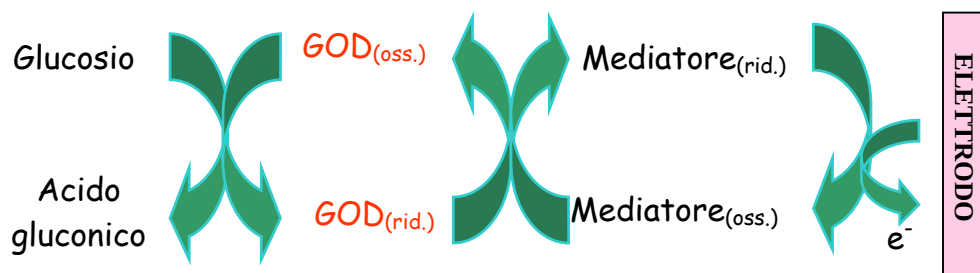
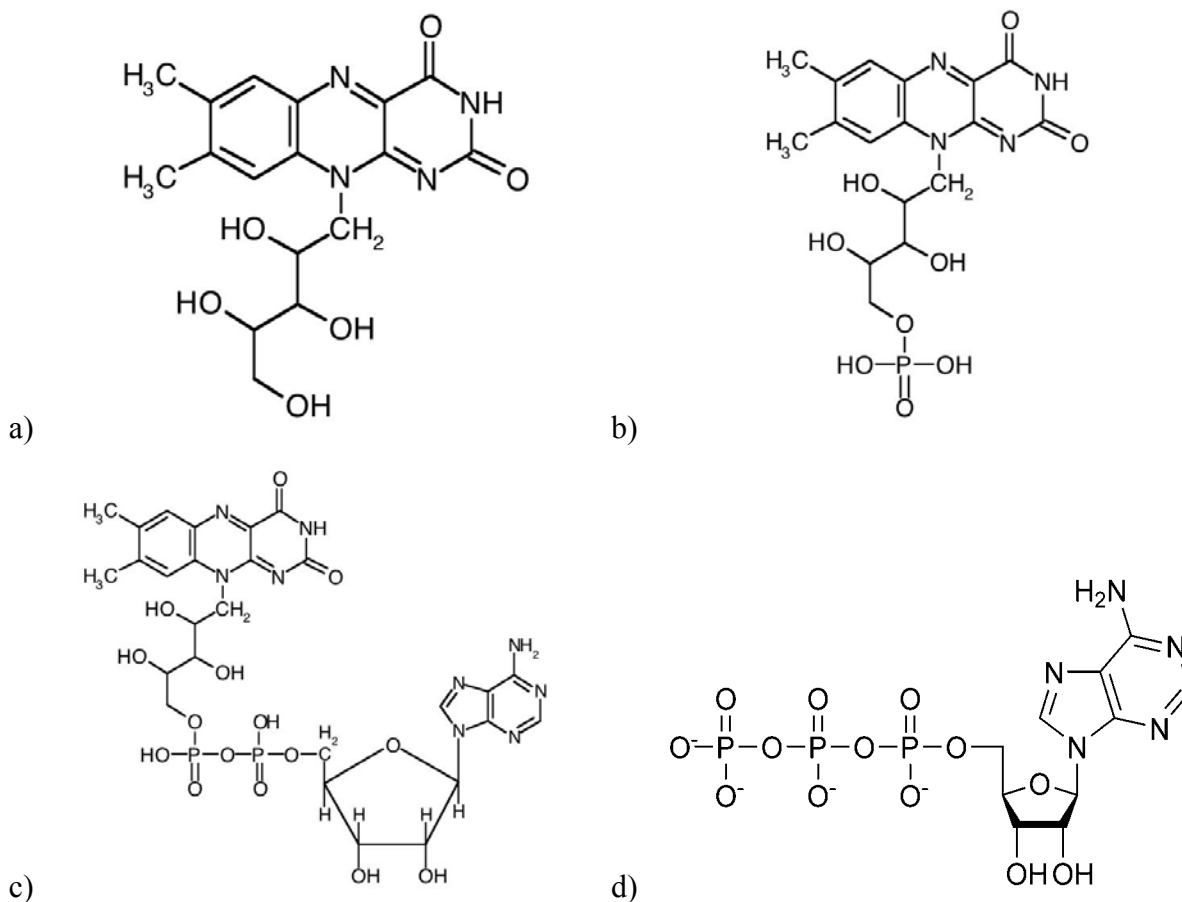


Figura I. Rappresentazione schematica di un biosensore di seconda generazione.

La glucosio ossidasi è un oloenzima, contenente come co-enzima il flavin adenin dinucleotide (FAD) che effettua “la vera” ossidazione del glucosio riducendosi a FADH_2 . Il flavin adenin dinucleotide è un derivato della riboflavina (vitamina B_2). La molecola è costituita da 3 anelli condensati che costituiscono il gruppo isoallosazinicco, il quale è legato al ribitolo tramite l’azoto dell'anello centrale. La molecola se presenta il gruppo OH del carbonio 5, legato al gruppo fosfato, prende il nome di flavin mono nucleotide (FMN). Il gruppo fosfato, proviene dalla reazione della molecola con l'adenosintrifosfato (ATP), il quale libera un gruppo fosfato e forma così l'FMN. Se l'FMN reagisce con un'altra molecola di ATP, quest'ultimo rilascia sia il nucleotide adeninico che il gruppo fosfato in α . Con questa reazione si forma il FAD.³³



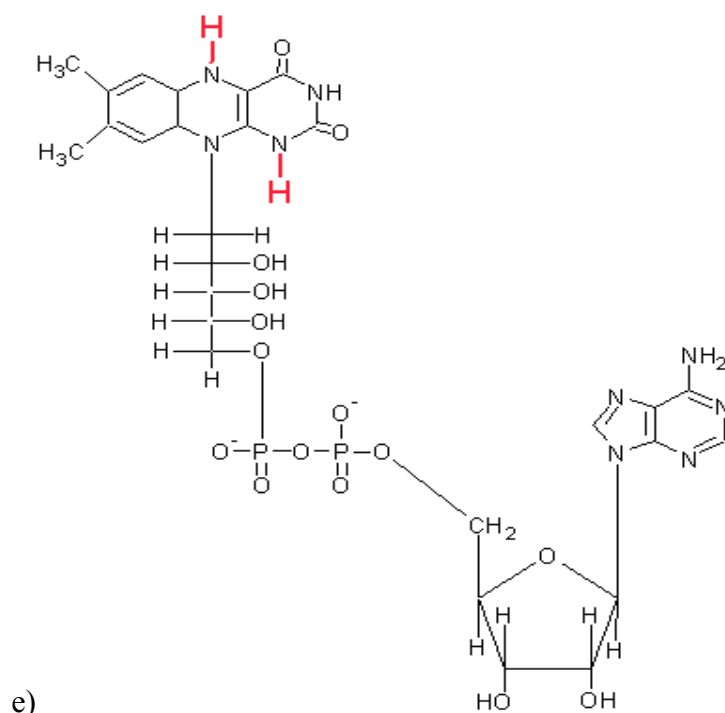


Figura J. Rappresentazione grafica di: a) Riboflavina; b) FMN; c) FAD; d) ATP; e) FADH₂.

All'inizio, i mediatori utilizzati nella costruzione dei biosensori di II generazione erano a base di ferro, quasi sempre nella forma complessata,^{34,35} in quanto lo ione Fe³⁺ in soluzione precipita sotto forma di Fe(OH)₃. Confrontando alcuni dei più utilizzati mediatori redox a base di ferro:

- ione ferro: $Fe^{3+} + e^{-} \rightarrow Fe^{2+}$, $E^{\circ} = +530 \text{ mV}$
- ferricianuro: $[Fe(CN)_6]^{3-} + e^{-} \rightarrow [Fe(CN)_6]^{4-}$, $E^{\circ} = +450 \text{ mV}$
- ferrocene: $[Fe(Cp)_2]^{+} + e^{-} \rightarrow [Fe(Cp)_2]$, $E^{\circ} = +165 \text{ mV}$

si evince che le migliori caratteristiche elettrochimiche le presenta il ferrocene, in quanto il suo potenziale standard è il più basso tra i tre. Inoltre, confrontato con il potenziale dell'elettrodo a ossigeno di Clark (−650 mV), il ferrocene è anche in grado di diminuire di molto le eventuali interferenze elettrochimiche, in quanto rientra nella finestra ottimale di lavoro per i sensori e biosensori, compresa tra −200 e +200 mV.

Esistono tuttavia molti altri mediatori, classificati in “naturali”, e “artificiali”.

In funzione del *design* dei biosensori, un mediatore elettrochimico si trova in una delle seguenti situazioni:

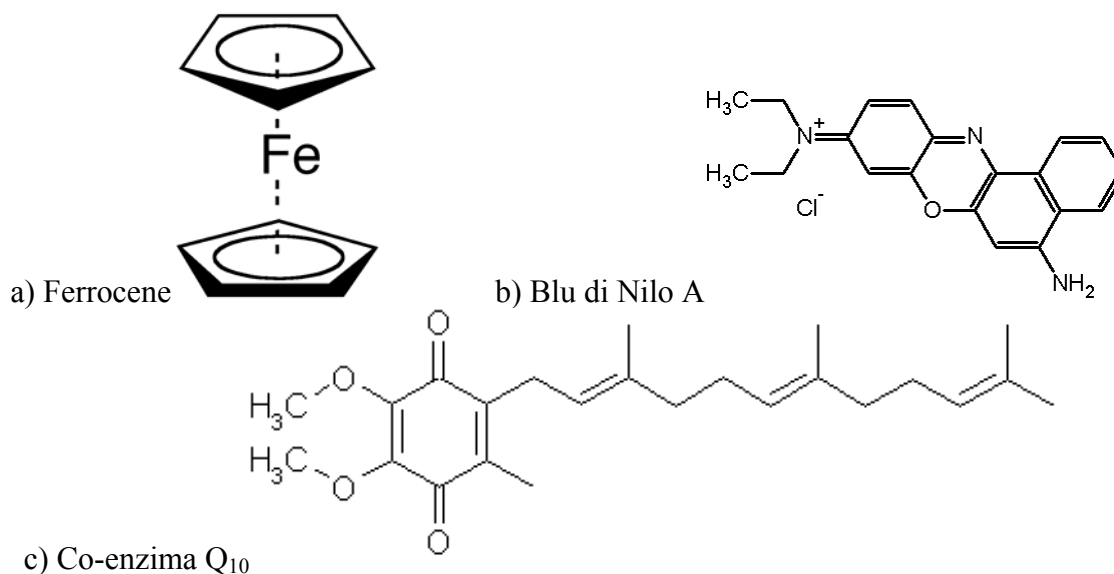
- in soluzione;
- adsorbito fisicamente sulla superficie elettrodica;
- legato chimicamente sull'area superficiale del sensore;

- incorporato nella matrice dell'elettrodo (*bulk*);
- elettrodepositato sul sensore, mediante varie tecniche elettrochimiche.

Tabella A. Mediatori redox con relativi potenziali standard.

MEDIATORI REDOX ^{36,37,38}			
NATURALI		ARTIFICIALI	
Nome	E (mV) vs. SHE	Nome	E (mV) vs. Ag AgCl
Citocromo a ₃	+290	Resazurina	-87
Citocromo c	+230	Blu di Meldola	-95
Citocromo b	+80	Gallocianina	-142
FAD	-230	Tionina	-235
Ferredossina	-430	Blu di toluidina	-237
FMN	-230	Blu di Nilo A	-250
NAD ⁺	-320	Verde di Janus	-260
NADP ⁺	-320	Esacianoferrato	+370
Rubredossina	-50	p-Benzochinone	+540
Ubichinone	+45	o-Fenilendiammina	+30
Vitamina K ₂	-30	3,4-Diidrossibenzene	-100

Nella Figura K. sono rappresentate le strutture chimiche di alcune molecole aventi proprietà redox spesso utilizzate come mediatori, nella costruzione dei biosensori di II generazione.



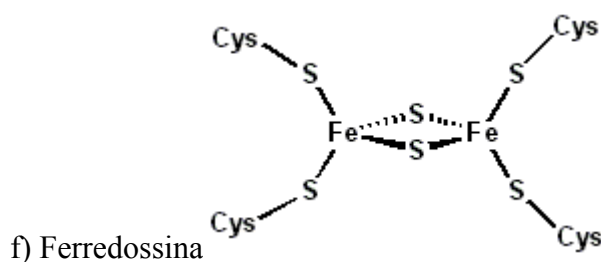
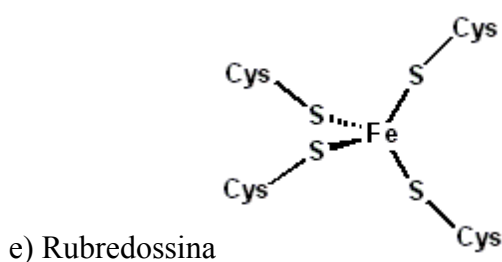
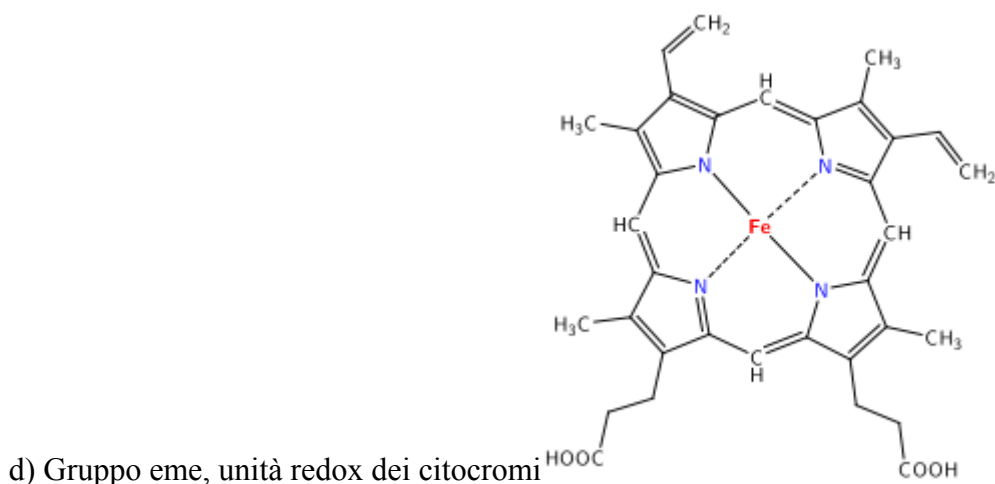


Figura K. Alcuni mediatori redox utilizzati nella costruzione dei biosensori.

Biosensore a glucosio di III generazione

Nei biosensori di terza generazione il trasferimento elettronico avviene direttamente, in quanto vi è un accoppiamento diretto tra la superficie elettrodica ed il sito attivo dell'enzima. Quindi l'assenza del mediatore conferisce una selettività migliore, poiché il potenziale di lavoro è identico a quello dell'enzima e quindi meno propenso alle eventuali interferenze, ma anche perché non c'è più presente un intermediario tra l'enzima ed il sensore. Il maggior svantaggio dei biosensori di terza generazione risiede nel numero ridotto di enzimi capaci di trasferire elettroni direttamente all'elettrodo. Il trasferimento elettronico avviene anche quando l'enzima ed il mediatore sono co-immobilizzati sulla superficie dell'elettrodo, cosicché il componente biologico diventa parte integrante del trasduttore di segnale. La co-immobilizzazione avviene quando:

- il mediatore si lega covalentemente all'enzima ed in seguito l'enzima si fissa sull'elettrodo;
- l'enzima è intrappolato in una matrice polimerica redox;
- l'enzima ed il mediatore sono immobilizzati in un polimero conduttore.

Nel 1977, Hill³⁹ e Kuwana,⁴⁰ studiando il trasferimento elettronico di alcune proteine redox mediante l'uso della voltammetria ciclica, dimostrarono che il citocromo *c* presenta agli

elettrodi d'oro ed indio drogato con stagno, un comportamento elettrochimico reversibile. Il citocromo *c* è una piccola molecola proteica avente proprietà redox (partecipa al trasferimento degli elettroni in composti biologici) ma senza essere un enzima. Tarasevich⁴¹ e Yaropolov⁴² dimostrarono nel 1979 che anche gli enzimi, come la laccasi e la perossidasi da rafano, mostrano trasferimento elettronico diretto all'elettrodo. Oltre al citocromo *c*, esistono altre proteine utilizzate nella costruzione dei biosensori di III generazione: mioglobina, emoglobina, cellobiosio deidrogenasi, catalasi, solfito deidrogenasi, emichinone alcool deidrogenasi, chinolo-nitrato ossidoreduttasi, etc.⁴³ Composti organici con elettroni π delocalizzati e conformazione planare e aventi conduttività elettrica, attraggono l'attenzione di Alberly e Craston⁴⁴ e Bartlett⁴⁵ che nel 1987, hanno modificato il sito attivo dell'enzima glucosio ossidasi con sali conduttori organici (*COS*), ottenendo così un trasferimento di elettroni diretto dal sito attivo dell'enzima alla superficie dell'elettrodo. I *COS* possono essere incorporati nella matrice elettrodica in tre diversi modi:

- a cristallo singolo;
- sotto forma di *pellets*;
- sotto forma di pasta insieme alla polvere di grafite.

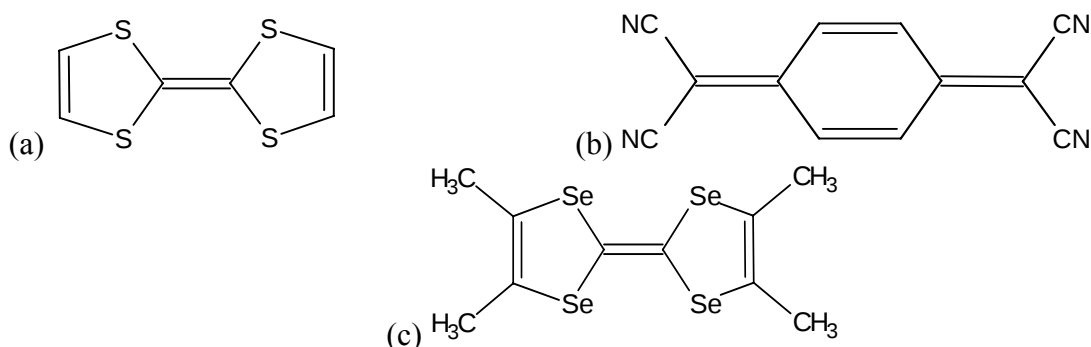


Figura L. Struttura di alcuni *COS*: (a) TTF (tetratiofulvalene); (b) TCNQ (tetracyanochinondimetano); (c) TMTSeF (tetrametiltetraseleniofulvalene)

La comunicazione diretta tra l'enzima e l'elettrodo avviene anche quando il sito attivo dell'enzima è cablato (*wired*) alla superficie del trasduttore di segnale per mezzo di polimeri conduttori. Un tipico polimero utilizzato per tale scopo è l'osmio bipiridile, che ha funzioni redox, legato alla polivinilpiridina; la struttura flessibile del polimero avvolge l'intero enzima e crea una rete tridimensionale elettrone-conduttrice, efficiente nel condurre il segnale elettronico.

Schuhmann⁴⁶ ha descritto un biosensore di terza generazione (*reagentless*), in cui la polivinilpiridina viene sostituita con il polipirrolo, aumentando così la velocità di

trasferimento elettronico, in quanto la struttura polimerica presenta una conduttività elettronica ed una flessibilità notevolmente superiori.

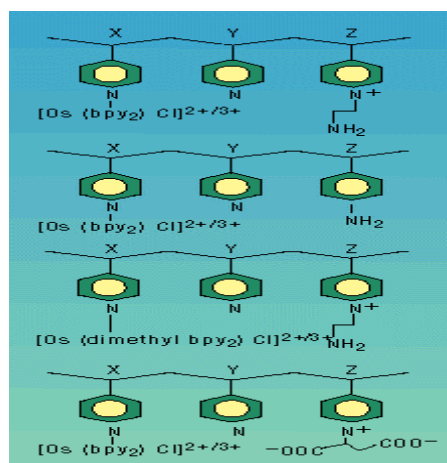


Figura M. La rete polimerica dell'osmio biperidile legato alla polivinilpiridina.

Caratteristiche di risposta dei biosensori enzimatici

Uno o più analiti, S ed S', in presenza dell'enzima, reagiscono formando i prodotti di reazione P e P':



Equazione U.

Per monitorare la trasformazione del substrato S nel prodotto P si utilizzano le seguenti strategie:⁴⁷

- il monitoraggio del decremento della concentrazione del co-substrato S';
- il riciclo del prodotto di reazione P;
- la misura dello stato redox del sito attivo, del cofattore, del gruppo prostetico, mediante l'impiego di mediatori;
- il trasferimento diretto elettronico tra il sito attivo ed il sensore.

L'Unione Internazionale di Chimica Pura ed Applicata (IUPAC) ha stabilito i criteri che devono essere seguiti per la valutazione e caratterizzazione dei biosensori.⁴⁸

Parametri analitici^{49,50}

La *calibrazione* si esegue per aggiunta di soluzioni standard di analita, misurando e rappresentando graficamente la risposta allo stato stazionario (R_{ss}), possibilmente eseguendo la sottrazione del segnale di fondo (R_0), in funzione della concentrazione, c , o del suo logaritmo, $\log c/c_0$.

La *sensibilità* (S) non è altro che la pendenza della curva di calibrazione ($(R_{ss}-R_0)$ in funzione della c o del $\log c/c_0$):

$$S = \frac{R_{ss} - R_0}{c} = \frac{\Delta R}{c}$$

Equazione V.

L'*intervallo dinamico di concentrazione* è l'intervallo di concentrazione in cui una variazione della concentrazione corrisponde ad una variazione del segnale del sensore. La dipendenza della concentrazione dal segnale segue l'Equazione W:

$$R = Sc^x$$

Equazione W.

l'intervallo dinamico di concentrazione è l'intervallo di concentrazione per il quale $x \neq 1$.

L'intervallo lineare dinamico di concentrazione è quella parte del intervallo dinamico di concentrazione per cui $x=1$.

L'intervallo lineare dinamico di concentrazione del sensore è limitato dalle proprietà biocatalitiche e biocomplessanti del recettore biologico. Esso può essere significativamente ampliato per mezzo di una barriera di diffusione esterna, con conseguente diminuzione della sensibilità.

Il limite di rilevabilità (*Limit of Detection, LOD*) ed il limite di quantificazione (*Limit of Quantification, LOQ*) dipendono dal rumore di fondo (*background noise signal*) e dal bianco (*blank*) della misura.⁵¹ Il LOD, espresso come valore di concentrazione (C_{LOD} , mol/L) o di massa (q_{LOD} , mol), deriva dal valore della più bassa corrente misurabile (R_{LOD}):

$$R_{LOD} = R_0 + ks_{blank}$$

Equazione X.

dove R_0 : corrente di fondo (A);

k: costante numerica

s_{blank} : deviazione standard del segnale attribuibile al bianco della misura.

Il limite di rilevabilità ed il limite di quantificazione, espressi in termini di concentrazione, sono dati da:

$$C_{LOD,LOQ} = \frac{ks_{blank}}{S}$$

Equazione Y.

dove $k=3$ o 10 , per C_{LOD} o C_{LOQ} , rispettivamente;

S: sensibilità.

Al di sotto del valore di LOD, il segnale è indipendente dalla concentrazione dell'analita.

La *selettività* è il parametro che quantifica il grado di interferenza, sulla misura effettuata, di specie estranee che non siano l'analita in causa. Per un biosensore, essa dipende sia dal trasduttore che dal componente biologico. Alcuni enzimi utilizzati nella costruzione dei biosensori sono altamente selettivi, ma esistono anche enzimi con specificità di classe (alcol ossidasi, perossidasi, laccasi, tirosinasi, aminoacido ossidasi, etc.). La modalità più semplice per eliminare alcuni interferenti è rappresentata dall'utilizzo di membrane protettive, esterne o interne, (come per il biosensore a glucosio), ma si possono utilizzare anche sensori compensatori senza il recettore biologico (misura differenziata).⁵²

L'*affidabilità* di un biosensore dipende dalla sua selettività e riproducibilità. Per essere affidabile, la sua risposta deve essere direttamente correlata con la concentrazione dell'analita d'interesse e non deve variare con le variazioni della concentrazione delle sostanze

interferenti eventualmente presenti nel campione sottoposto all'analisi. L'affidabilità non è altro che l'accuratezza con cui viene definita la risposta globale del biosensore.

La *riproducibilità* è la misura della variazione all'interno di una serie di osservazioni o risultati ottenuti in un certo periodo di tempo, ed è generalmente valutata entro l'intervallo lineare dinamico di concentrazione del sensore/biosensore.

Parametri dinamici

Il *tempo di risposta* è il tempo necessario al sensore/biosensore per arrivare al 90% del nuovo stato stazionario, in corrispondenza della variazione di concentrazione.

Il *tempo di risposta transiente* è il tempo necessario alla derivata prima del segnale (dR/dt) in uscita per raggiungere il suo valore massimo, dopo l'aggiunta dell'analita. Entrambi i parametri dipendono da:

- geometria della cella;
- condizioni di trasporto nella cella;
- meccanismo di risposta dell'elettrodo;
- attività del sistema di riconoscimento biologico.

Il *sample throughput* è il numero di campioni analizzati nell'unità di tempo, senza aver subito interferenze da parte dei campioni precedentemente analizzati. Questo parametro dipende dal *tempo di recupero* necessario al biosensore per ritornare allo stato stazionario iniziale.

Il *tempo di residenza* è il tempo in cui l'analita si trova a contatto col sensore/biosensore.

Il *tempo di vita* (t_L) di un biosensore⁵³ è definito come il tempo (operazionale o di conservazione) necessario affinché la sensibilità diminuisca di un fattore 10 (t_{L10}) o che raggiunga il 50% del valore iniziale (t_{L50}).

La *stabilità a lungo termine* (*long-term stability*) è caratterizzata dal *drift* della risposta del biosensore e dalla deviazione standard residua del segnale di risposta in una soluzione di composizione, temperatura e condizioni idrodinamiche costanti.

Analisi in flusso⁵⁴

Nelle tecniche elettroanalitiche *in flusso*, un campione liquido o una sua frazione, è trasportato dal flusso trasportatore (*carrier*), dal punto di entrata del campione nel *carrier* al punto di uscita, oppure ritorna al punto di entrata, quando si ricicla, passando attraverso tutte le fasi del processo di analisi. Le tecniche di analisi in flusso sono caratterizzate dalla dispersione e la rilevazione dell'analita/analiti che avviene sotto controllo idrodinamico del flusso trasportatore. Il sistema di rilevazione (trasduttore di segnale o biosensore) è inserito in una cella elettrochimica di geometria variabile. Si distinguono celle a strato sottile (*thin layer*), a getto sulla parete (*wall jet*), etc.

Analisi in flusso—Flow Analysis (FA)

L'analisi in flusso è una tecnica analitica che si basa sulla misura di un campione liquido, il quale viene introdotto, processato e rilevato in un flusso trasportatore. Il campione può essere sottoposto a processi di trasporto, di separazione in flusso, a reazioni chimiche, a trattamento termico, etc., mentre si trova in condizioni di dispersione controllata dalla diffusione e/o dalla convezione. Si distinguono due modi di analisi:

- in flusso continuo;
- in flusso segmentato.

In funzione della modalità di introduzione del campione nel flusso trasportatore, si ha un'analisi in flusso continua o intermittente.

Analisi in flusso segmentato (SFA)

Le caratteristiche della SFA sono:

- il flusso trasportatore è segmentato per mezzo di bolle di aria o altro gas, avente la funzione di dividere e separare tra di loro i campioni introdotti nel flusso, minimizzando anche il processo di dispersione del campione. Le bolle d'aria mantengono un flusso stabile, limitano la contaminazione reciproca dei campioni e facilitano l'omogeneizzazione del campione con i reagenti;
- il campione viene aspirato nel *carrier*.

Flow Injection Analysis-FIA

La FIA è una tecnica analitica in flusso, in cui, il campione liquido e/o il reagente è iniettato in un flusso non segmentato del *carrier* (inerte o attivo verso il campione/reagente) ed il campione o il reagente o un prodotto di reazione viene rilevato al detector. L'iniezione significa la formazione di zone ben definite di campione o reagente nel flusso trasportatore, e dove esse si disperdono in maniera controllata. L'immissione di volumi ben definiti e altamente riproducibili del campione si esegue con l'aiuto delle valvole di iniezione. Il profilo di concentrazione del campione che entra nella cella di misura, dipende dalla modalità di introduzione del campione, dai parametri del flusso, e dalla geometria del canale FIA situato tra il punto di campionamento ed il detector. La risposta tipica FIA è di tipo gaussiana, più o meno simmetrica, mentre la tipica risposta FA è un valore di *plateau*, a stato stazionario. Nella FIA, la dispersione del campione determina il *sample throughput*.

Le parti essenziali di un sistema FIA sono:

- pompa peristaltica;
- valvola di iniezione;
- tubi di connessione;
- connettori.

Un sistema FIA può essere accoppiato con un sistema di misura spettrofotometrico o elettrochimico.

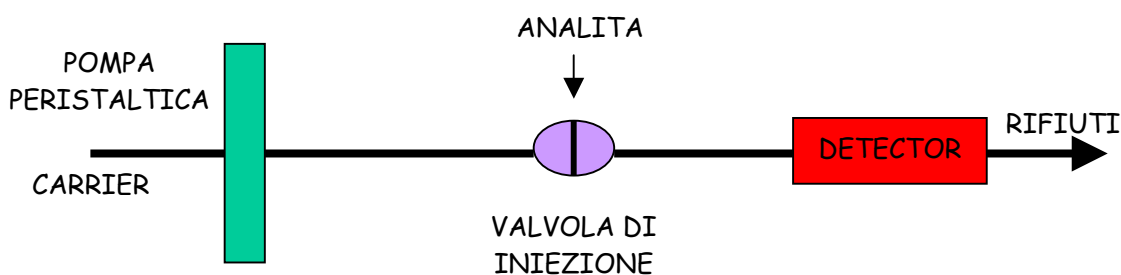


Figura N. Illustrazione schematica di un sistema FIA monocanale.

Elettrodi a stampa serigrafica

La stampa serigrafica è di notevole importanza nel campo della produzione di elettrodi basati sulla tecnologia a film spesso (*Thick Film Technology*, TFT). Quest'ultima permette di assemblare sensori tramite la deposizione sequenziale dei vari substrati utilizzati nel processo di fabbricazione. Elettrodi ottenuti mediante l'impiego di tali tecnologie vengono comunemente definiti come “*screen-printed*”, “*monouso*”, “*usa e getta*”, “*elettrodi stampati*” o più comunemente “*elettrodini*”, diminutivo che denota due delle loro tipiche caratteristiche: dimensioni e massa ridotte.

Tecnologia a film spesso

La tecnologia a film spesso (Figura O.) viene utilizzata per la costruzione di sensori solidi, planari, meccanicamente robusti, supportati su una base isolante, costituita generalmente da materiale plastico (cloruro di polivinile, policarbonato, poliestere, etc.) oppure ceramico (allumina, magnesia, etc.).⁵⁵ Il processo di fabbricazione si basa sulla stampa serigrafica, che permette la deposizione sequenziale del film spesso (*thick-film*) sul supporto o substrato solido isolante.

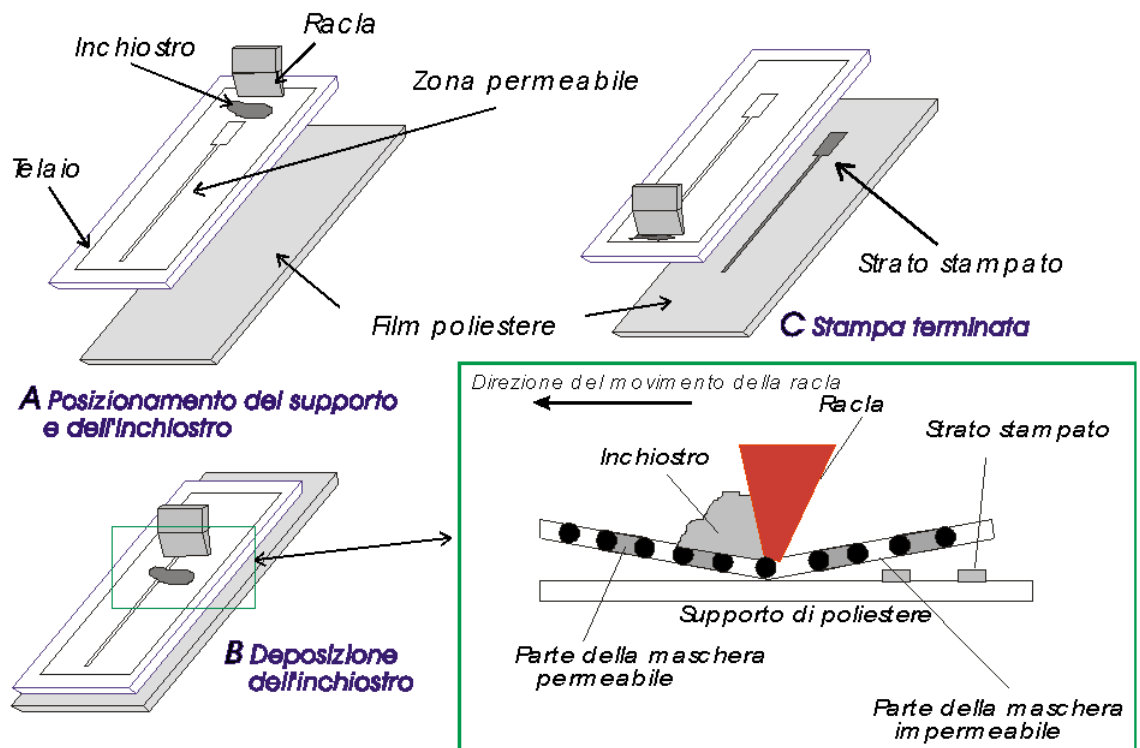


Figura O. Illustrazione grafica del processo di screen-printing per la produzione di sensori con la TFT.

La serigrafia (*screen-printing technology*) è una delle più antiche forme grafiche di riproduzione artistica, impiegata ancora oggi nell'industria tessile, e avendo le sue origini nell'antica Cina, essendo alla base della lavorazione della seta.⁵⁶

La composizione chimica e le proprietà elettriche ed elettrochimiche del *thick-film* variano in funzione dei desiderati che stanno alla base dello sviluppo e costruzione degli elettrodi *screen-printed*. Lo schema più comunemente applicato nella realizzazione degli elettrodi *monouso*, prevede per l'elettrodo di lavoro l'uso di inchiostri o paste, generalmente a base di grafite o vari tipi di carbone, ma anche a base di metalli nobili (Pt, Au, Ag, etc). Le paste contengono anche agenti leganti di vario genere (vetro in polvere, resine, solventi, vari additivi, etc.), che influiscono sulla viscosità, conducibilità, sul grado di idratazione e sulla resistenza alle variazioni termiche.^{57,58,59,60} I normali inchiostri da stampa sono costituiti da una parte liquida (mezzo di dispersione) e dal pigmento. Il mezzo di dispersione, spesso chiamato anche veicolo, può contenere idrocarburi alifatici o aromatici, vari esteri, chetoni e alcoli, ed anche un agente legante, di solito resine fenoliche, acriliche o viniliche. Il pigmento può essere la grafite, il carbone e/o il nerofumo. Per la stampa dell'elettrodo di riferimento/pseudo-riferimento si usano paste speciali a base di argento oppure di argento-cloruro di argento. L'elettrodo ausiliario viene, di solito, stampato usando lo stesso materiale impiegato nella stampa dell'elettrodo di lavoro oppure dell'elettrodo di riferimento. Una volta che è stata serigrafata la base elettrodica (nella configurazione a tre elettrodi, questa è rappresentata dagli elettrodi di lavoro, di riferimento/pseudo-riferimento e ausiliario/controelettrodo, che nello stesso tempo fungono anche da contatti elettrici) sul supporto solido, questa si ricopre sempre con un film spesso, di materiale dielettrico che funge da guaina protettrice.

Il processo di fabbricazione prevede tre fasi:

- deposizione
- asciugatura
- sinterizzazione.

La deposizione dei vari inchiostri e/o paste avviene meccanicamente, in uno o più passaggi, sul substrato solido, utilizzando una macchina adatta alla stampa serigrafica, munita di vari tipi e forme di telai che condizionano la forma e le dimensioni degli elettrodi stampati. L'asciugatura permette l'evaporazione dei prodotti volatili presenti nei vari inchiostri/paste, e avviene di norma a temperature <100°C. Dopo questa fase blanda, a temperature comprese tra 100°C e 1200°C, in funzione delle caratteristiche dei materiali impiegati e dei requisiti che si desiderano, avviene la fase di stabilizzazione e la polimerizzazione delle paste/inchiostri.

Elettrodi a stampa serigrafica (SPEs)

La stampa serigrafica permette di ottenere su larga scala elettrodi miniaturizzati, a basso costo (cca. 1-2 €/elettrodo) e con una riproducibilità elevata. Gli elettrodi utilizzati sono stati prodotti presso i laboratori di Chimica Analitica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università di Tor Vergata.

La macchina serigrafica è la “High Performance Multi Purpose Screen Printer DEK 245”, (Figura P.) della DEK, Weymouth, UK.



Figura P. La “High Performance Multi Purpose Screen Printer DEK 245”, macchina per la stampa serigrafica.

I supporti solidi utilizzati (poliestere, Autostat HT5, $d=0.175$ mm) sono della Autotype, Milano. Gli inchiostri vengono forniti dalla ditta Acheson Italiana (Milano) e sono di varie tipologie: Elettrodag 421, a base di grafite; Electrodag 477 SS RFU, a base di argento; inchiostro isolante Elettrodag 6018 SS.

Gli elettrodi *screen-printed* sono stati stampati nella caratteristica configurazione a tre (Figura R.). Il primo strato di inchiostro depositato è stato quello di argento per l'elettrodo di riferimento e l'ausiliare; nello stesso passaggio vengono eseguiti anche la deposizione dei contatti elettrici. Il secondo passaggio permette la stampa dell'elettrodo di lavoro, utilizzando l'inchiostro a base di grafite. Per ultimo viene impiegato l'inchiostro isolante, che delimita anche l'area dell'elettrodo di lavoro. Sono previsti dei trattamenti termici, dopo ogni deposizione, come segue: 100°C per 10 min., 120°C per 10 min., e 70°C per 20 min.

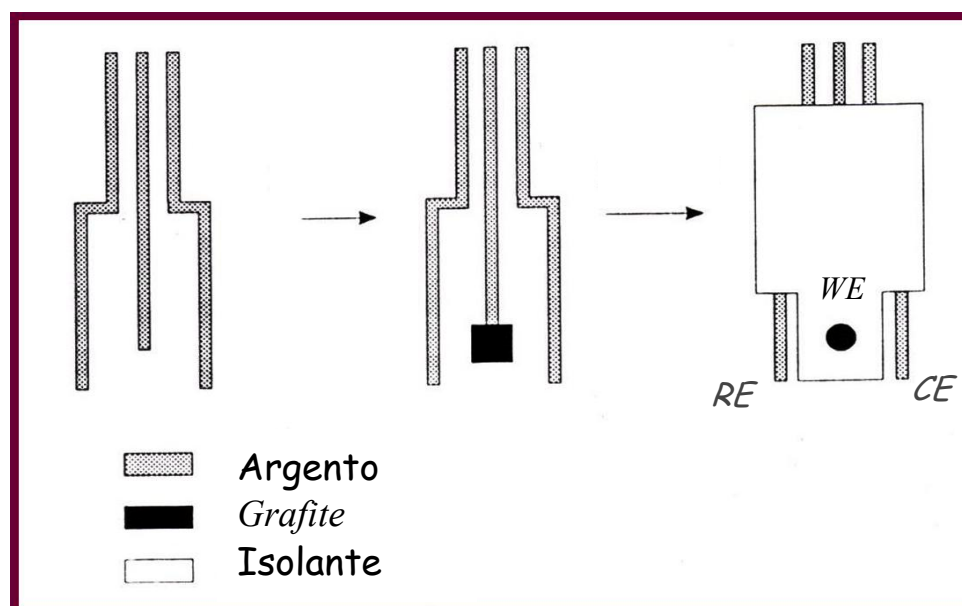


Figura R. Le tre fasi della stampa.

Su ciascun substrato di poliestere sono stati serigrafati contemporaneamente fino a 20 sistemi elettrodici (Figura S.). Il diametro di ogni elettrodo di lavoro è di norma compreso tra 2-3 mm. Come supporto rigido, per conferire resistenza ad ogni elettrodo, si usa il policarbonato, su di cui vengono immobilizzati gli elettrodi *screen-printed*.

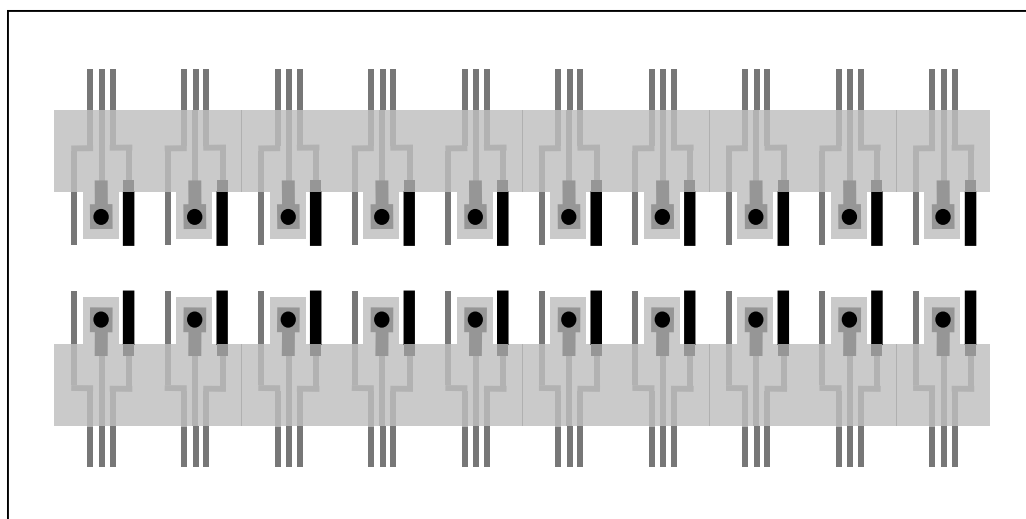


Figura S. Foglio di poliestere contenente 20 elettrodi ottenuti mediante la TFT.

Capitolo II - Elettrodi mediati per la determinazione del NADH

Elettrodi mediati per la determinazione del nicotinammide adenin dinucleotide

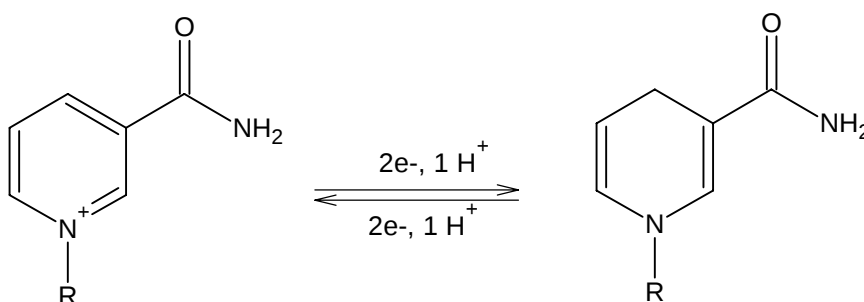
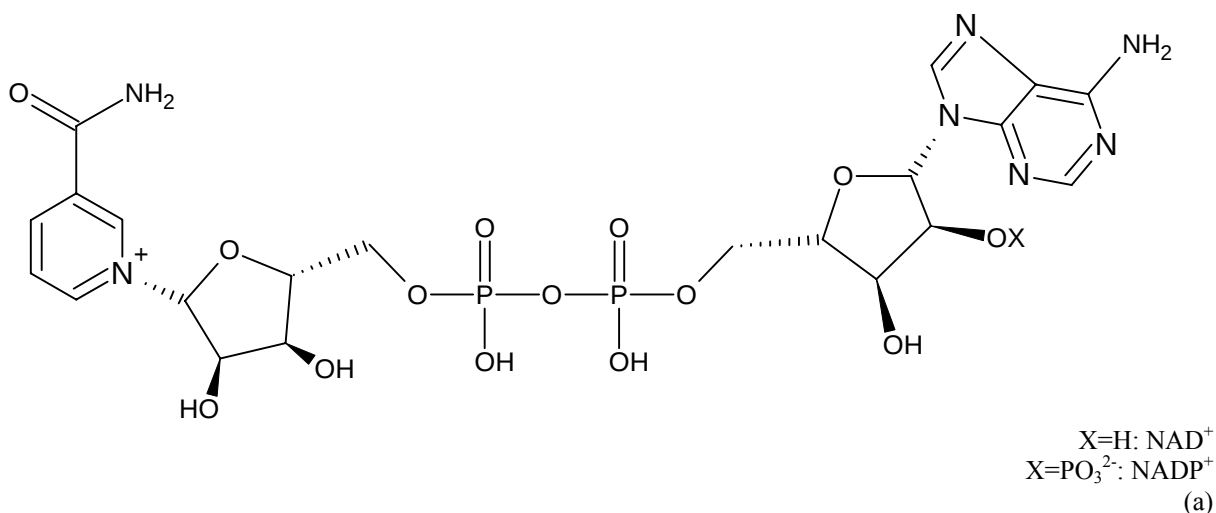
Nicotinammide adenin dinucleotide

Il nicotinammide adenin dinucleotide [NAD(P)H] è un trasportatore naturale di elettroni, e partecipa ai processi di riduzione e ossidazione che si svolgono nelle cellule. Negli organismi viventi viene ossidato nel primo passaggio del trasporto elettronico dalla NADH deidrogenasi:



Equazione A.

Il nicotinammide adenin dinucleotide, sia nella sua forma ridotta [NAD(P)H] che in quella ossidata [NAD(P)⁺], è il co-enzima di più di 450 deidrogenasi,⁶¹ e gioca un ruolo attivo e molto importante in numerosissime reazioni enzimatiche.⁶²



(b)

Figura A. Rappresentazione grafica del NAD(P)H; (a) forma ossidata; (b) forma abbreviata, generalmente utilizzata.

L'impiego per applicazioni pratiche (sintesi organiche, sviluppo di biosensori, etc.) di enzimi NAD(P)H dipendenti è limitato fortemente dalla caratteristica di questo co-enzima di

non essere legato all'apoenzima. Nel campo dei sensori e dei biosensori (basati sulle deidrogenasi NAD(P)H dipendenti) elettrochimici, la rivelazione del nicotinammide adenin dinucleotide è inoltre influenzata da:^{63,64}

- l'ossidazione del NADH agli elettrodi convenzionali (Au, Pt, carbone vetroso, grafite, etc.) avviene a sovrapotenziali;
- la formazione di radicali cationici e conseguente adsorbimento all'elettrodo;
- la formazione di dimeri enzimaticamente inattivi.

L'utilizzo dei mediatori redox nella costruzione dei sensori e biosensori ha permesso di ovviare la maggior parte di questi problemi. La rigenerazione del co-enzima può essere effettuata anche per via elettroenzimatica, sfruttando l'accoppiamento enzima-mediatore.

Mediatori redox utilizzati nella misura del NADH

La modalità più semplice per la determinazione, per via elettrochimica, del NADH consiste nel far avvenire la reazione di ossidazione direttamente all'elettrodo. Ciò comporta che il potenziale di lavoro applicato sia molto più positivo (sovrapotenziale, ≈ 1 V)⁶⁵ del potenziale formale redox (E^0) della coppia NAD^+/NADH (-0.56 V vs. SCE). A sua volta, il sovrapotenziale è direttamente responsabile degli effetti secondari negativi che si manifestano all'elettrodo.

I mediatori redox, naturali o artificiali, nella loro forma ossidata agiscono da agenti ossidanti primari per il NAD(P)H, velocizzano la reazione di trasferimento elettronico e abbassano il potenziale necessario per la reazione al livello del loro potenziale formale redox.

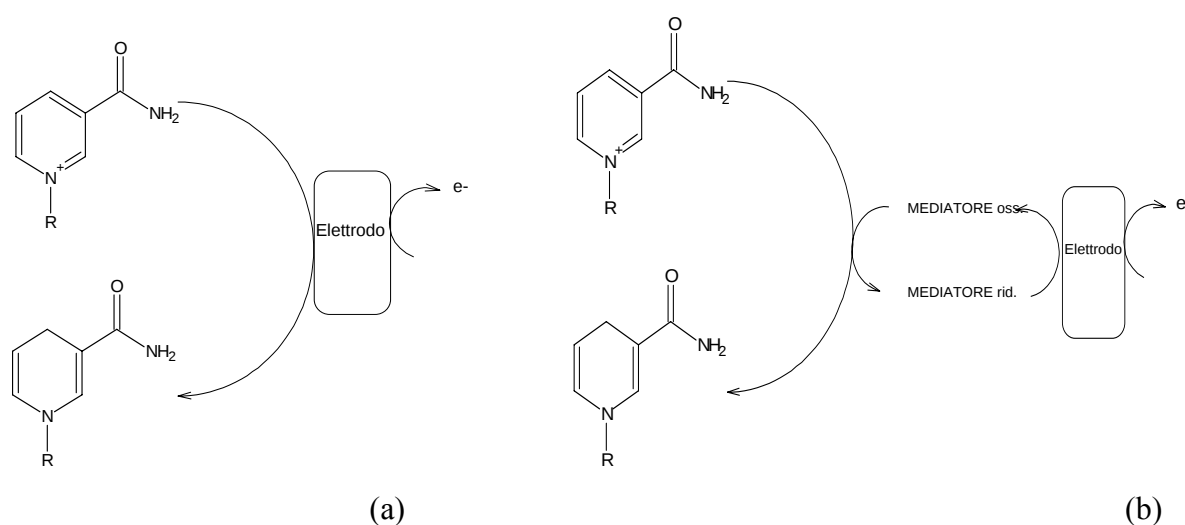


Figura B. Meccanismo di ossidazione del NADH: (a) diretto all'elettrodo; (b) mediato.

L'utilizzo dei mediatori, rende le misure elettrochimiche meno dipendenti dalla concentrazione dell'ossigeno in soluzione, riduce al minimo le eventuali interferenze che potrebbero influire sulla misura, e se il mediatore non implica uno scambio di protoni, il sensore o il biosensore sono relativamente indipendenti dalla variazione del pH.

In questo caso il mediatore deve essere anche selettivo verso l'ossidazione del NAD(P)H, deve avere una stechiometria ben definita con il NAD(P)H, e deve generare il NAD(P)⁺ enzimaticamente attivo.

Tradotto in termini di velocità di reazione tra il co-enzima ed il mediatore, la costante di velocità di secondo ordine dovrebbe essere almeno $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, per avvicinarsi quanto più possibile ad un processo controllato dalla diffusione. Inoltre bisognerebbe avvicinarsi sempre di più alla finestra ottimale di potenziali compresa tra 0 e $\approx -0.200 \text{ V}$.⁶⁶ Il processo di ossidazione elettrochimica del NAD(P)H a NAD(P)⁺ implica il trasferimento di 2 elettroni ed un protone. Il comportamento redox, non mediato, delle coppie NAD(P)⁺/NAD(P)H all'elettrodo è irreversibile, forma dimeri inattivi (Figura C.) e avvelena l'elettrodo.

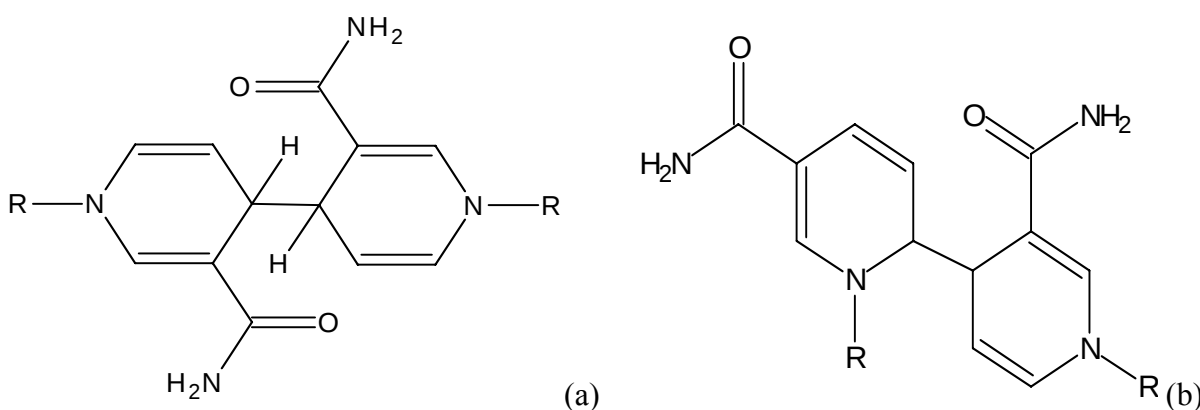
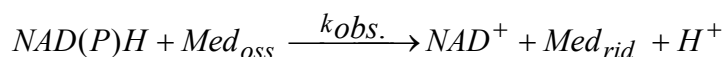


Figura C. Prodotti secondari di ossidazione: dimeri inattivi enzimaticamente.

Il meccanismo di ossidazione mediata del NAD(P)H è il seguente:

1. la forma ossidata del mediatore ($\text{Med}_{\text{oss.}}$), confinata all'interfaccia con l'elettrodo, ossida il NAD(P)H:



Equazione B.

2. il mediatore è riossidato all'elettrodo applicando un potenziale più positivo del potenziale formale redox ($E^{0'}$) del mediatore stesso:



Equazione C.

dove $k_{\text{obs.}}$ è la costante di velocità di secondo ordine ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), k_s è la velocità di trasferimento elettronico (s^{-1}) e x è il numero di protoni scambiati, che dipende dalla struttura chimica del mediatore e dal pH.⁶⁷

Oltre al fatto che le cinetiche di trasferimento elettronico devono essere rapide, Alberly e Hillman⁶⁸ hanno sottolineato che un'efficiente ossidazione del co-enzima dipende anche dalla distribuzione spaziale del mediatore all'elettrodo. Nel caso di un monostrato tutte le molecole del mediatore sono in diretto contatto con la superficie dell'elettrodo e quindi sono tutte disponibili per il processo catalitico; l'unico svantaggio è rappresentato dalla quantità finita di molecole redox che può essere immobilizzata in un monostrato (circa 10^{-9} - 10^{-12} mol/cm²). Se il processo di modifica dell'elettrodo prevede l'immobilizzazione di più monostrati di mediatore oppure la modifica *bulk*, si ovvia a questo problema. In questo caso il trasferimento di carica deve essere molto rapido e ciò non si può realizzare sempre. Il grande vantaggio è rappresentato dal fatto che la $k_{\text{obs.}}$ non deve essere molto elevata (circa $10 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$), mentre per un elettrodo modificato con un monostrato di mediatore la $k_{\text{obs.}}$ deve essere maggiore di $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$.⁶⁹

Miller^{70,71,72} specifica inoltre, che un mediatore adatto per l'ossidazione del NAD(P)H deve possedere un'attività catalitica di base, caratterizzata da un gruppo o-chinone, o-fenilendiammina o p-fenilendiammina (Figura D.).

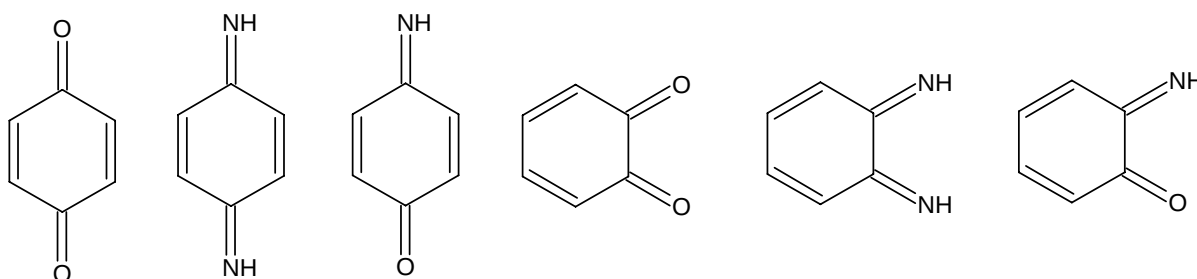


Figura D. Accettori di $2e^-$ e $1H^+$ efficienti nell'ossidazione del NAD(P)H aventi una funzionalità catalitica di base.

La loro stabilità chimica ed elettrochimica è però ridotta, non possono essere facilmente immobilizzati sulla superficie elettrodica ed il valore del loro E^0 limita fortemente le applicazioni pratiche. La loro stabilità aumenta quando si presentano inclusi in molecole che presentano nuclei aromatici condensati (Figura E.).

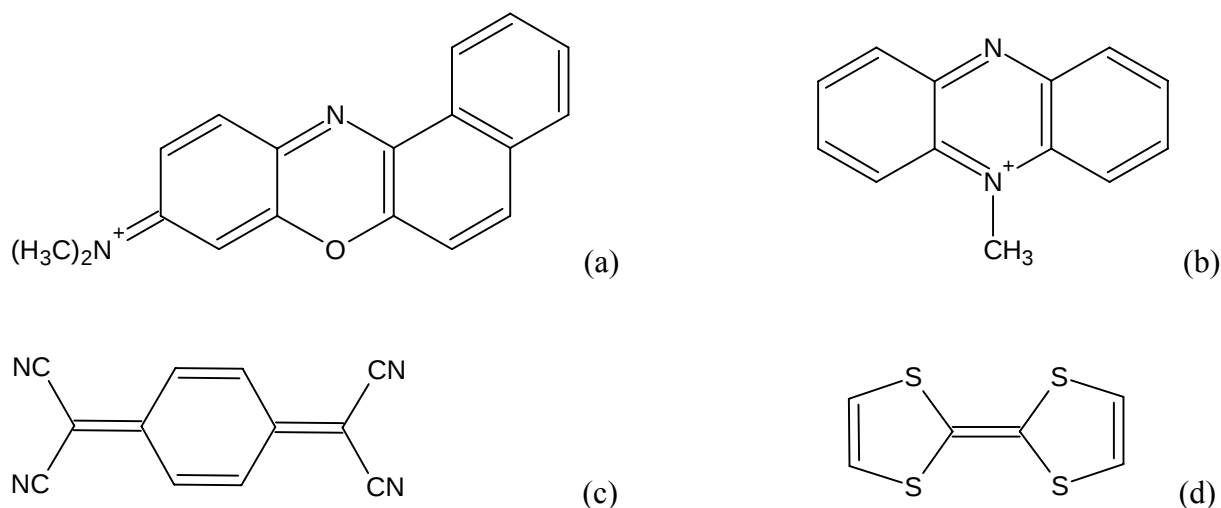


Figura E. Alcuni mediatori redox tra i più utilizzati per l'ossidazione del NAD(P)H: (a) Meldola blue⁷³; (b) N-metil fenazinio⁷⁴ (NMP); (c) tetracianochinodimetano⁷⁵ (TCNQ); (d) tetratiofulvalene⁷⁶ (TTF).

E' noto anche il fatto che mediatori carichi positivamente danno velocità di reazione maggiori di quelli neutri.⁷⁷ L'aggiunta di Ca^{2+} , nella soluzione di contatto di un sensore per il NADH modificato covalentemente con il pirrolochinolino chinone (PQQ), aumenta di ben 10 volte l'attività catalitica ossidativa. L'aggiunta del Ca^{2+} non modifica l' E^0 del mediatore, quindi l'aumento dell'attività catalitica è dovuto solamente alle proprietà intrinseche del mediatore. Questo comportamento dei mediatori redox carichi è stato dimostrato sia per altri ioni metallici (Mg^{2+} e Ba^{2+}), che per altri derivati dell'o-chinone.⁷⁸

Negli ultimi anni sono stati investigati anche una serie di derivati dell'adenosina (adenosina mono-, di- e trifosfato: AMP, ADP e ATP) che si sono mostrati essere efficienti mediatori per il NAD(P)H quando vengono elettro-ossidati.^{79,80} L'adenosina neutra presenta la più alta velocità di reazione con il NADH, mentre la crescita delle cariche negative provoca la diminuzione della k_{obs} , anche se i E^0 dell'intera classe sono molto vicini tra di loro.

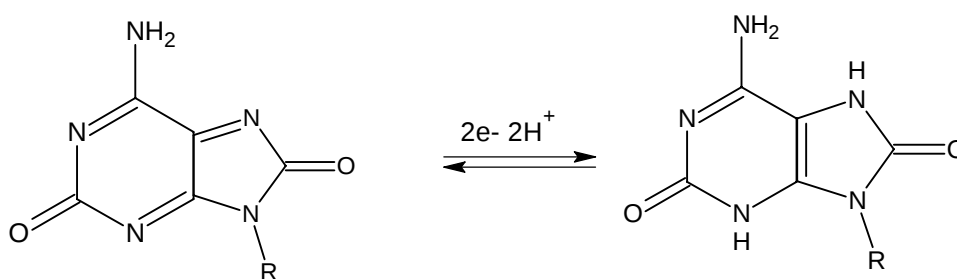


Figura F. Struttura e reazione redox dell'anello adenilico elettroossidato del NAD^+ che agisce come mediatore nell'ossidazione del NADH.¹⁹

Un altro gruppo di mediatori è quello dei derivati nitro-fluorenonici.^{81,82,83}

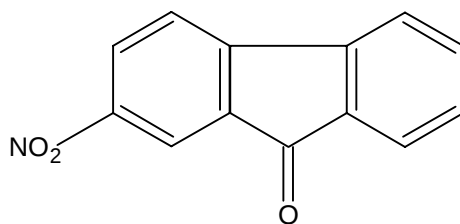
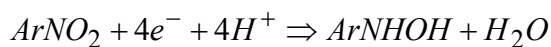


Figura G. Struttura del 2-nitro-9-fluorenone.

La riduzione catodica dei composti nitro-derivati e aril-nitro-derivati (ArNO_2) è ben investigata in letteratura.⁸⁴ L'elettroriduzione irreversibile del gruppo $-\text{NO}_2$, in ambiente neutro o leggermente basico, genera alla superficie dell'elettrodo una funzione idrossilamminica:



Equazione D.

Il gruppo idrossilamminico si ossida reversibilmente all'elettrodo:



Equazione E.

Come si osserva dall'Equazione E., nel processo redox sono implicati $2e^-$ e 2H^+ , e quindi gli aril-nitro-derivati e i nitro-derivati sono ben adatti per mediare processi di elettro-ossidazione che coinvolgono il NADH. Nella Figura G. è mostrato il meccanismo di riduzione elettrochimica del 2-nitro-fluorenone e l'equilibrio redox fra le sue forme ridotta e ossidata.

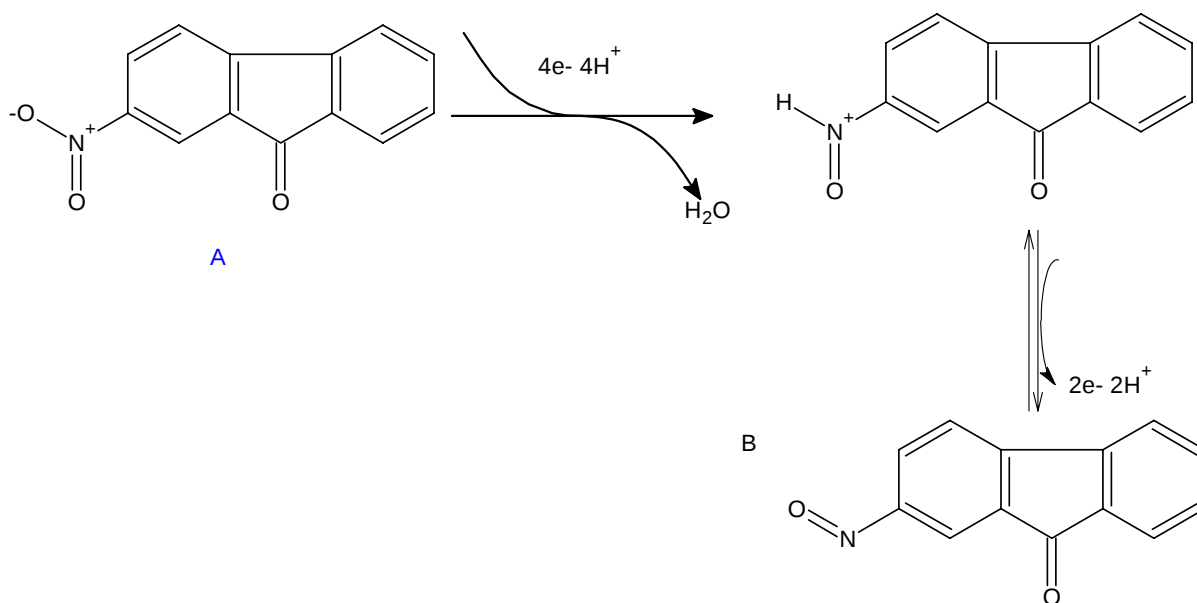


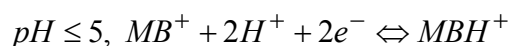
Figura G. Meccanismo catalitico del 2-nitro-9-fluorenone. A: forma inattiva; B: forma attiva.

Come per il pirrolochinolino chinone, la presenza del Ca^{2+} nel sistema fa sì che la velocità di reazione incrementi di ben 5 volte, confermando che i mediatori carichi presentano velocità di reazione maggiori di quelli neutri.⁸⁵

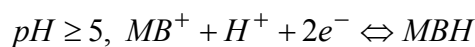
Campanella⁸⁶ ha proposto anche un sensore a base di titanio poroso ricoperto da una lega binaria (Pt-Pd) oppure ternaria (Pt-Pd-Rh/Ir), con la caratteristica di abbassare il sovrapotenziale richiesto per l'ossidazione del NADH. Generalmente, la modifica di vari materiali elettrodici, come il carbone, con metalli presenta delle limitazioni, in quanto la riduzione del sovrapotenziale di lavoro non è selettiva verso il NADH.

Un altro approccio di ricerca per lo sviluppo di sensori per il NAD(P)H si basa sull'utilizzo di elettrodi modificati con polimeri di vario tipo. Sono stati riportati in letteratura sensori a base di polianilina-polivinilsulfonato,⁸⁷ polimetiltiofene,⁸⁸ poli(acido indolo-5-carbossilico),⁸⁹ o derivati degli o-chinoni.⁹⁰

Uno dei mediatori redox più utilizzati nella costruzione dei sensori per NADH ed anche nella costruzione dei biosensori a base di deidrogenasi NAD(P)H dipendenti, è il *Meldola blu* (8-dimetilammino-2,3-benzofenossazina). Il potenziale formale redox della coppia $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ a pH neutro è -560 mV vs. SCE ,⁹¹ mentre l' $E^{\circ'}$ del *Meldola's blue* adsorbito su grafite, a pH 7.0, è -175 mV vs. SCE .⁹² Il meccanismo di ossidazione mediata dal *Meldola's blue* (MB) segue il classico schema: $2e^-$ e un H^+ ; ciò implica una variazione del $E^{\circ'}$ con la variazione del pH.⁹³ Infatti, nell'intervallo pH 2.0 ~ 5.0, il $E^{\circ'}$ varia di 60 mV/pH , mentre per valori di pH maggiori di 5.0 e fino a 10.0, la variazione del $E^{\circ'}$ si è ridotta a 30 mV/pH .⁹⁴ Questa dipendenza corrisponde al seguente schema di reazione:

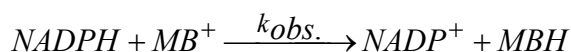


Equazione. F.

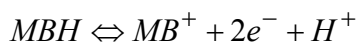


Equazione. G.

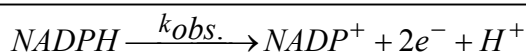
Il meccanismo di reazione per il NADPH è di tipo diretto:



Equazione H.1.



Equazione H.2.

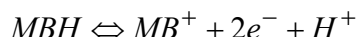


Equazione H.3.

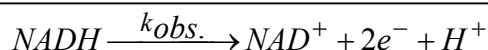
mentre per il NADH si ha la formazione di un complesso attivato [co-enzima – mediatore]:



Equazione I.1.



Equazione I.2.



Equazione I.3.

In letteratura sono riportati vari articoli in cui la modifica del sensore per il NADH avviene per semplice adsorbimento⁹⁵ del MB, mediante elettropolimerizzazione,⁹⁶ oppure mediante la modifica *bulk*⁹⁷ dell'inchiostro da stampa.

Ossidazione elettro(enzimatica) del NAD(P)H

In letteratura vengono descritti sensori modificati con enzimi ossidasi per il NAD(P)H e trasferimento diretto fra il componente biologico e l'elettrodo. Per esempio, per il NADH viene descritto un sistema che usa l'enzima diaforasi, con trasferimento elettronico diretto all'elettrodo, non molto efficiente.⁹⁸

Mediare, e quindi accelerare il processo di trasferimento di e^- dal NAD(P)H al trasduttore di segnale, rappresenta una delle vie di ricerca intraprese nella costruzione di biosensori per la misura del NAD(P)H ed anche nella costruzione dei biosensori amperometrici basati sulle deidrogenasi NAD(P)H dipendenti.

Bu et al.⁹⁹ hanno proposto due sensori per la misura del NAD(P)H basati sull'intrappolamento, della lipoammide deidrogenasi e della glutatione riduttasi, rispettivamente, in un gel redox ottenuto dalla co-polimerizzazione del mediatore vinilferrocene con acrilammide e N,N-metilenebisacrilammide; il tutto viene immobilizzato all'elettrodo mediante l'uso di una barriera protettiva (membrana da dialisi). La presenza della membrana esterna, il potenziale di lavoro (+400 mV vs. Ag|AgCl) ed il fatto che le misure vengono effettuate in soluzione satura di N_2 , sono alcuni dei fattori che limitano le potenziali applicazioni del biosensore amperometrico proposto da Bu et al.

Ramirez-Molina et al.¹⁰⁰ hanno sviluppato un elettrodo pasta di carbone (CPE) modificato con la diaforasi (DAP, E.C. 1.6.99.2) ed il ferrocene (FcH) per la misura del NADH a bassi potenziali di lavoro (0.0 V vs. Ag|AgCl). Riescono a limitare la perdita del mediatore, che si solubilizza gradualmente, aggiungendo alla soluzione di misura il Tween 20, un surfattante, che migliora di ben 5 volte la sensibilità e la stabilità operativa del sensore.

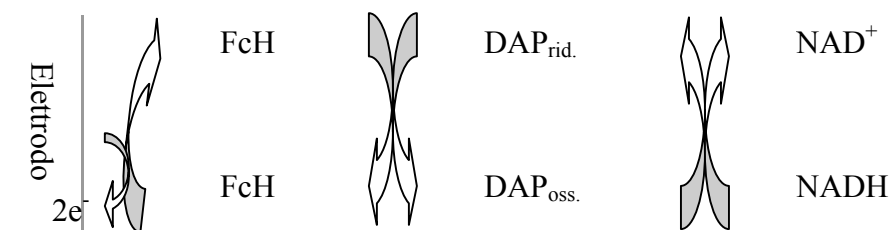
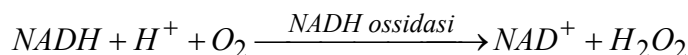


Figura H. Illustrazione schematica del sensore a NADH proposto da Ramirez-Molina et al.

Sulla base di questo sensore enzimatico hanno sviluppato anche un biosensore per la misura del acido lattico, co-immobilizzando la lattato deidrogenasi insieme alla diaforasi.

Le NADH ossidasi^{101,102,103} rappresentano un'altra classe di enzimi capaci di sfruttare l'O₂ come accettore di elettroni per generare H₂O₂ o H₂O, come illustrato nelle seguenti equazioni:



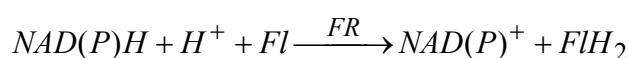
Equazione J.1.



Equazione J.2.

McNeil et al.¹⁰⁴ hanno riportato un biosensore per NADH basato sull'accoppiamento di una NADH ossidasi da *Thermus aquaticus*, il cui prodotto di reazione viene misurato con un elettrodo normale di Pt, ad un potenziale applicato di +650 mV vs. Ag|AgCl. Compagnone et al.¹⁰⁵ hanno proposto un biosensore amperometrico con la NADH ossidasi immobilizzata su di una membrana di tipo Immobilon AV, e co-immobilizzando anche la lattato deidrogenasi hanno ottenuto un biosensore per la misura del acido lattico nel siero umano. Montagne e Marty¹⁰⁶ hanno intrappolato sull'elettrodo di Pt la D-lattato deidrogenasi, la NADH ossidasi ed il NAD⁺ legato al destrano, per ottenere una prima versione del cosiddetto biosensore "reagentless" per la misura del lattato nei prodotti caseari.

Immobilizzando la flavina ossidoriduttasi (FR) in un film conduttore di polipirrolo anfifilico elettropolimerizzato su di un elettrodo convenzionale di carbone vetroso, Cosnier¹⁰⁷ ha dimostrato che a -100 mV vs. SCE, il biosensore è adatto per la misura di alcune flavine e nucleotidi pirimidiniche, secondo l'equazione:

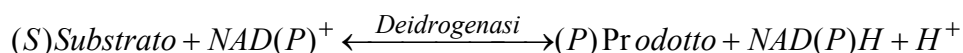


Equazione K.

dove Fl e FlH₂ rappresentano la flavina ossidata e la flavina ridotta, rispettivamente.

Il gruppo di Helmut Gunther¹⁰⁸ ha proposto e ha descritto l'AMAPOR: *artificial mediator accepting pyridinenucleotide oxidoreductase*, isolato dal *Clostridium thermoaceticum*. In funzione del potenziale redox è in grado di rigenerare il NADP o il NADPH, dimostrando potenzialità nell'essere proposto per le applicazioni che implicano l'uso di deidrogenasi NAD(P)H dipendenti.

I vantaggi che presenta l'ossidazione enzimatica del NAD(P)H rispetto a quella classica, portano allo sviluppo di biosensori amperometrici basati sulle deidrogenasi, con monitoraggio sia della produzione del co-enzima sia del suo consumo.¹⁰⁹ La reazione enzimatica catalizzata dalle deidrogenasi può essere descritta dalla seguente equazione:



Equazione L.

Si osserva facilmente che per questo tipo di biosensori amperometrici, il co-enzima ridotto, formatosi nella reazione, deve essere riossidato istantaneamente o dal mediatore o all'elettrodo, altrimenti la reazione (Equazione L.) arriva all'equilibrio. Il mediatore a sua volta, per riprendere le sue funzioni catalitiche, deve essere anch'esso riossidato rapidamente. I tre processi implicati nella reazione (enzimatico, mediato ed elettrochimico) si devono svolgere in uno spazio limitato, che conferisca la vicinanza minima possibile. La Figura H. descrive il processo di trasferimento di carica che ha luogo per una reazione catalizzata da una deidrogenasi NAD(P)H dipendente:

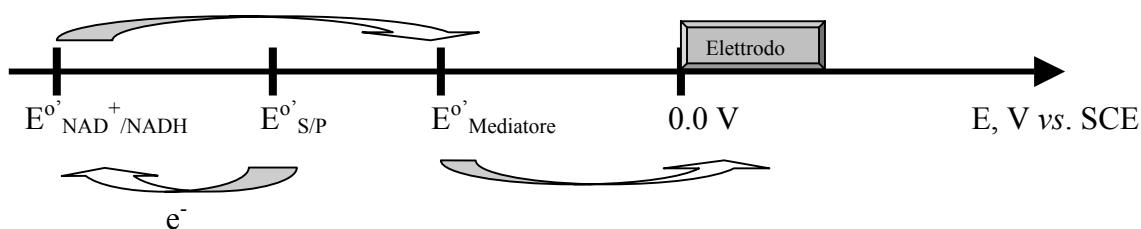


Figura H. Illustrazione del trasferimento di carica in una reazione di ossidazione catalizzata da una deidrogenasi NAD⁺ dipendente mediata elettrochimicamente, quando il $E^{\circ}_{S/P}$ è più positivo del $E^{\circ}_{NAD^+/NADH}$.¹¹⁰

Nella fase iniziale il trasferimento di e^- avviene in opposizione alla termodinamica del processo stesso, e quindi è richiesto un contatto intimo tra il mediatore ed il trasduttore di segnale per generare una forza motrice termodinamica netta a favore della produzione del NADH. Allo stesso tempo il processo elettronico mediato deve avvenire il più rapidamente possibile.

Lavoro sperimentale

Scopo del lavoro

Lo sviluppo di nuovi sensori elettrochimici per la misura del NADH è stato l'oggetto di questo lavoro sperimentale.

Il primo sistema studiato è basato sull'utilizzo di un mediatore redox, il Meldola blu, in grado di ossidare direttamente il co-enzima, mentre il secondo sistema è di tipo elettroenzimatico e sfrutta una NADH ossidasi da *Thermus thermophilus*, (prodotta tramite ingegneria genetica), accoppiata ad un sensore per l' H_2O_2 , che ha come mediatore il blu di Prussia. Il sensore per l'acqua ossigenata, è stato ampiamente descritto nel capitolo **“Elettrodo mediato per la determinazione del glucosio nel vino”**. Sono state realizzate anche le applicazioni analitiche, come la misura del glicerolo durante una fermentazione alcolica condotta in laboratorio e nella fermentazione alcolica in aziende vinicole.

Il terzo sistema investigato utilizza nanotubi di carbonio modificati con un mediatore redox poco investigato, la *Variammine blue*. Sono messe in evidenza le proprietà elettrochimiche e le potenzialità nel campo analitico, come piattaforma versatile per i biosensori NAD^+ dipendenti.

A) Elettrodo per NADH mediato con *Meldola blu*

Reagenti e strumenti e tecniche di analisi

Il sale di Reinecke (>97%), il β -NAD⁺ (>95%, HPLC), il Nafion[®] 5% (v/v) ed il NADH (>97%, HPLC) sono stati acquistati dalla ditta Fluka Chemie, Buchs, Svizzera. La glutaraldeide (GAD, 25% v/v soluzione acquosa), il glicerolo (99% v/v) e la glicerolo deidrogenasi (EC 1.1.1.6, 60 unità/mg solido, da *Cellulomonas sp.*) sono forniti dalla Sigma, St. Louis, MO, USA. Il fosfato monosodico e monopotassico, il bicarbonato di sodio, il KCl, l'H₃PO₄ (85%), l'H₂SO₄ (96%), e l'HCl (37%) sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia; il K₂HPO₄ ed il ZrCl₄ (>98%) provengono dalla Riedel-de Haen, Seelze, Germania. Il Meldola blu ed il carbonato di sodio sono forniti dalla Sigma, St. Louis, MO, USA.

Le misure elettrochimiche vengono condotte sia in amperometria in *bacth* (agitatore magnetico, potenziostato, cella elettrochimica e registratore) che in FIA. Il sistema FIA è composto da una pompa peristaltica (Gilson, modello Minipuls 3, Villers-le-Bel, Francia), da tubi di Tygon, da una cella in flusso a strato sottile ($d_{int}=15$ mm) e da una valvola di iniezione a 4 canali (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Per le misure amperometriche si è impiegato un potenziostato della Metrohm, (Herisau, Svizzera) connesso and un registratore analogico di tipo *X-t*, modello L250E (Linseis, Selb, Germania). Le misure elettrochimiche in voltammetria ciclica ed in cronoamperometria sono state condotte utilizzando un sistema μ Autolab, Type II, Electrochemical System (Eco Chemie, Utrecht, Olanda) dotato di PGSTAT-12 e il software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Olanda).

L'analisi HPLC ha utilizzato una colonna Bio-Rad Aminex HPX-87H, 300×7.8 mm, una pompa Knauer (WellChrom Maxi-Star K-1000), una valvola di iniezione (NiBest, USA) ed il *software* Knauer Eurochrome 2000 connesso al PC mediante l'interfaccia Knauer.

Sono stati utilizzati anche un agitatore magnetico (Heidolph, model MR 3001), una stufa (High Performance Oven, MOD 2100, F.lli Galli, Milano, Italia) ed una macchina per sottovuoto LAICA[®].

*Composizione del mezzo artificiale di fermentazione*¹¹¹

Il mezzo artificiale di fermentazione era costituito da una miscela di zuccheri, sali, minerali, vitamine e aminoacidi (come sorgente di azoto), la cui composizione è la seguente:

- zuccheri: glucosio (200 g/L) e fruttosio (200 g/L);
- sali: tartrato di potassio (5 g/L), acido L-malico (3 g/L), acido citrico (0.2 g/L), K_2HPO_4 (1.14 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.23 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.44 g/L);
- minerali in traccia: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (198.2 $\mu g/L$), $ZnCl_2$ (135.5 $\mu g/L$), $FeCl_2$ (32 $\mu g/L$), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (13.6 $\mu g/L$), H_3BO_3 (5.7 $\mu g/L$), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (29.1 $\mu g/L$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (24.2 $\mu g/L$), KJO_3 (10.8 $\mu g/L$);
- vitamine: myo-inositolo (0.1 g/L), piridossina-HCl (2 mg/L), acido nicotinico (2 mg/L), pantotenato di calcio (1 mg/L), tiamina-HCl (0.5 mg/L), acido p-amino benzoico (0.2 mg/L), riboflavina (0.2 mg/L), biotina (0.125 mg/L), acido folico (0.2 g/L);
- sorgenti di azoto: alanina (0.1 g/L), arginina (0.75 g/L), asparagina (0.15 g/L), acido aspartico (0.35 g/L), acido glutammico (0.5 g/L), glutammina (0.2 g/L), glicina (0.05 g/L), istidina (0.15 g/L), iso-leucina (0.2 g/L), leucina (0.3 g/L), lisina (0.25 g/L), metionina (0.15 g/L), fenilalanina (15 g/L), prolina (0.5 g/L), serina (0.4 g/L), treonina (0.35 g/L), triptofano (0.1 g/L), tiroxina (0.02 g/L), valina (0.2 g/L).

Elettrodi screen-printed bulk modificati con il Meldola blu e fosfato di zirconio (bMBZrP-SPEs)

Sintesi del fosfato di zirconio (α -ZrP)

La sintesi del fosfato di zirconio è identica a quella riportata in letteratura.¹¹² In breve, una soluzione 1M di acido fosforico (500 mL) viene lentamente aggiunta, sotto continua agitazione, ad una soluzione (500 mL) di $ZrCl_4$ allo 0.1 M preparata in 0.1 M HCl. Il precipitato gelatinoso formatosi si lava abbondantemente con H_2O distillata in un imbuto di porcellana di tipo Buchner, e si sottopone ad un trattamento termico a 50°C per 6 ore. Il fosfato di zirconio solido si polverizza finemente in un mortaio e si passa su di un setaccio ($d=0.05$ mm) per ottenere una polvere finissima di ZrP.

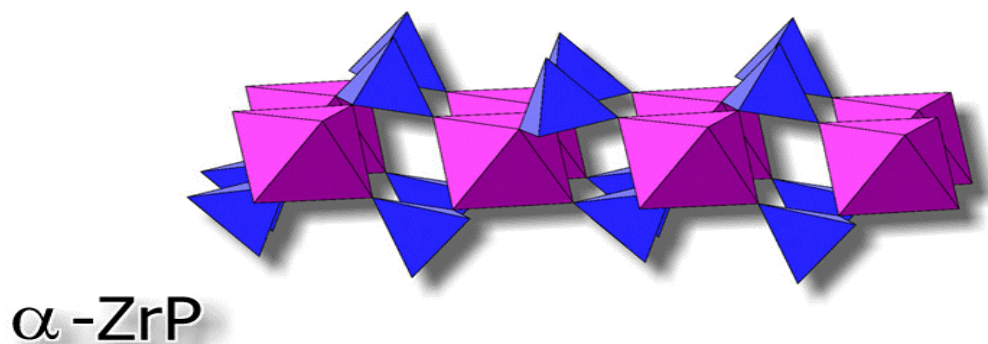


Figura A.1. α -ZrP: zirconio ottaedrico (rosa) e fosfato tetraedrico (blu).¹¹³

Immobilizzazione del mediatore

Il mediatore viene fatto adsorbire sul fosfato di zirconio per semplice immersione del medesimo (4 g) in 1 L di una soluzione acquosa di Meldola blu (MB, 0.2 g/L), per un'ora e sotto agitazione continua. In seguito, lo ZrP con il mediatore adsorbito si lava abbondantemente con H₂O distillata per rimuovere l'eccesso di mediatore non adsorbito. Il materiale solido così ottenuto (MBZrP) subisce lo stesso trattamento termico e meccanico descritto prima.

Stampa degli elettrodi bulk modificati con il Meldola blu - fosfato di zirconio (bMBZrP-SPEs)

La stampa è effettuata come descritto nel capitolo “*Elettrodi a stampa serigrafica-SPEs*”. Per la stampa degli *bMBZrP-SPEs* l'inchiostro a base di grafite è modificato, incorporando il MBZrP allo 22% w/w, ottenendo così l'inchiostro definitivo per la stampa dell'elettrodo di lavoro. Il diametro degli elettrodi di lavoro è di 3 mm, mentre l'elettrodo ausiliario e di riferimento sono stati stampati con l'inchiostro a base di argento. Dopo la stampa dell'elettrodo di lavoro, i fogli con gli elettrodi serigrafati vengono sottoposti a trattamento termico moderato (50°C per 30 minuti). Gli stessi vengono conservati in luogo asciutto e protetti dalla luce. La risposta elettrochimica verso il NADH, la stabilità operativa, la dipendenza dal valore di pH ed il potenziale di lavoro sono stati valutati mediante studi di voltammetria ciclica.

Produzione degli elettrodi (bulk) modificati con il Meldola blu-fosfato di zirconio ed il sale di Reinecke (bMBZrPRs-SPEs)

Gli elettrodi *bMBZrP-SPEs* vengono modificati ulteriormente elettrodepositando il sale di Reinecke sull'elettrodo di lavoro, partendo da una soluzione satura preparata in tampone fosfato 0.1M + 0.1M KCl, pH 6.0, applicando per 12500 s un potenziale costante di 1 V. Gli elettrodi così preparati (*bMBZrPRs-SPEs*) sono conservati in luogo asciutto e protetti dalla luce.

Preparazione di un biosensore a glicerolo

Sulla superficie dell'elettrodo di lavoro vengono sono stati depositati e fatti evaporare 2 μ L di una soluzione di glutaraldeide all'1% (v/v) preparata in acqua distillata, dopodiché altri 2 μ L di una miscela contenente la glicerolo deidrogenasi (2.5 UI) ed il Nafion[®] neutralizzato (1% v/v), è stata fatta reagire sull'elettrodo di lavoro per formare la membrana enzimatica. Il biosensore è stato conservato a 4°C, sotto vuoto. La stabilità operativa è stata valutata ogni 2 giorni, per una durata di 2 settimane, testando il biosensore con soluzioni standard di glicerolo (0.25 mM, n=5). Dopo 4 giorni la risposta iniziale era diminuita del 8%, mentre dopo 10 giorni la risposta era scesa al 52% del valore iniziale. Dopo due settimane la risposta residua era diminuita del 66%.

Analisi HPLC del glicerolo

Tutti i campioni sono stati filtrati con i filtri Chromafil[®] (d= 0.2 μ m, Macherey-Nagel, Germania) e diluiti con acqua bi-distillata se necessario, prima di essere analizzati. Le soluzioni standard sono state preparate in acqua bi-distillata ed il volume iniettato nel sistema HPLC è stato 20 μ L. La colonna cromatografica operava a 36°C e la fase mobile (5 mM H₂SO₄) passava ad una velocità di 0.6 mL/min. Il glicerolo veniva rilevato con un rifrattometro della Knauer. L'analisi quantitativa è stata condotta con il metodo delle aggiunte standard, dove l'area del picco dell'analita investigato veniva confrontata con l'area del picco dell'analita nella soluzione standard. Il campionamento avveniva durante le diverse fasi della fermentazione eseguita in laboratorio con i lieviti di *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 e *Candida stellata* – ZIM 1842 ottenuti nei laboratori dell'Università di Liubiana, Facoltà di Biotecnologie. La fermentazione è stata condotta in beute Erlenmeyer di 500 mL, a 20°C ed in duplicato.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi bulk modificati con il Meldola blu-fosfato di zirconio (bMBZrP-SPEs)

Il gruppo di ricerca di Gorton¹¹⁴ ha proposto un elettrodo a pasta di carbone (CPE) modificato con lo zirconio fosfato ed il Meldola blu, per investigare il processo di ossidazione del NADH all'elettrodo. Lo ZrP è uno scambiatore ed un buon conduttore ionico, proprietà dovute alla presenza dei gruppi fosfato.^{115,116} Il Meldola blu è uno dei mediatori redox più investigati,¹¹⁷ ed è spesso utilizzato per la costruzione dei sensori elettrochimici a NADH.^{118,119,120,121}

Lo stesso Gorton è stato il primo ad osservare che quando il Meldola blu viene fatto adsorbire sullo ZrP, il potenziale formale redox ($E^{\circ'}$) del mediatore rimane pressoché costante in funzione del pH, anche se, come risulta dall'Equazione A.1., esso dovrebbe variare:

$$E^{\circ'} = -2.303 \frac{RTz}{nF} pH$$

Equazione A.1.

dove $E^{\circ'}$: potenziale formale redox (V);

R: costante universale dei gas (8.314 J/mol K)

T: temperatura (K);

z: numero degli protoni scambiati;

n: numero degli elettroni trasferiti;

F: costante di Farady (96485 C/mol).

Inoltre, all'elettrodo si osserva un'attività catalitica aumentata verso il NADH ed l' $E^{\circ'}$ del mediatore trasla (più di 200 mV) verso potenziali più positivi, rispetto al potenziale di -175 mV vs. Ag|AgCl, quando il Meldola blu viene adsorbito sulla grafite, a pH 7.0.¹²²

La possibilità di avere una piattaforma universale per la costruzione e lo sviluppo dei biosensori NAD^+/NADH dipendenti, basata su elettrodi *screen-printed*, è molto attraente e per tale motivo sono state investigate le proprietà elettrochimiche bMBZrP-SPEs.

Gli studi in voltammetria ciclica (CV) condotti sugli elettrodi bMBZrP confermano i dati riportati in letteratura,¹²³ secondo cui la variazione del $E^{\circ'}$ del MB è indipendente dal pH,

allorquando il MB è adsorbito sullo ZrP. Nel Grafico A.1. si osserva come l' $E^{\circ'}$ rimane pressoché costante (-143 ± 6 mV, RSD=4%) per una variazione del pH di quattro unità.

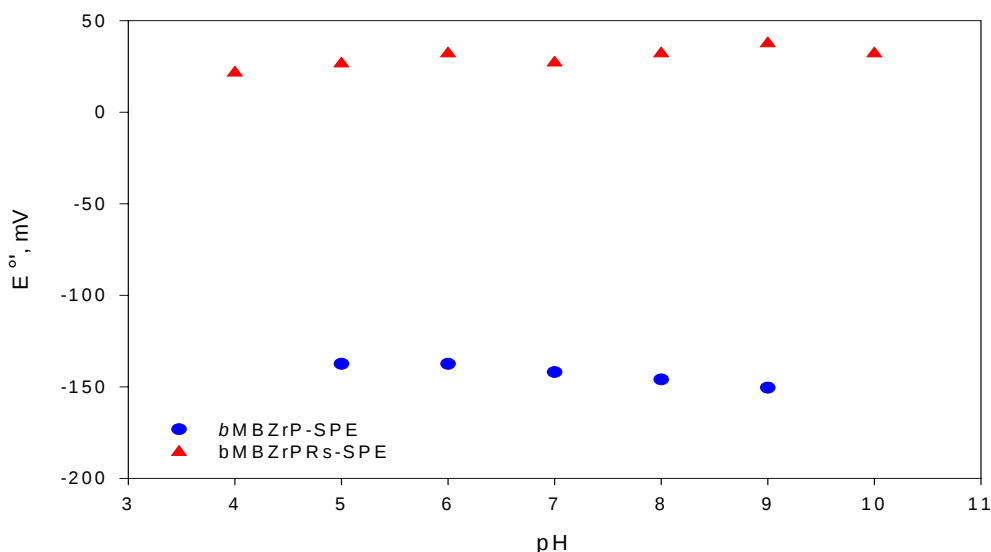


Grafico A.1. La variazione del $E^{\circ'}$ in funzione del pH per gli elettrodi *bMBZrP* e *bMBZrPRs*; 0.1 M KCl acidificato o alcalinizzato; 100 mV/s.

La variazione della corrente di picco in funzione della radice quadrata della velocità di scansione indica un processo controllato dalla diffusione (Grafico A.2.). Il grado di copertura del mediatore sulla superficie dell'elettrodo (Γ) è stato valutato mediante CV. Ad un'area geometrica dell'elettrodo di 0.07 cm^2 corrisponde un $\Gamma = 4.0 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$. Sempre da studi di CV si è osservato chiaramente (Figura A.3.) come gli elettrodi *bMBZrP* mantengono l'attività catalitica verso la molecola di NADH, ossidandola a bassi potenziali catodici.

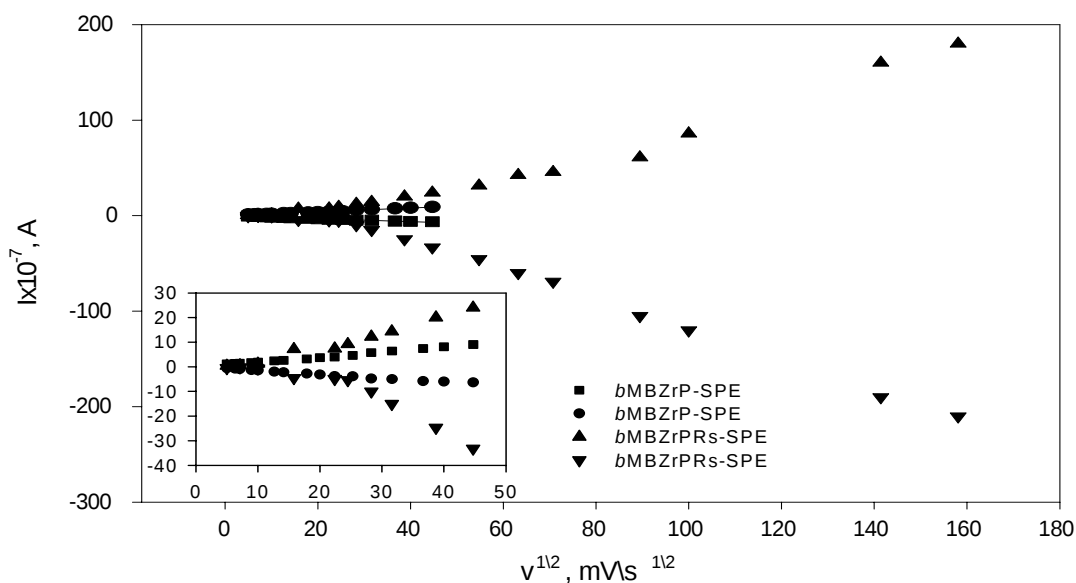


Grafico A.2. La corrente di picco anodica e catodica in funzione della radice quadrata della velocità di scansione per gli elettrodi *bMBZrP* e *bMBZrPRs*; tampone fosfato 0.1 M + KCl 0.1 M, pH 7.0; nel riquadro sono raffigurate le correnti anodiche e catodiche alle basse velocità di scansione.

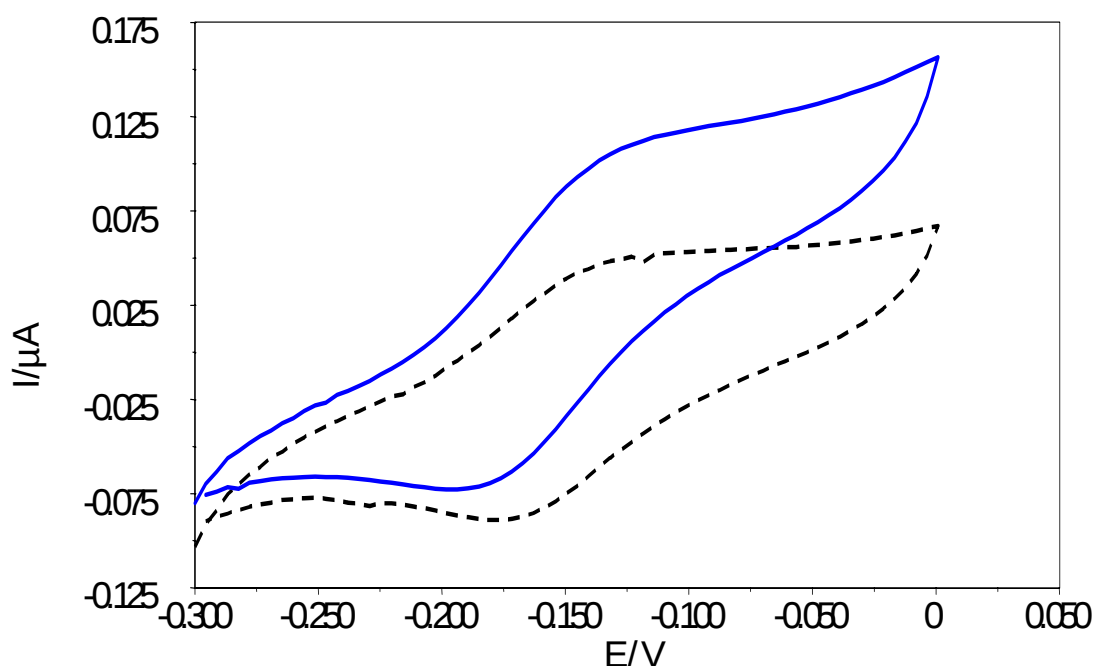


Figura A.3. La risposta elettrocatalitica degli elettrodi *bMBZrP* verso il NADH (1 mM, blu) in tampone fosfato 0.1 M + 0.1 M KCl, pH 7.0; il voltammogramma tratteggiato rappresenta la risposta in presenza del solo tampone; velocità di scansione: 100 mV/s.

Gli elettrodi sono stati testati in FIA per valutare la stabilità della risposta. Si è osservata una diminuzione molto rapida del segnale, in quanto il mediatore si solubilizza nel tampone di misura. Per limitare la perdita del mediatore o del componente attivo, è buona pratica applicare una membrana protettiva all'elettrodo. Elettropolimerizzando il 2,6-diidrossinaftalene (2,6-DHN) (vedi capitolo “**Elettrodo mediato per la determinazione del glucosio nel vino**”) all'elettrodo di lavoro si genera una membrana che, in parte, riduce il passaggio in soluzione del MB. Co-immobilizzando anche l'albumina serica bovina (BSA) nel film polimerico, si osserva un certo miglioramento della risposta (Grafico A.3.), in quanto la rete polimerica presenta una maggiore densità.

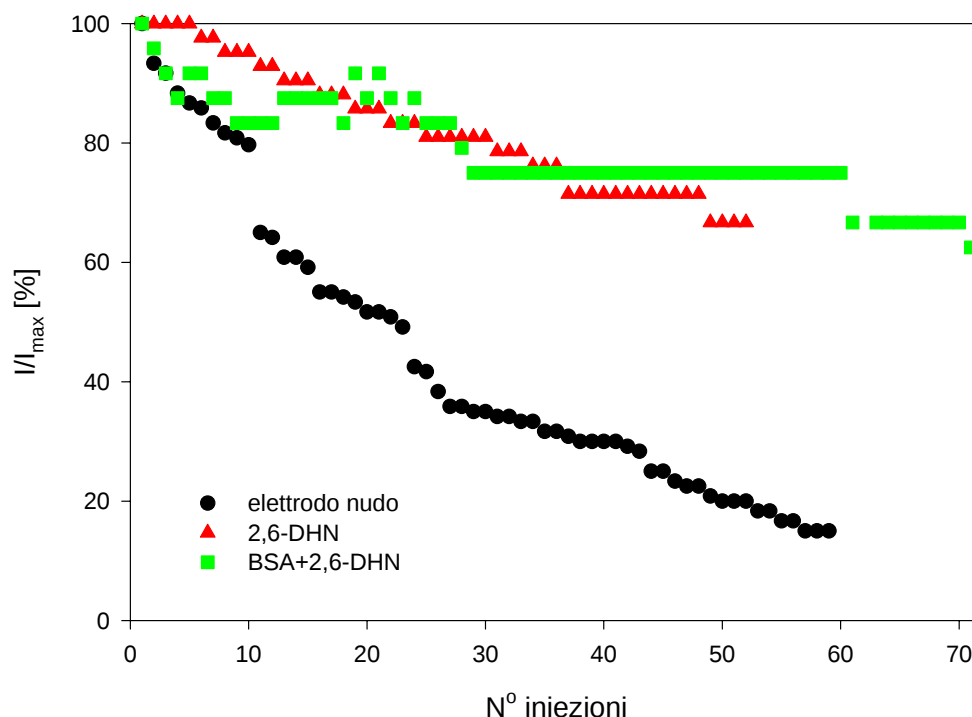


Grafico A.3. Risposta in FIA dell'elettrodo *b*MBZrP nudo a confronto con due elettrodi *b*MBZrP modificati con una membrana polimerica; 0.1 mM NADH in tampone fosfato + 0.1 M KCl, pH 7.0, 500 μ L/min; +50 mV vs. Ag|AgCl.

Nagy et al.¹²⁴ hanno osservato che il grado di copertura apparente del Meldola blu sugli elettrodi di grafite spettrale decresce quando vengono immersi in una soluzione di Tween[®] 20, un surfattante non ionico. Inoltre, l'utilizzo di surfattanti viene da loro proposto anche per rigenerare l'attività catalitica degli elettrodi modificati chimicamente. Studiando la risposta degli elettrodi *b*MBZrP in FIA, in presenza di Tween[®] 20 e del dodecil solfato di sodio (SDS, surfattante anionico), si è osservato un'importante diminuzione del segnale catalitico. La presenza dello 0.001% di Tween[®] 20 ha prodotto un abbassamento della corrente di risposta del 25%, mentre lo 0.01% e lo 0.1% di SDS hanno provocato una più marcata diminuzione della risposta, rispettivamente del 50% e del 80% (Grafico A.4.).

Purtroppo la risposta in FIA ha evidenziato una perdita di mediatore dall'elettrodo, e per tale motivo la possibilità di utilizzare questo tipo di elettrodi (*b*MBZrP) per monitorare in flusso vari processi analitici è fortemente limitata.

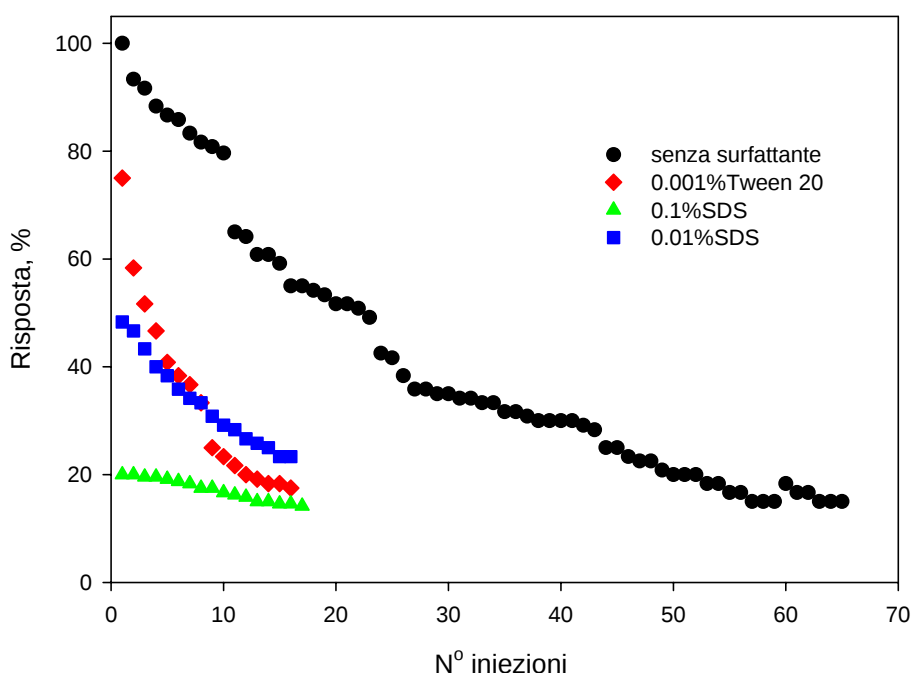


Grafico A.4. Risposta in FIA dell'elettrodo *b*MBZrP in assenza (nero) ed in presenza di surfattanti: Tween[®] 20 (rosso) e SDS (verde e blu); 0.1 mM NADH in tampone fosfato + 0.1 M KCl, pH 7.0, 500 μ L/min; +50 mV vs. Ag|AgCl.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi bulk modificati con il Meldola blu-fosfato di zirconio ed il sale di Reinecke (bMBZrPRs-SPEs)

Schuhmann¹²⁵ ha osservato che la solubilità del Meldola blu diminuisce significativamente quando il suo controanione (generalmente il Cl⁻) viene sostituito con l'anione del sale di Reinecke (Figura A.4.). In questo modo si possono costruire elettrodi modificati chimicamente, incorporando nella matrice dell'elettrodo di lavoro il precipitato ottenuto dalla reazione tra quantità equimolari di sale di Reinecke ed il MB.¹²⁶

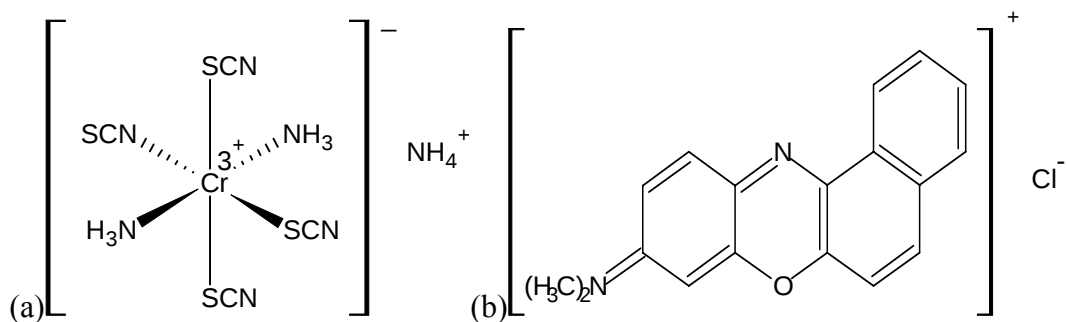


Figura A.4. (a) sale di Reinecke: $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2]$; (b) blu di Meldola: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$.

Per migliorare la stabilità chimica degli elettrodi *b*MBZrP, sulla superficie dell'elettrodo di lavoro è stato depositato, per via elettrochimica, un film di sale di Reinecke

(Rs), partendo da una soluzione satura di Rs. Studi preliminari condotti in CV hanno confermato la possibilità di elettrodepositare il Rs sull'elettrodo di lavoro. Partendo da una soluzione satura di Rs in 0.1 M tampone fosfato, pH 6.0, si effettuano 100 scansioni tra -0.5 e $+0.9$ V, alla velocità di 50 mV/s. Durante i 100 cicli di scansione si è osservata la presenza di tre coppie redox (Figura A.5.). La prima e la seconda coppia redox sono di tipo reversibile [$E_{p_{ox}(I)} = 0.255$ V, $E_{p_{red}(I)} = 0.205$ V, $\Delta E_p(I) = 0.050$ V; $E_{p_{ox}(II)} = 0.034$ V, $E_{p_{red}(II)} = 0.004$ V, $\Delta E_p(II) = 0.030$ V], mentre la terza è irreversibile ($E_{p_{ox}(III)} = 0.650$ V). Il quarto picco [$E_p(IV) = -0.419$ V] può essere attribuito all'aumento della resistenza ohmica dell'elettrodo, fenomeno attribuibile alla formazione del film tra il Rs ed il MB.

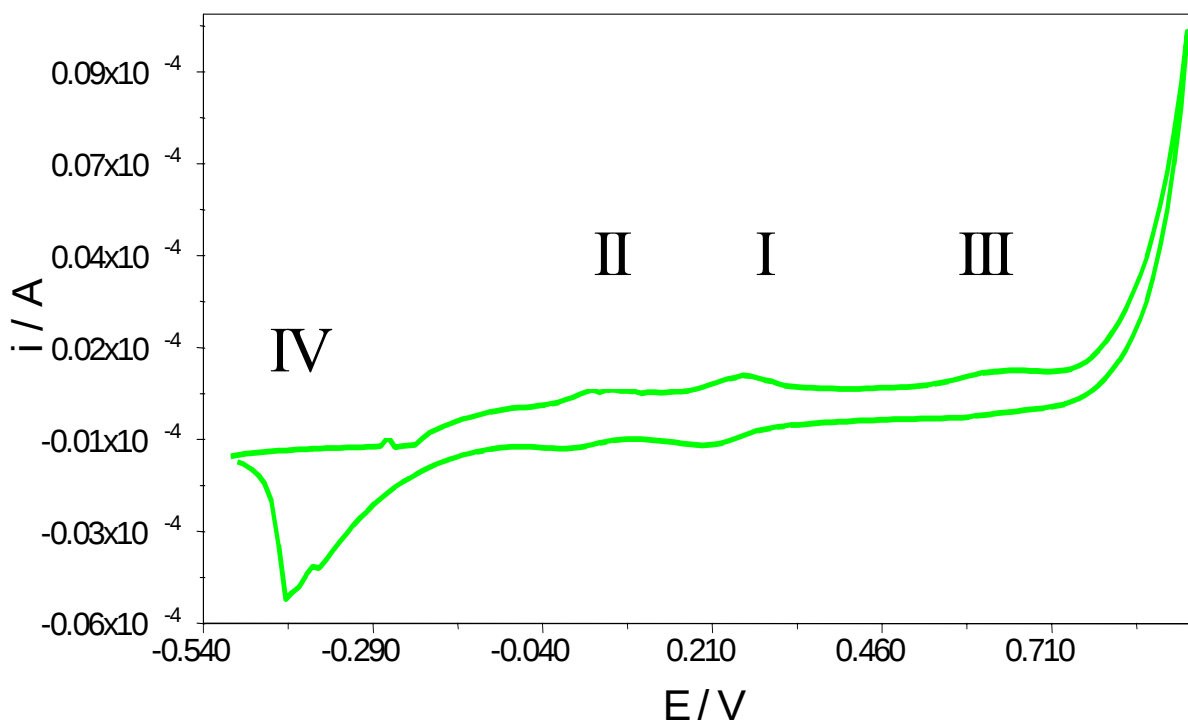


Figura A.5. Voltammetria ciclica raffigurante la 100^a scansione del processo di deposizione elettrochimica del film di Rs all'elettrodo di lavoro dell'elettrodo *b*MBZrP; tampone fosfato, 0.1 M + 0.1 M KCl, pH 6.0, 50 mV/s.

La prima coppia redox è osservabile già dalla quinta scansione ed è stata attribuita alla formazione del complesso solubile tra l'anione del sale di Reinecke ed il mediatore che diffonde dall'elettrodo. La terza coppia redox, osservabile anch'essa dalla quinta scansione, è stata assegnata alla trasformazione irreversibile del MB solubile che diffonde dalla matrice dell'elettrodo *b*MBZrP. Questo comportamento è simile a quello osservato durante la polimerizzazione del Meldola blu mediante voltammetria ciclica.¹²⁷ La seconda coppia redox è reversibile, si manifesta dalla 20^a scansione in poi, ed è stata attribuita al complesso Rs-MB che si è formata all'elettrodo. Ulteriori esperimenti condotti sempre in CV, in una soluzione in cui l'ossigeno è stato rimosso, ha confermato che la presenza dell'ossigeno è necessaria per la formazione del film.

Confermata la possibilità di depositare elettrochimicamente il film di Rs all'elettrodo, la modifica degli elettrodi *bMBZrP* è stata effettuata come indicato nel capitolo “*Produzione degli elettrodi bulk modificati con il Meldola blu-fosfato di zirconio e sale di Reinecke (bMBZrPRs-SPEs)*”. La valutazione della risposta elettrocatalitica verso il NADH è stata effettuata mediante studi di voltammetria ciclica. Nella Figura A.6. sono illustrate le risposte dell'elettrodo *bMBZrPRs* in presenza di varie concentrazioni di NADH.

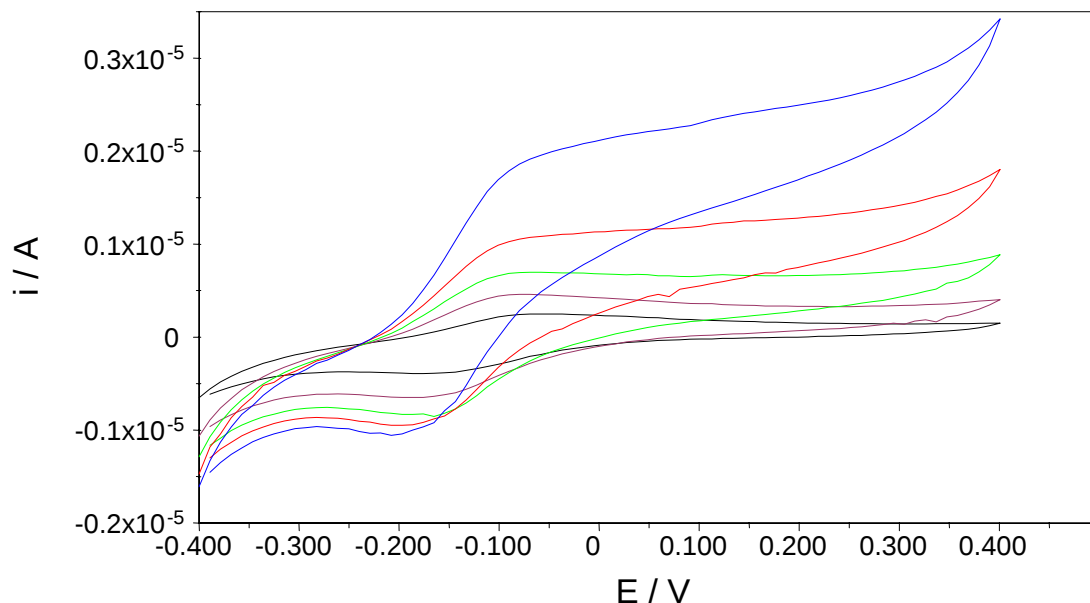


Figura A.6. La risposta elettrocatalitica degli elettrodi *bMBZrPRs* verso il NADH: ((nero) tampone di lavoro, (viola) 5×10^{-4} , (verde) 1×10^{-3} , (rosso) 5×10^{-3} , (blu) 1×10^{-2} M); tampone fosfato 0.1 M + 0.1 M KCl, pH 7.0; velocità di scansione: 100 mV/s.

Il grado di copertura (Γ) degli elettrodi *bMBZrPRs* è stato valutato mediante CV. Per un'area geometrica dell'elettrodo di 0.07 cm^2 corrisponde un $\Gamma = 3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$.

La costante catalitica di reazione ($k_{\text{obs.}}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) del NADH all'elettrodo è stata calcolata secondo il metodo riportato in letteratura,¹²⁸ utilizzando la seguente equazione:

$$I_{\text{cat}}/I_{\text{L}} = \pi^{1/2} (kC_0t)^{1/2}$$

Equazione A.2.

dove C_0 e t sono, rispettivamente, la concentrazione nella soluzione (M) ed il tempo (s), mentre I_{cat} e I_{L} sono i valori della corrente (A) in presenza ed in assenza del NADH. Dalla pendenza della curva $I_{\text{cat}}/I_{\text{L}}$ vs. $t^{1/2}$ si ottiene il valore della $k_{\text{obs.}}$, per una data concentrazione di NADH. In presenza di 10 mM NADH, la costante catalitica di reazione del NADH agli elettrodi *bMBZrPRs* è stata $6.66 \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$, mentre per gli *bMBZrP-SPEs* il valore della k è stato $0.44 \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$. Questi valori sono simili a quelli riportati da Gründig et al.¹²⁹ ma sensibilmente diversi da quelli di Gorton et al.¹³⁰ Questa differenza può essere attribuita al fatto che gli elettrodi di tipo *bulk* sono più simili agli elettrodi compositi di Gründig et al. che a quelli di pasta di carbone di Gorton et al. Inoltre, il valore di della $k_{\text{obs.}}$ è una funzione della

concentrazione di NADH, in quanto la $k_{obs.}$ aumenta all'aumentare della concentrazione di NADH, fenomeno imputabile alla formazione di intermedi a trasferimento di carica tra la forma ossidata del MB ed il NADH.^{131,132} Nel Grafico A.1. l' E° degli elettrodi *bMBZrPRs* rimane pressoché costante (30 ± 2 mV, RSD=7%) variando il pH, nell'intervallo 4.0-10.0, risultando attivo nell'intero intervallo di pH degli enzimi deidrogenasi. Nella Figura A.7. sono illustrate le voltammetrie cicliche degli elettrodi *bMBZrPRs*, nell'intervallo di pH 1.0-11.0.

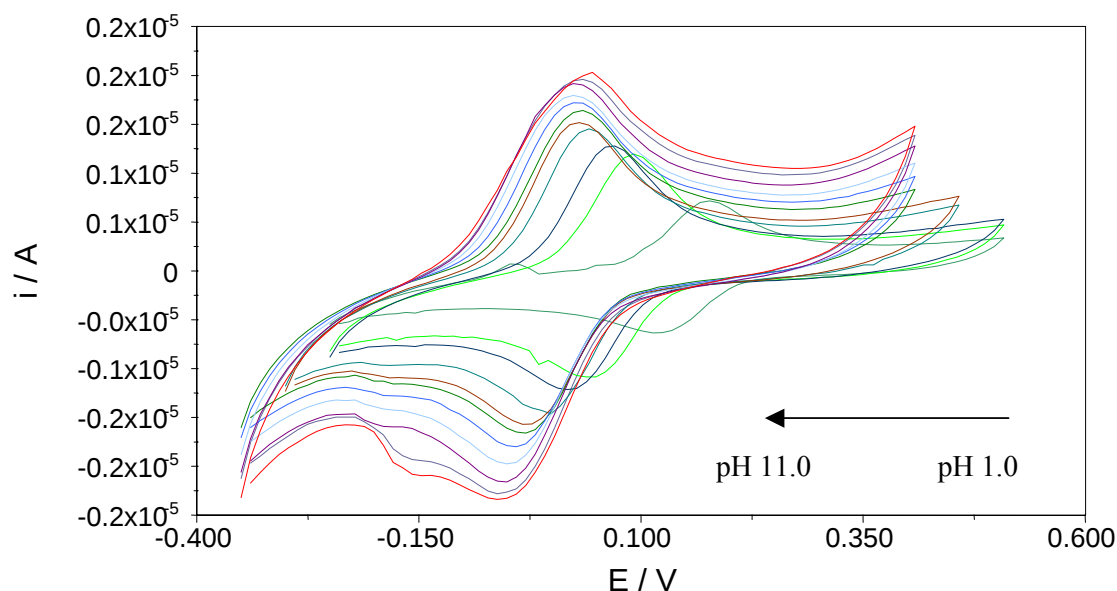


Figura A.7. La risposta degli elettrodi *bMBZrPRs* alla variazione di pH: verde muschio (pH 1.0), verde limone (pH 2.0), blu notte (pH 3.0), verde acqua (pH 4.0), marrone (pH 5.0), verde (pH 6.0), blu chiaro (pH 7.0), celeste (pH 8.0), viola (pH 9.0), grigio blu (pH 10.0), rosso (pH 11.0); 100 mV/s, 0.1 M KCl.

Misure in FIA del NADH con elettrodi bMBZrPRs

Le misure in FIA del NADH sono state condotte utilizzando una velocità di flusso (tampone di lavoro) di 0.300 mL/min. Dopo la stabilizzazione del segnale di fondo, sono state iniettate nel flusso soluzioni standard di NADH e si registra la corrente in uscita (Figura A.8.).

E' stata inoltre valutata la stabilità operativa degli *bMBZrPRs*-SPEs. Dopo 90 iniezioni (Grafico A.5.) di 0.1 mM NADH, l'elettrodo ha presentato una deviazione standard relativa (RSD) di 4.2%. La ripetibilità della risposta è stata studiata, ed è risultata una RSD (n=30) di 3.4%, 2.5% e 2.1%, per ogni concentrazione di NADH analizzata (0.025, 0.050 e 0.100 mM). La stabilità non operativa è stata valutata eseguendo calibrazioni settimanali, osservando una risposta residua dell'88% dopo 3 mesi, in cui gli elettrodi sono stati mantenuti a temperatura ambiente ed al buio. I parametri analitici degli elettrodi *bMBZrPRs* sono riportati nella Tabella A.1.

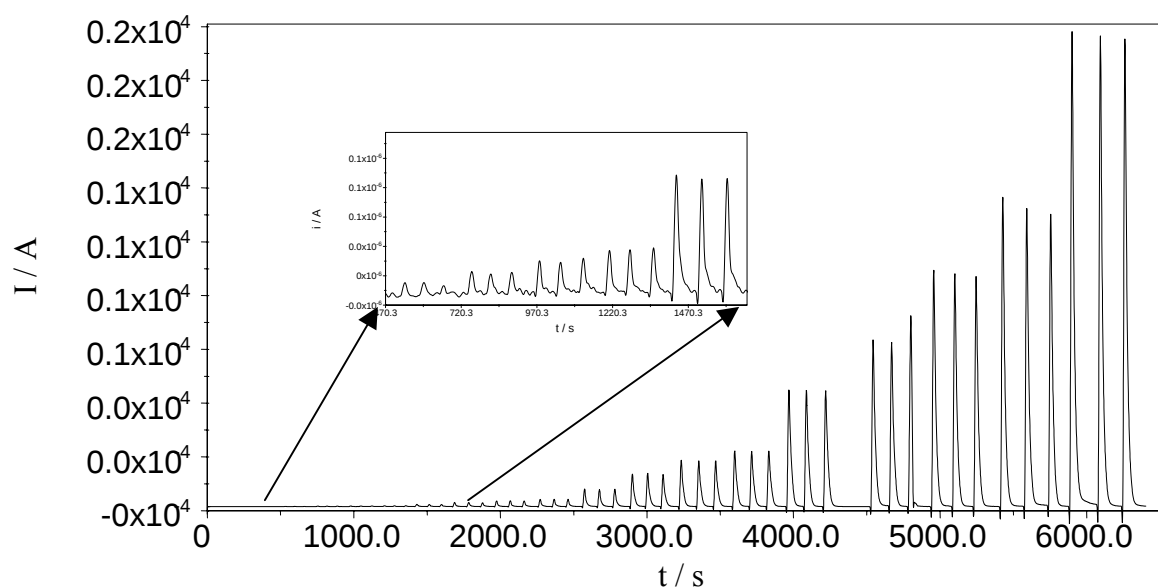


Figura A.8. Analisi in FIA del NADH (2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7.5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 5×10^{-3} , 7.5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , 7.5×10^{-2} , 1×10^{-1} , 2.5×10^{-1} M, $n=3$) utilizzando gli elettrodi *b*MBZrPRs; +50 mV vs. Ag|AgCl; 0.1 M Tris, pH 8.5; 0.30 mL/min, *loop*: 50 μ L.

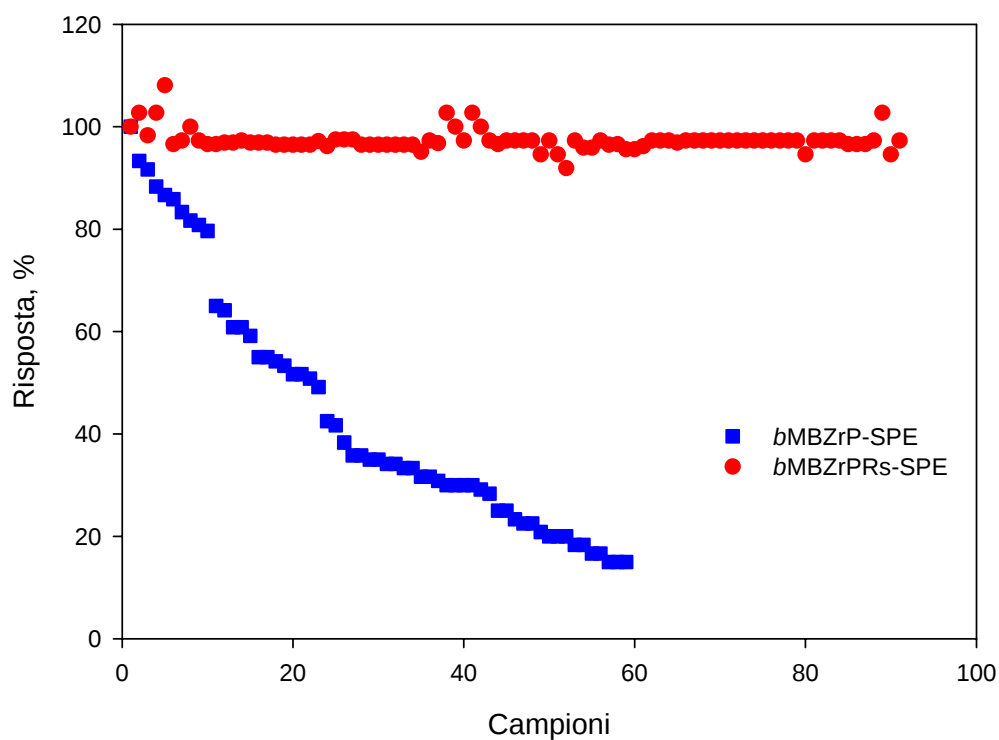


Grafico A.5. La risposta normalizzata degli elettrodi *b*MBZrPRs e *b*MBZrP; 0.1 mM NADH in 0.1 M tampone fosfato + 0.1 M KCl, pH 7.0; flusso 0.300 mL/min, *loop*: 50 μ L.

Tabella A.1. Parametri analitici del sensore a NADH e del biosensore a glicerolo. Analisi in FIA a +50 mV, per *bMBZrPRs*-SPE, e +100 mV, per il biosensore a glicerolo, vs. Ag|AgCl; pH 8.5; flusso: 0.30 mL/min, *loop*: 100 μ L. Il LOD ed il LOQ sono calcolati secondo: $LOD = 3s_b/S$; $LOQ = 10s_b/S$, dove s_b è la deviazione standard del segnale *blank* ed S è la sensibilità; n è il numero delle soluzioni standard ed s_m e s_c sono le deviazioni standard della pendenza e dell'intercetta.

pH	Limite di rilevabilità (LOD), M	Limite di quantificazione (LOQ), M	Intervallo lineare di lavoro, M	Equazione della retta di calibrazione	Tempo necessario per stabilizzare la linea di base	Tempo necessario per raggiungere il 90% del segnale	Volume del <i>loop</i> (μ L)
8.5	<i>bMBZrPRs</i>-SPE						
	9.4×10^{-7}	3.3×10^{-6}	2.5×10^{-5} - 1.0×10^{-2}	$y = 5.3 \times 10^{-8} + 2.7 \times 10^{-4}C$; $r^2 = 0.9940$ ($n=12$, $s_m = 0.08 \times 10^{-4}$, $s_c = 0.16 \times 10^{-8}$)	120 s	11 s	50
	biosensore a glicerolo						
	2.8×10^{-6}	9.4×10^{-6}	1.0×10^{-5} - 1.0×10^{-4}	$y = 9.8 \times 10^{-10} + 2.6 \times 10^{-5}C$; $r^2 = 0.9870$ ($n=5$, $s_m = 0.2 \times 10^{-5}$, $s_c = 0.7 \times 10^{-10}$)	180 s	20 s	100

Biosensore a glicerolo

I risultati ottenuti hanno dimostrato la validità degli elettrodi *bMBZrPRs* come sensori per il NADH. Inoltre gli *bMBZrPRs*-SPEs possono essere impiegati come piattaforma per la costruzione di biosensori basati su enzimi deidrogenasi NAD^+ -dipendenti.

La determinazione enzimatica del glicerolo sfrutta la seguente reazione:



Equazione A.3.

Il glicerolo è ossidato in presenza del NAD^+ e della glicerolo deidrogenasi (GDH) a diidrossiacetone, con la formazione di NADH. L'equilibrio della reazione è spostato a sinistra, dato che l' E° della coppia diidrossiacetone/glicerolo è maggiore del E° della coppia $NAD^+/NADH$. Se il NADH prodotto nella reazione enzimatica è ossidato immediatamente all'elettrodo, si genera una *driving force* a favore dell'ossidazione del glicerolo, spostando l'equilibrio della reazione a favore della produzione del NADH che riflette la concentrazione del glicerolo nei campioni.

Per la costruzione del biosensore a glicerolo sono stati effettuati esperimenti preliminari mediante amperometria in *batch* (Grafico A.6). Tra le varie quantità di GDH investigate (14, 10, 5 e 2.5 IU), sono state selezionate 2.5 IU di GDH per l'immobilizzazione

sull'elettrodo di lavoro. La concentrazione ottimale di NAD^+ è stata di 5 mM, mentre una concentrazione di 2.5 mM produce una diminuzione della sensibilità di circa il 50%. Il pH di lavoro viene scelto tenendo conto che l'intervallo potenziale di lavoro è compreso tra 8.0 e 10.0, con un valore ottimale per la GDH di 10.0, così come viene dichiarato dal produttore. I valori di pH compresi tra 9.0 e 10.0 producono la degradazione del film di Rs elettrodepositato all'elettrodo, e quindi, non sono adatti per eseguire monitoraggi a lungo termine, specialmente in FIA. E' quindi necessario trovare un compromesso tra la stabilità operativa dell'elettrodo e l'attività dell'enzima ed il valore di pH=8.5 rappresenta la scelta ottimale. La perdita in sensibilità (90% di diminuzione dell'attività del biosensore è stata osservata quando il pH cambia da 10.0 a 8.5) è stata controbilanciata da una stabilità operativa accettabile (0.25 mM glicerolo, n=70, RSD=5.6%). Per la misura in FIA sono stati utilizzati questi parametri (carico enzimatico, concentrazione del NAD^+ e pH) ottimizzati, con la precisazione che il co-enzima è stata iniettato insieme al substrato dal *loop*, nel flusso.

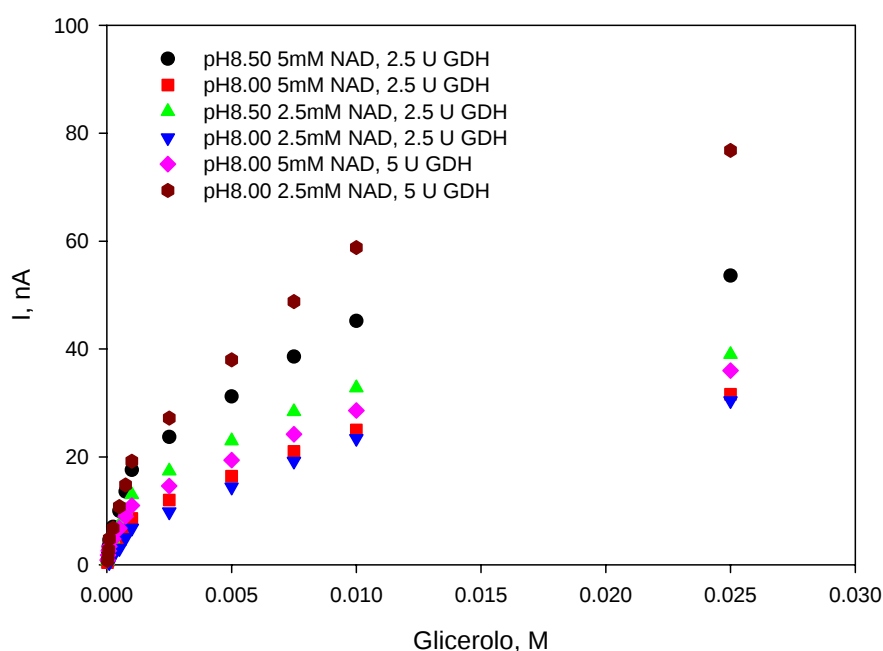


Grafico A.6. Risposta del biosensore a glicerolo in funzione del pH, della concentrazione di NAD^+ e della quantità di enzima immobilizzato; 0.1 M Tris, pH 8.5, +50 mV vs. Ag|AgCl; nel riquadro vengono illustrati gli intervalli lineari di lavoro.

Per la misura in FIA del glicerolo il volume del *loop* utilizzato è stato 100 μL e la velocità di flusso è stata pari a 0.300 mL/min. Una tipica curva di calibrazione per il glicerolo è illustrata nel Grafico A.7, mentre i parametri analitici sono descritti nella Tabella A.1.

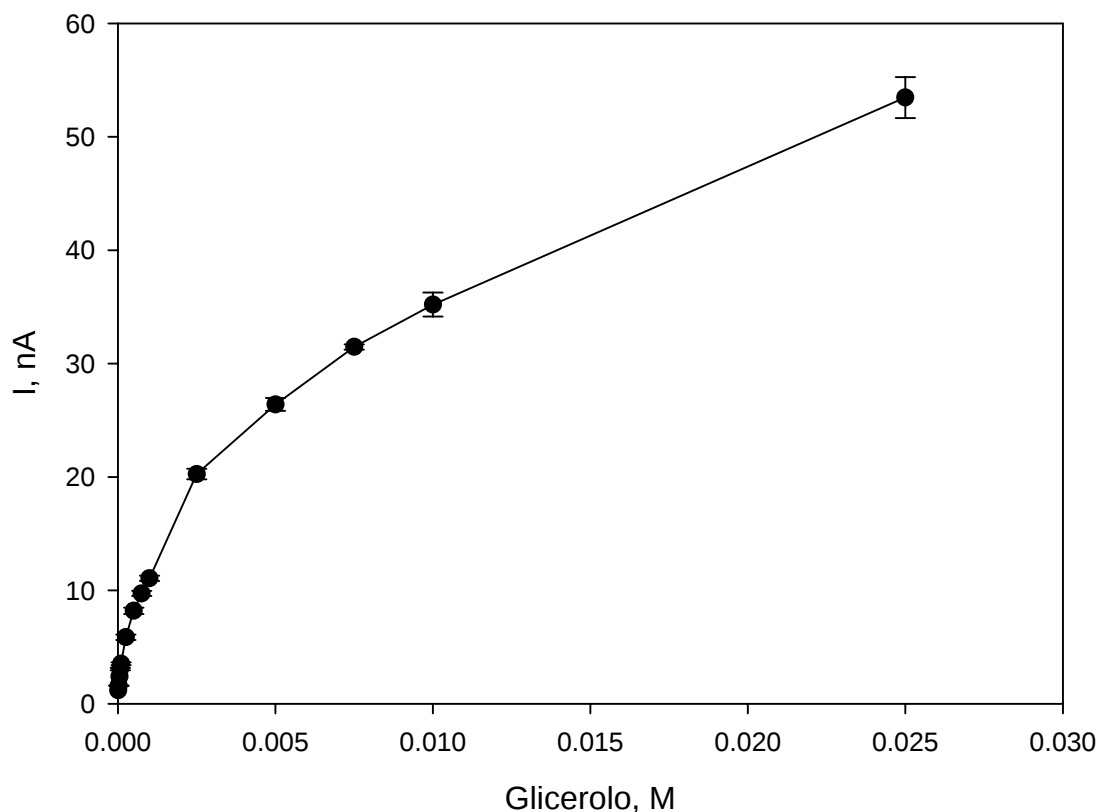


Grafico A.7. Curva di calibrazione per il biosensore a glicerolo; 0.1 M Tris, pH 8.5, +100 mV vs. Ag|AgCl, 5 mM NAD⁺, 0.300 mL/min velocità del flusso, volume del *loop*: 100 μ L, n=3.

Il recupero del biosensore è stato valutato con campioni fortificati (2.5×10^{-4} M, glicerolo), a varie diluizioni: 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 v/v, e sono stati ottenuti valori di 90%, 100%, 100% e 100%, per le diluizioni menzionate. I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni provenienti dalla fermentazione condotta in laboratorio, sono illustrati nella Tabella A.2. e confrontati con i valori ottenuti mediante analisi HPLC.

La stabilità non operativa del biosensore a glicerolo ha mostrato una perdita di segnale di circa l'8% dopo 4 giorni, mentre dopo altri 6 giorni la risposta è diminuita fino al 52% del valore iniziale. Dopo due settimane, la risposta residua era diminuita del 66%. Il biosensore, dopo 70 campioni analizzati consecutivamente, ha ridotto la sua sensibilità del 6%.

Conclusioni

In letteratura vengono proposti e descritti diversi approcci per la costruzione di biosensori per la misura del glicerolo.^{133,134,135,136,137} Sono stati utilizzati sia enzimi NAD⁺ dipendenti, PQQ dipendenti oppure sistemi bienzimatici (glicerolo-3-fosfato ossidasi e la

glicerolochinasi) che, a loro volta, venivano accoppiati a diversi mediatori redox: polianilina, *poly(neutral red)*, *Os-idrogels*, etc. I parametri analitici di questi biosensori sono simili tra di loro come intervallo di lavoro (da 10^{-5} a 10^{-3} mol/L,) e limite di rilevabilità ($\sim\mu\text{M}$) e sono paragonabili con il biosensore a glicerolo qui descritto.

Le caratteristiche elettroanalitiche del sensore a NADH basato sull'utilizzo del Meldola Blue, fosfato di zirconio ed il sale di Reinecke sono molto promettenti per lo sviluppo futuro di biosensori basati sugli enzimi NAD^+ dipendenti. L'elettrodo *bMBZrPRs* mantiene al sua attività catalitica verso il NADH, ed usato in FIA ha mostrato una buona stabilità operativa (10^{-4}M di NADH, $\text{RSD}=4.2\%$, $n=90$).

E' stato inoltre dimostrato che la deposizione elettrochimica del sale di Reinecke, oltre a quella chimica, migliora le proprietà del sensore a NADH, specialmente se si parla in termini di stabilità.

Per dimostrare la validità del sensore a NADH, è stato realizzato un biosensore a glicerolo, accoppiandolo alla glicerolo deidrogenasi. Le misure effettuate su campioni contenenti glicerolo, hanno argomentato meglio il potenziale impiego degli elettrodi *bMBZrPRs* come base per la costruzione di diversi biosensori basati su deidrogenasi NAD^+/NADH dipendenti.

Tabella A.2. Risultati dell'analisi del glicerolo.

Mezzo artificiale di fermentazione (<i>Candida stellata</i>)				Mezzo artificiale di fermentazione (ceppo S288)			
Tempo (h)	Glicerolo, g/L (%RSD) (HPLC)	Glicerolo, g/L (%RSD) (biosensore)	R.E. %	Tempo (h)	Glicerolo, g/L (%RSD) (HPLC)	Glicerolo, g/L (%RSD) (biosensore)	R.E. %
0	ND	ND	-	0	ND	ND	-
70	ND	ND	-	70	ND	ND	-
142	ND	ND	-	142	3.5(1.1)	3.7(5.2)	+5.7
214	2.3(3.4)	2.5(6.8)	+8.7	214	4.2(1.1)	4.4(4.8)	+4.8
310	2.9(3.6)	3.0(6.7)	+3.4	310	5.1(1.2)	5.3(4.8)	+3.9
382	3.2(1.6)	3.4(5.4)	+6.3	382	5.5(1.8)	5.7(5.2)	+3.6
480	3.7(1.1)	3.9(4.5)	+5.4	480	5.8(1.7)	6.0(4.6)	+3.4
672	4.4(2.2)	4.6(4.5)	+4.5	672	6.3(1.6)	6.5(4.7)	+3.2

B) Elettrodo per NADH mediato con NADH ossidasi e blu di Prussia

Reagenti e strumenti

La glutaraldeide (GAD, 25% v\% soluzione acquosa) e la glicerolo deidrogenasi (EC 1.1.1.6, 250 unità, da *Cellulomonas sp.*) sono stati acquistati dalla Sigma, St. Louis, MO, USA. Il Nafion[®] 5% (v\%, soluzione alcolica), la flavin mononucleotide (FMN, 85% HPLC), il β -NAD⁺ (>95%, HPLC) ed il KOH (*pellets*) sono stati comprati dalla Fluka Chemie, Buchs, Svizzera. Il fosfato monosodico, il fosfato monopotassico ed il cloruro di sodio sono della Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia, mentre il K₂HPO₄ proviene dalla Riedel-de Haen, Seelze, Germania. Se non specificati, tutti gli altri reagenti, sono almeno di purezza analitica e sono stati forniti dalla Sigma, St. Louis, MO, USA. La NADH ossidasi (33.6 IU\mL) è stata fornita dalla GTP Technology, Labege, Francia.

Le misure elettrochimiche sono condotte in voltammetria ciclica, in amperometria classica, e in cronoamperometria usando un sistema μ Autolab, Type II, Electrochemical System (Eco Chemie, Utrecht, Olanda) dotato di PGSTAT-12 e software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Olanda). E' stato utilizzato anche un potenziostato modello 641 VA Detector (Metrohm, Herisau, Svizzera), connesso ad un registratore analogico di tipo *X-t* (L250E, Linseis, Selb, Germania) per le misure in FIA.

Le misure spettrofometriche sono state condotte a lunghezza d'onda fissa, con uno spettrofotometro Unicam 8625 UV/Vis.

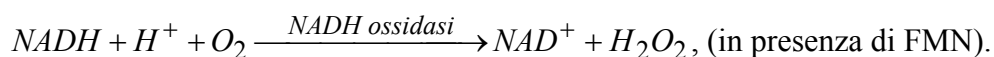
Le apparecchiature utilizzate sono state:

- pompa peristaltica Gilson, modello Minipuls 3 (Villers-le-Bel, Francia), dotata di tubi di Tygon, di una cella elettrochimica a strato sottile ($d_{int}=15$ mm), e di una valvola di iniezione (Rheodyne, Cotati, CA, USA) a 4 uscite;
- agitatore magnetico (Heidolph, model MR 3001);
- stufa, High Performance Oven (MOD 2100, F.lli Galli, Milano, Italia).

Metodi di analisi e soluzioni tampone

Misure spettrofometriche

Le misure spettrofometriche sono state eseguite a lunghezza d'onda fissa, e si basano sulla seguente reazione:



Equazione B.1.

In presenza di FMN è stata misurata la diminuzione della concentrazione di NADH, a 340 nm, utilizzando una cella spettrofotometrica di quarzo (SUPRASIL[®], Precision in Spectro-Optics Worldwide, Hellma[®], Italia). Ad un volume di 400 µL (tampone di lavoro), contenente 0.1 mM di FMN e 0.1 mM di NADH, sono stati aggiunti 2 µL della soluzione madre di NADH ossidasi (33.6 IU/mL) e si è registrata la variazione dell'assorbanza.

Misure amperometriche

La produzione di acqua ossigenata generata come indicato nell'Equazione B.1, è stata misurata in amperometria. E' stato utilizzato uno sistema amperometrico in *batch*, con l'elettrodo screen-printed modificato con il blu di Prussia polarizzato a -50 mV *versus* Ag|AgCl. Ad un volume finale di 5 mL, contenente 2 mM FMN e 2 µL della soluzione madre di NADH ossidasi, sono state effettuate aggiunte di 40 µL di una soluzione 10⁻² M di NADH, preparata nel tampone di lavoro, ed è stata registrata la corrente di riduzione dell'H₂O₂.

Misure in FIA

Le misure in FIA sono state realizzate iniettando nel flusso trasportatore (velocità ottimizzata di 0.350 mL/min.) soluzioni standard di NADH ed il segnale analitico è stato registrato. Il prodotto di reazione (Equazione 3.1.) è stato misurato ad un potenziale applicato all'elettrodo di lavoro di -50 mV *vs.* Ag|AgCl. Le curve di calibrazione sono state costruite misurando l'altezza dei picchi di corrente generata dall'iniezione delle soluzioni standard di NADH dopo la stabilizzazione del segnale di fondo, e riportandone in un grafico il loro valore in corrispondenza della rispettiva concentrazione di NADH.

Soluzioni tampone

Le soluzioni tampone utilizzate in questo studio sono state:

pH 3.0, 4.0 e 5.0: 50 mM citrato-fosfato + 0.1 M KCl;

pH 6.0, 7.0 e 8.0: 50 mM fosfato + 0.1 M KCl;

pH 9.0: 0.1 M Tris + 0.1 M KCl;

pH 10.0 e 10.5: 50 mM glicina-KOH + 0.1 M KCl.

Biosensore per il NADH

La NADH ossidasi è stata immobilizzata sulla superficie dell'elettrodo di lavoro. Praticamente, 2 μL di una soluzione preparata in acqua distillata, di glutaraldeide all'1% (v/v), sono stati depositati e fatti evaporare, dopodiché altri 2 μL di una miscela contenente l'enzima (33.6 UI/mL NADH ossidasi e 1% v/v di Nafion[®] neutralizzato, 1/1 v/v) hanno reagito sull'elettrodo di lavoro, formando la membrana enzimatica. Il biosensore così realizzato è stato conservato in tampone fosfato, 50 mM, pH 6.8, a 4°C.

Risultati e discussione

Studi preliminari

La NADH ossidasi, così come viene prodotta dalla GTP Technology, è un apoenzima. Il suo co-enzima è il flavin mononucleotide (FMN) oppure il flavin dinucleotide (FAD). In assenza, la NADH ossidasi non è in grado di realizzare il processo di ossidazione del NADH, il suo substrato, e per tale motivo si deve sempre lavorare in presenza del co-enzima FMN, co-enzima scelto per effettuare questo lavoro sperimentale. Il flavin mononucleotide ha il compito di trasportare, in due fasi successive, gli elettroni che risultano dal processo redox, dal sito attivo enzimatico ad un accettore di elettroni. Siccome l'FMN è in grado di accettare 1 o 2 elettroni, svolge un importante ruolo di mediazione tra i trasportatori di e^- capaci di trasferire solo $2e^-$ (NADH) e quelli in grado accettare solo $1e^-$ (Fe^{3+}) (Figura B.1.).

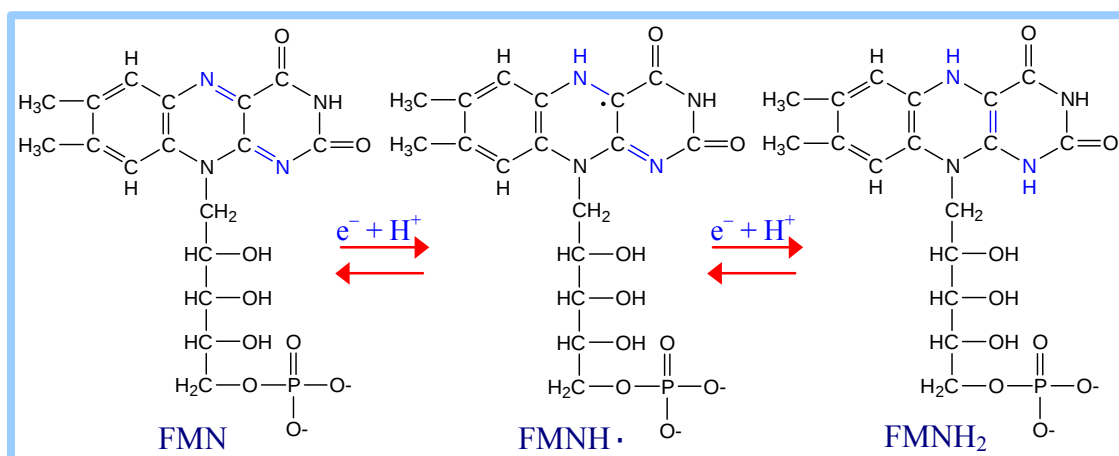


Figura B.1. Illustrazione grafica del processo di trasferimento elettronico al FMN.

Le misure spettrofotometriche sono state eseguite secondo le indicazioni fornite dal produttore. Esse hanno indicato che l'enzima è attivo in un ampio intervallo di pH (Grafico

B.1.), coprendo abbondantemente anche quello degli enzimi deidrogenasi. Inoltre come si può osservare dal Grafico B.2., si ha un'attività enzimatica quasi costante nell'intervallo di pH 4.0-9.0, mentre a pH 3.0 e 10.0 questa diminuisce del 50%, con un più forte decremento dell'attività a pH 10.5.

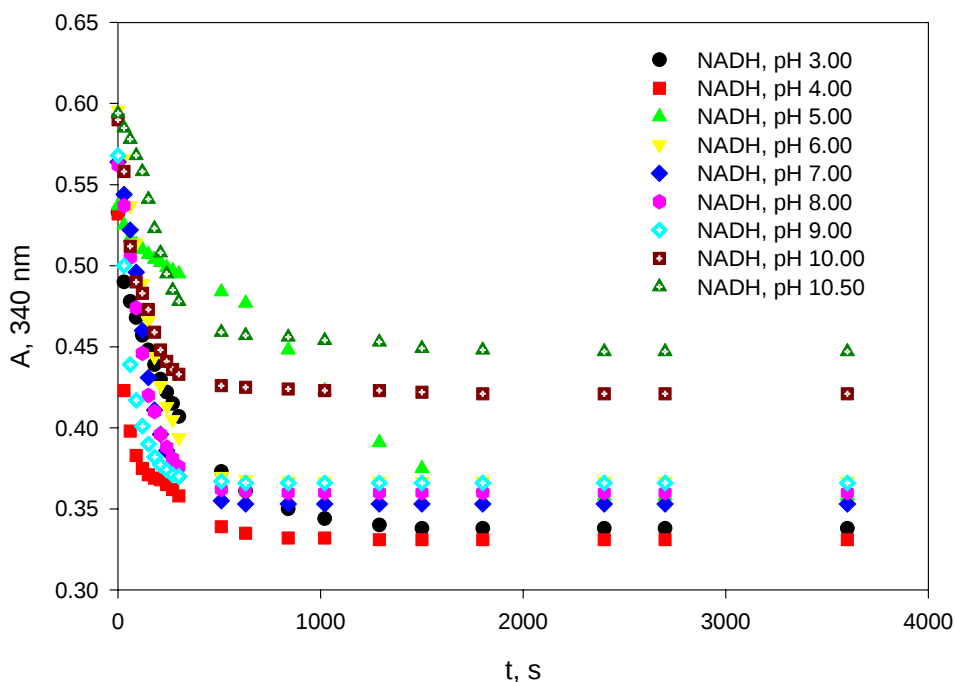


Grafico B.1. La variazione della risposta enzimatica in funzione del pH; 0.1 mM FMN + 0.1 mM NADH + 2 μ L di NADH ossidasi (33.6 UI/mL), in un volume finale di 0.4 mL.

Le misure amperometriche, in cui l'enzima si è trovato libero nel tampone di lavoro, hanno indicato un'attività enzimatica massima a pH 6.5, mentre l'enzima immobilizzato, quindi la risposta del biosensore per NADH, ha mostrato un pH ottimale di lavoro spostato verso valori più acidi (pH=5.0). Le misure per le curve dell'attività enzimatica in funzione del pH (Grafico B.3.), sono state effettuate nelle condizioni indicate nel paragrafo “*Misure amperometriche*”, registrando e riportando graficamente il valore della corrente di riduzione corrispondente alla prima aggiunta di NADH.

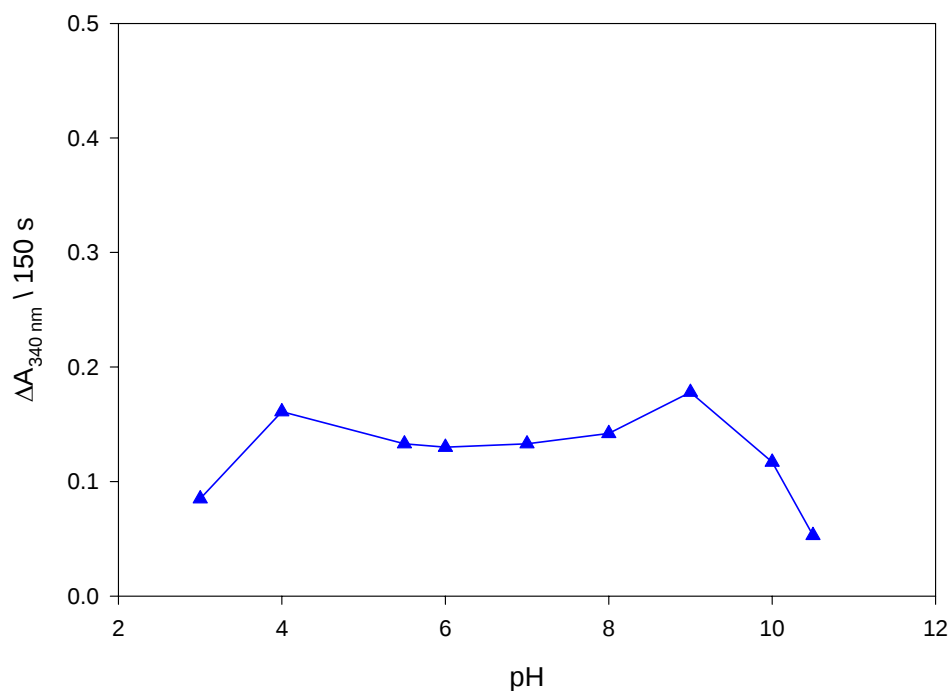


Grafico B.2. La variazione della risposta enzimatica in funzione del pH; 0.1 mM FMN + 0.1 mM NADH + 2 μL di NADH ossidasi (33.6 IU/mL), in un volume finale di 0.4 mL.

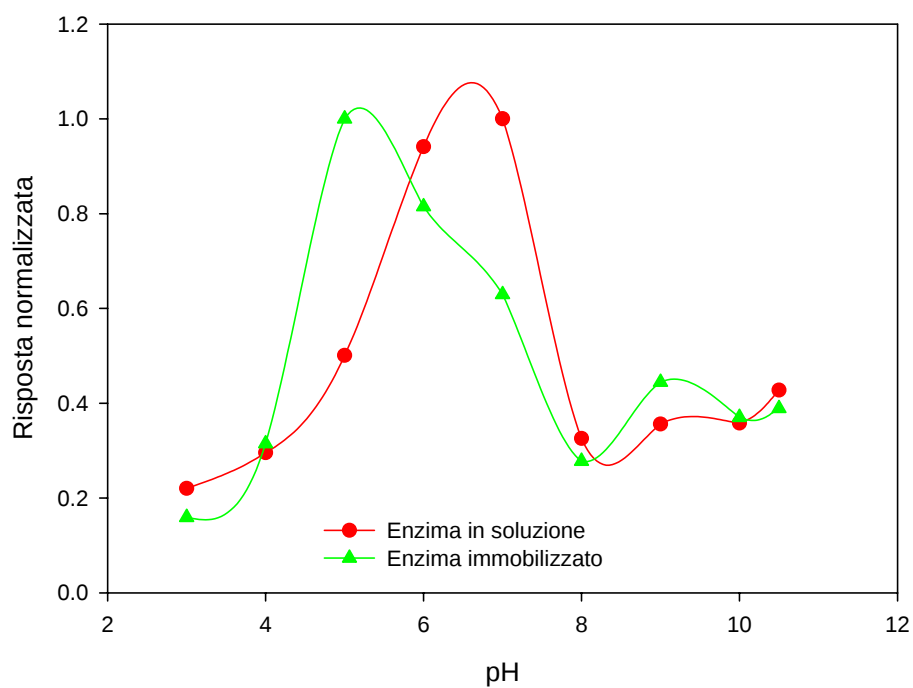


Grafico B.3. Risposta normalizzata dell'enzima libero in soluzione ed immobilizzato in funzione del pH; - 50 mV vs. Ag/AgCl; n=3.

La misura in FIA con il biosensore per NADH è fortemente dipendente dalla concentrazione di FMN, in quanto si deve assicurare in ogni momento dell'analisi un livello di saturazione costante di co-enzima, per realizzare un rapido ed efficiente trasferimento di elettroni dal NADH all'ossigeno. Per ottimizzare la concentrazione di co-enzima da utilizzare in FIA, i primi tentativi sono stati improntati verso la iniezione contemporanea del substrato e del FMN nel *loop*. La risposta del biosensore ha evidenziato, in queste condizioni sperimentali, un aumento continuo del segnale, per una concentrazione sempre costante di NADH (0.1 mM) e di FMN nell'intervallo testato di 0.1–1 mM. Si è osservato anche un piccolo “lag time” (8 s) dovuto probabilmente al tempo necessario al co-enzima di interagire con il sito attivo della NADH ossidasi (Figura B.2.).

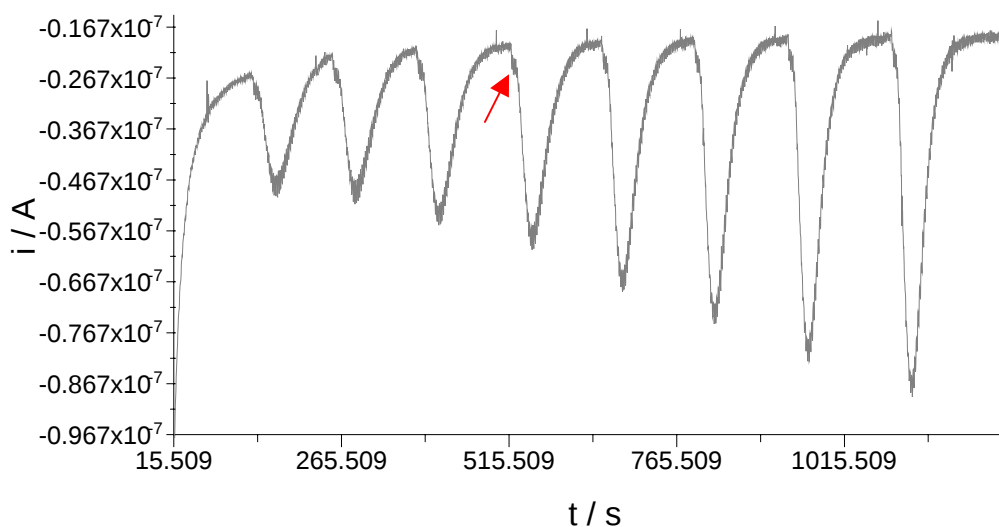


Figura B.2. Registrazione del segnale transiente quando il substrato (0.1 mM NADH) ed il co-enzima (0.5 mM FMN) vengono introdotti nel flusso trasportatore insieme; -50 mV vs. Ag|AgCl, 0.35 mL/min, *loop*: 50 μ L, tampone fosfato 50 mM + 0.1 M KCl, pH 7.2; la freccia indica il “lag time”.

Visti gli scarsi risultati ottenuti con il metodo della iniezione contemporanea, il passo successivo è stato quello di introdurre direttamente l'FMN nel tampone di lavoro, mentre il substrato veniva introdotto dalla valvola di iniezione. Per concentrazioni di substrato (0.1 mM NADH) e FMN costanti (comprese nell'intervallo 0.1–1 mM) l'andamento del segnale del biosensore è stato sempre marcato da una crescita continua del segnale, come riportato nella Figura B.3.

La stabilità del segnale (Figura B.4.) è stata ottenuta con una concentrazione di 2 mM FMN, introdotto direttamente nel flusso trasportatore. Questa concentrazione ottimizzata viene utilizzata anche per gli studi condotti in amperometria.

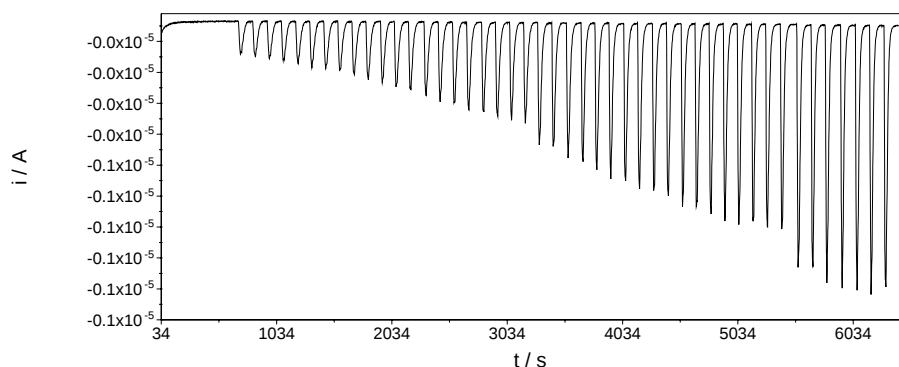


Figura B.3. Registrazione FIA del segnale transiente quando il substrato (0.1 mM NADH, nel *loop*) ed il co-enzima (1 mM FMN) vengono introdotti separatamente; -50 mV vs. Ag|AgCl, 0.350 mL/min, *loop*: 50 μ L, tampone fosfato 50 mM + 0.1 M KCl, pH 7.2.

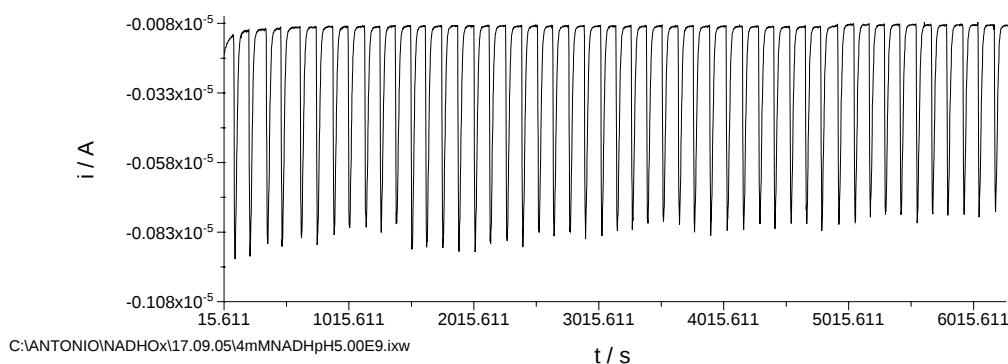


Figura B.4. Registrazione FIA del segnale transiente in presenza di 4 mM NADH; -50 mV vs. Ag|AgCl, 0.350 mL/min, *loop*: 50 μ L, tampone citrato-fosfato 50 mM + 0.1 M KCl, pH 5.0, 2 mM FMN nel flusso.

L'ottimizzazione della concentrazione di co-enzima ha permesso inoltre, di investigare la risposta in FIA del biosensore a NADH. Curve di calibrazione sono state eseguite a diversi pH, utilizzando una concentrazione di FMN pari a 2 mM. Come illustrato nel Grafico B.4., si è osservato che nell'intervallo di pH 5.0–6.0 l'intervallo lineare di lavoro arriva fino a 0.4 mM di NADH, mentre nell'intervallo di pH 7.0–8.0, questo è ridotto ad un decimo. Questa diminuzione drastica dell'intervallo lineare di lavoro può essere attribuita anche al fatto che il blu di Prussia presenta anch'esso una dipendenza dal pH, essendo noto che a valori di pH acidi l'attività catalitica nei confronti dell' H_2O_2 è maggiore.¹³⁸

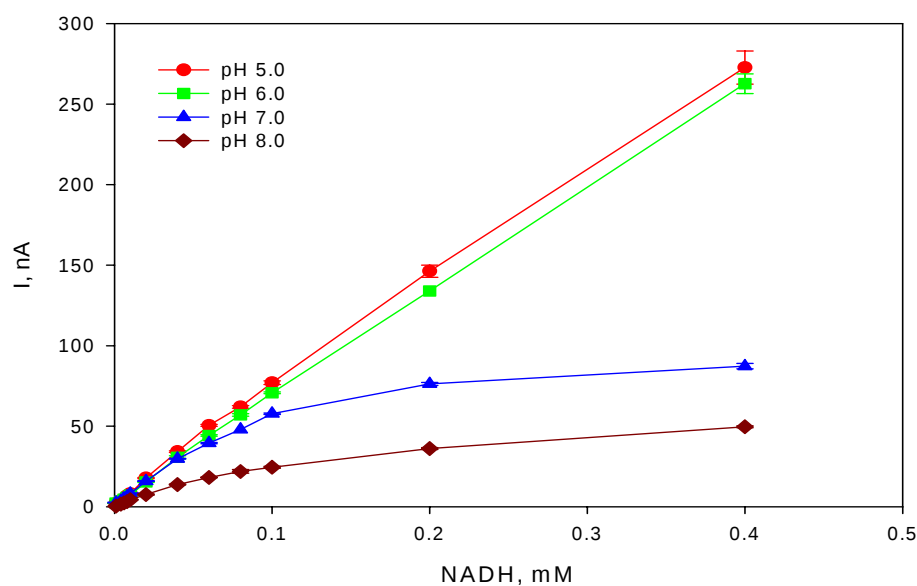


Grafico B.4. Curve di calibrazione eseguite in FIA a differenti valori di pH; -50 mV vs. Ag|AgCl, 2 mM FMN nel flusso trasportatore, 0.350 mL/min velocità del flusso, volume del *loop*: 50 μ L, n=4

I parametri analitici del biosensore sono illustrati nella Tabella B.1.

Tabella B.1. Parametri analitici del biosensore a NADH. Analisi in FIA, -50 mV vs. Ag|AgCl, 2 mM FMN nel flusso trasportatore, 0.1 mM NADH nel *loop*, 0.350 mL/min, *loop*: 50 μ L. Il LOD ed il LOQ vengono calcolati come segue: $LOD = 3s_b/S$; $LOQ = 10s_b/S$, dove s_b è la deviazione standard del segnale in assenza dell'analita ed S è la sensibilità.

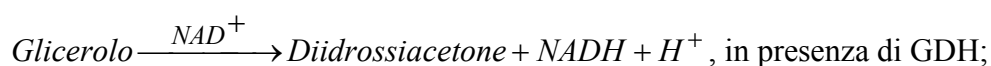
pH	Limite di rilevabilità (LOD)	Limite di quantificazione (LOQ)	Intervallo lineare di lavoro (LWR) (μ M)	Regressione della equazione lineare	RSD (n=4)	Tempo necessario per stabilizzare la linea di base (s)	Tempo necessario per raggiungere il 90% del segnale (s)
5.0	1.1×10^{-7}	3.6×10^{-7}	1-400	$y = 4.05 + 687582x$; $r^2 = 0.9962$	2.8%	140	12
6.0	2.5×10^{-7}	8.5×10^{-7}	1-400	$y = 2.42 + 656280x$; $r^2 = 0.9988$	4.5%	140	12
7.0	3.0×10^{-7}	9.9×10^{-7}	1-60	$y = 2.30 + 603465x$; $r^2 = 0.9896$	4.8%	140	18
8.0	5.7×10^{-7}	1.9×10^{-6}	1-40	$y = 0.43 + 341011x$; $r^2 = 0.9940$	4.8%	140	18

La possibilità di accoppiare la NADH ossidasi con la glicerolo deidrogenasi, per la costruzione di un biosensore bi-enzimatico per la misura del glicerolo nei campioni di vino oppure durante la fermentazione alcolica dei mosti, ha richiesto la valutazione del recupero del NADH da campioni reali e la stabilità operativa. Il biosensore a NADH è stato testato in

una matrice di vino bianco e rosso per valutare l'effetto matrice. I risultati sono riportati nella Tabella B.2. Il recupero varia da 77% a 100% per campioni di vino diluiti (1/100 v/v, 1/200 v/v e 1/400 v/v), nell'intervallo di pH studiato, dimostrando l'applicabilità del biosensore a NADH per misure in campioni reali. La stabilità operativa è stata valutata a pH 5.0, fortificando vino rosso e bianco (diluiti 1/100 v/v nel tampone di lavoro) con una concentrazione nota di NADH ($5 \cdot 10^{-5}$ M). Dopo 120 campioni di vino rosso (Fontamara, Rubino, I.G.T, Terre di Chieti, Italia) fortificato analizzati in FIA, la risposta del biosensore è diminuita del 30%, mentre per vini bianchi (Jidvei, Dry Muscat, D.O.C.-C.M.D., Tarnave, Romania), nelle stesse identiche condizioni di lavoro, la perdita del segnale è stata del 20%.

Biosensore a glicerolo

Per dimostrare la possibilità che la NADH ossidasi possa essere accoppiata con successo con una deidrogenasi, la glicerolo deidrogenasi (GDH) è stata co-immobilizzata con la NADH ossidasi, mediante la stessa procedura riportata per la costruzione del biosensore a NADH. Praticamente 0.017 IU di NADH ossidasi e 16 IU di GDH sono state utilizzate nella costruzione del biosensore per la misura del glicerolo. La misura di questo importante analita avviene secondo lo schema di reazione illustrato nelle seguenti equazioni:



Equazione B 2.

ed il NADH prodotto è riossidato a NAD^+ dalla NADH ossidasi



Equazione B.3.

Per la misura del glicerolo vengono utilizzati gli stessi parametri analitici ottimizzati in precedenza per il biosensore a NADH. L'unico parametro importante da ottimizzare rimane quindi la concentrazione del NAD^+ da utilizzare nelle misure in FIA. La concentrazione ottimizzata di NAD^+ è stata 1 mM. I parametri analitici del biosensore a glicerolo sono stati riportati nella Tabella B.3.

Tabella B.2. Valutazione del grado di recupero su campioni reali di vino fortificati con NADH ($5 \cdot 10^{-5}$ M). Analisi in FIA, -50 mV vs. Ag|AgCl, 2 mM FMN, 0.350 mL/min, *loop*: 50 μ L, n=4.

pH	% Recupero (vino rosso)			% Recupero (vino bianco)		
	1\100 v\v	1\200 v\v	1\400 v\v	1\100 v\v	1\200 v\v	1\400 v\v
5.0	83	89	93	85	91	95
6.0	81	90	95	89	92	98
7.0	88	93	98	84	91	98
8.0	77	85	98	85	89	100

Tabella B.3. Parametri analitici del biosensore a glicerolo.

pH	Limite di rilevabilità (LOD) (M)	Intervallo lineare di lavoro (M)	Regressione della equazione lineare
10.0	2.2×10^{-6}	10^{-5} - 10^{-3}	$y = -3.8 + 163348x$; $r^2 = 0.9910$

Conclusioni

La proprietà dell'enzima ricombinante NADH ossidasi da *Thermus thermophilus* di rigenerare il NAD^+ , in un ampio intervallo di pH, è una delle tante caratteristiche che la rendono adatta ad essere utilizzata nella costruzione di biosensori NAD^+ -dipendenti. La capacità di questi biosensori di essere operativi sarà limitata solamente dalla stabilità operativa delle deidrogenasi e dal metodo di immobilizzazione adottato.

Anche le caratteristiche degli elettrodi *screen-printed* modificati con il blu di Prussia presentano dei vantaggi, in quanto sono paragonabili in termini di sensibilità agli elettrodi classici di Pt impiegati per la misura dell'acqua ossigenata, ma sono più selettivi nei confronti di potenziali interferenti elettrochimici, in quanto operano ad un potenziale di lavoro basso (-50 mV vs. Ag|AgCl).

Inoltre, la possibilità di co-immobilizzare la GDH e la NADH ossidasi, è molto promettente per eventuali biosensori di questo tipo.

C) Elettrodo NADH mediato con Variamine blue

Nanotubi di carbonio

Il carbonio (C) è un elemento del quarto gruppo della tavola periodica, con la seguente configurazione elettronica: $(\text{He})2s^22p^2$. Esso si presenta in diverse forme allotropiche: diamante, grafite, nero fumo (*carbon black*), carbonio attivo, fibre di carbonio, carbonio vetroso (*glassy carbon*), fullereni, nanotubi. Di tutte queste forme allotropiche, il diagramma di stato prevede come forme termodinamicamente stabili del carbonio, solamente le prime due.

Il diamante presenta una struttura cristallina tridimensionale, descritta da un reticolo cubico a facce centrate (*fcc*) e dotata di eccezionali proprietà chimiche e fisiche: durezza, rigidità, inerzia chimica, elevata conducibilità termica, elevato valore dell'indice di rifrazione.

La grafite è caratterizzata dalla presenza dei piani grafenici, formati dalla sovrapposizione dei reticoli esagonali dei piani della grafite. La struttura tridimensionale è costituita dall'impilamento dei piani secondo un arrangiamento di tipo *abab*: metà degli atomi di un piano sono sfalsati rispetto a quelli del successivo. La grafite è un solido dalle caratteristiche metalliche ed ha proprietà lubrificanti.

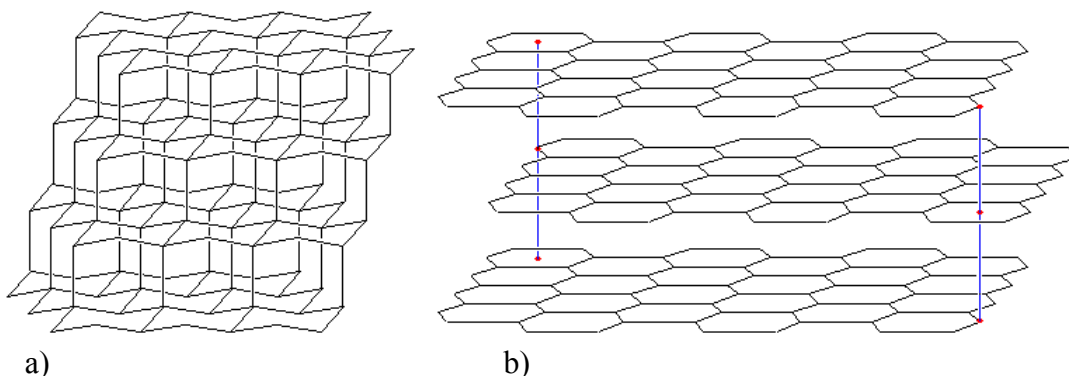


Figura C.1. Illustrazione grafica dei reticoli cristallini del diamante (a) e della grafite (b).

La famiglia del carbonio nanostrutturato comprende i fullereni (capostipite è il Buckminsterfullerene C_{60}), le strutture *onion-like* del carbonio ed i nanotubi di carbonio. La loro sintesi avviene in condizioni di non equilibrio termodinamico, motivo che induce a credere si tratti di strutture metastabili.

I fullereni sono una famiglia di molecole vere e proprie, di simmetria icosaedrica, il cui diametro misura $7\text{\AA}$. Sono costituiti da atomi di carbonio, formalmente ibridati sp^2 , disposti ai vertici di esagoni e di pentagoni regolari che impartiscono la curvatura alla

superficie. Dispongono di un sistema di elettroni delocalizzati su tutta la molecola, quindi in tre dimensioni. I fullereni più stabili sono il C_{60} e il C_{70} .

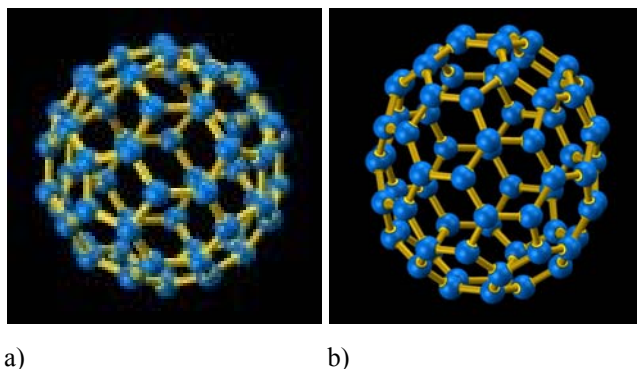


Figura C.2. I fullereni C_{60} (a) e C_{70} (b).

Le strutture *onion-like* del carbonio sono nanoparticelle sferoidali, costituite da strati concentrici di piani grafenici più o meno ordinati, la cui distanza tra i piani è simile a quella della grafite ($3.35 \text{ \AA}$).

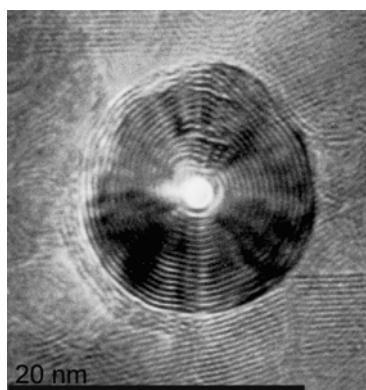


Figura C.3. Immagine TEM di una struttura a cipolla (*onion-like carbon*).

I nanotubi di carbonio sono nanostrutture a simmetria cilindrica, costituite da piani grafenici arrotolati e chiusi alle estremità da emisfere di tipo fullerenico. Si distingue generalmente tra nanotubi a parete singola (*Single Wall Carbon Nanotube: SWCNT*), costituiti da un singolo foglio grafenico arrotolato, e nanotubi a parete multipla (*Multi Wall Carbon Nanotube: MWCNT*), costituiti da più fogli arrotolati che formano cilindri coassiali, il cui diametro varia da uno a qualche decina di nanometri, con una lunghezza che può raggiungere il valore di qualche micron. I *MWCNT* sono stati i primi ad essere scoperti nel 1991 sulla superficie del catodo, durante la sintesi per scarica ad arco di fullereni.¹³⁹ La prima osservazione di *SWCNTs* è avvenuta nel 1993.¹⁴⁰ Il diametro di un nanotubo a parete singola varia da 0.7 a 2 nm ed il rapporto lunghezza/diametro è dell'ordine di 10^2 - 10^4 (da cui l'unidimensionalità attribuita ai *SWCNTs*).

La sintesi di nanotubi di carbonio avviene a temperature elevate ed in condizioni di non equilibrio termodinamico. Nessuna tecnica è selettiva verso un tipo particolare di nanotubo; si ottengono miscele con una distribuzione più o meno ampia di diametro, elicità e lunghezza, insieme a residui di sintesi costituiti da carbonio amorfo e granitico e metalli di transizione (utilizzati come catalizzatori nella sintesi di nanotubi a parete singola). Questo rende necessaria l'attenta caratterizzazione del materiale sintetizzato ed i trattamenti post-sintesi di purificazione e separazione.

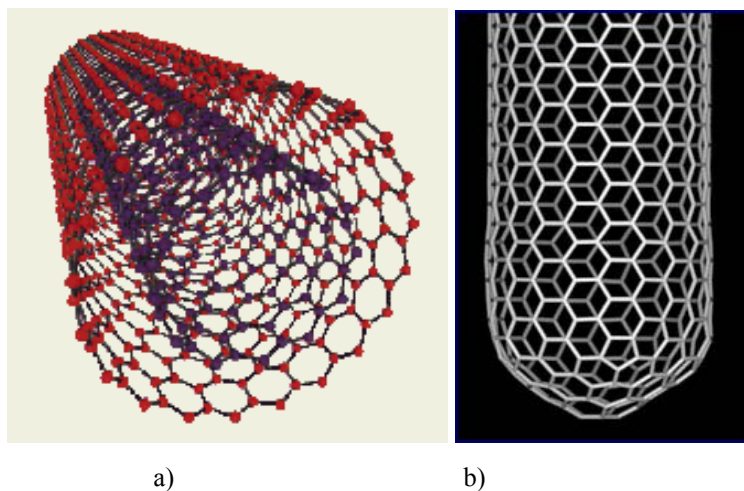


Figura C.4. Illustrazione grafica di un MWCNT (a) e SWCNT (b).

La scarica ad arco rimane tutt'oggi il metodo più semplice per la sintesi di nanotubi, in quanto il raggiungimento della temperatura alla quale si ha la vaporizzazione degli atomi di carbonio in plasma ($>3000^{\circ}\text{C}$), si ottiene facilmente utilizzando elettrodi di grafite ed applicando un voltaggio di 20-25 V con una scarica di corrente continua di 50-120 A. La ablazione laser sfrutta i laser a CO_2 o Nd:YAG per ottenere la vaporizzazione degli atomi di C. Questa tecnica è particolarmente efficiente per la sintesi di nanotubi di carbonio a parete singola.

La pirolisi e la *Chemical Vapour Deposition* (CVD) si distinguono dalle due precedenti tecniche di sintesi, in quanto si basano sulla dissociazione di fasi gassose o su processi reattivi in fase vapore. La pirolisi utilizza fornaci a pressione ambiente per la decomposizione di carbonio da fasi gassose. I reagenti utilizzati (acetilene, metano, etc.) in atmosfera di argon o di azoto, vengono fatti fluire su supporti di quarzo ricoperto con un film di catalizzatore metallico. La CVD è basata sull'attivazione di una fase gassosa (miscele di idrocarburi, CO, CO_2 , con N_2 , H_2 o gas nobili) da parte di una opportuna sorgente (microonde, radiofrequenza, filamento caldo, fiamme, etc.).¹⁴¹ I SWCNTs vengono depositati su un opportuno substrato ricoperto con particelle catalitiche di metalli di transizione (Co, Ni, Fe, etc.).

Reagenti

Strumenti e tecniche di analisi

Il β -NAD⁺ (>95%, HPLC), il Nafion[®] 5% (v/v) ed il NADH (>97%, HPLC) sono comprati dalla ditta Fluka Chemie, Buchs, Svizzera. Tutti i sali utilizzati sono della Sigma, St. Louis, MO, USA, all'infuori del fosfato monosodico e monopotassico, il bicarbonato di sodio, il KCl; il K₂HPO₄ che sono forniti dalla Riedel-de Haen, Seelze, Germania.

Il sistema FIA utilizzato è composto da una pompa peristaltica (Gilson, modello Minipuls 3, Villers-le-Bel, Francia), da tubi di Tygon, da una cella in flusso a strato sottile ($d_{\text{int}}=15$ mm) e da una valvola di iniezione a 4 canali (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Per le misure amperometriche si utilizza un potenziostato della Metrohm, (Herisau, Svizzera) connesso ad un registratore analogico di tipo *X-t*, modello L250E (Linseis, Selb, Germania).

Le misure elettrochimiche in voltammetria ciclica vengono condotte utilizzando un sistema μ Autolab, Type II, Electrochemical System (Eco Chemie, Utrecht, Olanda), dotato di PGSTAT-12 e software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Olanda).

Viene utilizzato anche un agitatore magnetico (Heidolph, model MR 3001).

Pretrattamento dei nanotubi

I nanotubi a parete singola, con diametro compreso fra 1.2 e 1.5 nm, presentano anche residui di sintesi (circa il 30%), come il carbonio amorfo e grafítico ed anche metalli di transizione, e per tale motivo devono essere sottoposti a trattamenti chimici o fisici, volti sostanzialmente a purificarli ed anche a funzionalizzarli.¹⁴² Brevemente, 200 mg di SWCNTs vengono sospesi in una miscela concentrata di acido solforico/acido nitrico (3:1 v/v, 200 mL), e sonicati per 24 h. La sospensione ottenuta è stata filtrata su una membrana di polipropilene ($d=0.2$ μm), e lavata con acqua bidistillata, finché il pH dell'acqua di lavaggio diventa quasi neutra o leggermente acida. I nanotubi sono stati ulteriormente essiccati in stufa, a 100°C (2 ore). Questo pretrattamento acido, ha realizzato anche la funzionalizzazione dei nanotubi (SWCNTs-COOH), oltre alla necessaria purificazione. Le misure FT-IR indicano la presenza di una banda situata a 1714 cm^{-1} (Figura C.5), attribuita al gruppo carbossilico, banda non presente nel campione di partenza, prima del pretrattamento in miscela acida.

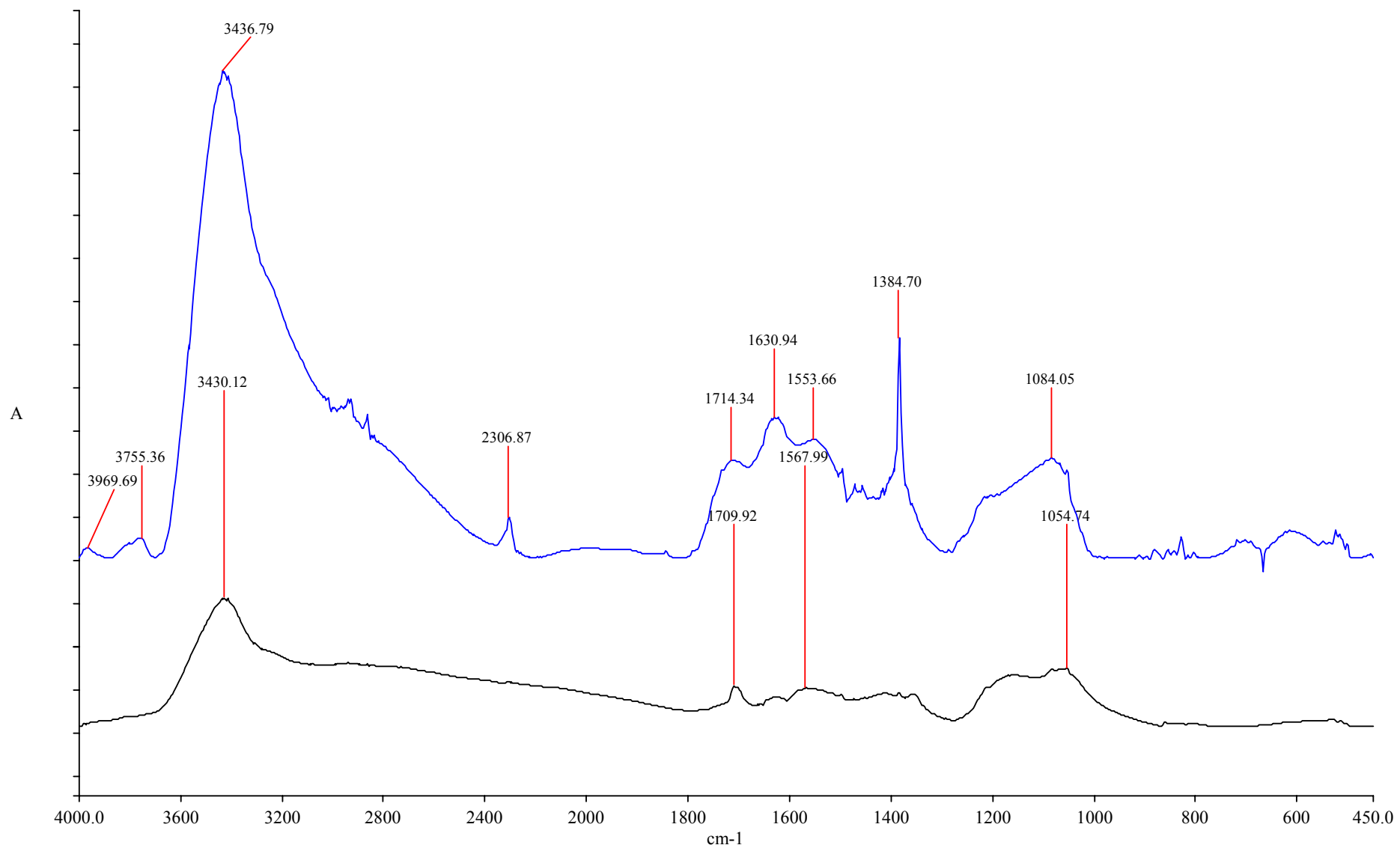


Figura C.5. Spettro FT-IR di SWCNTs (nero) e SWCNTs ossidati in miscela acida (blu); misure effettuate in KBr.

Immobilizzazione del mediatore

La presenza del gruppo carbossilico sullo scheletro dei nanotubi permette la derivatizzazione ulteriore con molecole portatrici di gruppi amminici.

La Variamine blue (4-amino-4'-metossidifenilammina, Figura C.6.) oltre a possedere un gruppo amminico, disponibile per reazioni di derivatizzazione, presenta anche proprietà elettrocatalitiche per l'ossidazione del NADH.

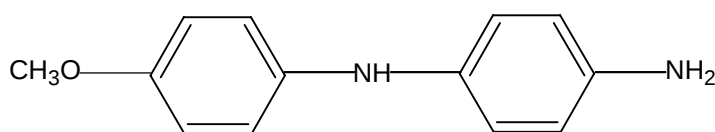


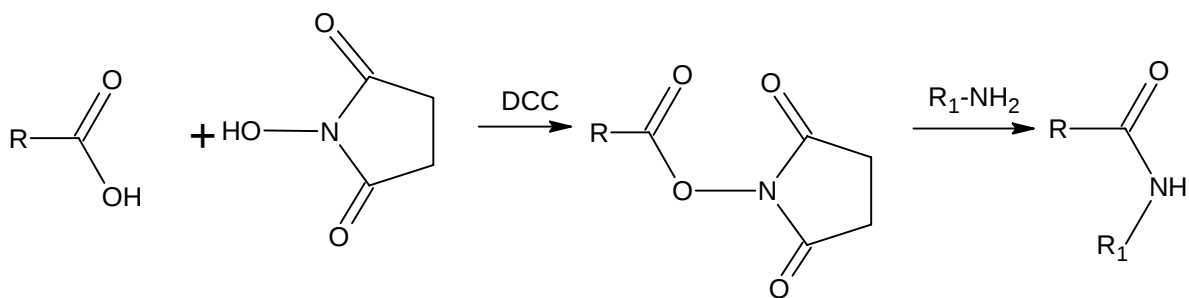
Figura C.6. Struttura della Variamine blue.

Per legare covalentemente la Variamine blue (VB) ai nanotubi ossidati (SWCNT-COOH) vengono utilizzate due procedure:

- il metodo della N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e N-idrossisuccinimide (NHS), prevede una attivazione preliminare del gruppo carbossilico, con la susseguente formazione del legame ammidico; la reazione si svolge in solvente organico (N,N' dimetilformammide, DMF);
- il metodo della 1-etile-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC) non prevede l'attivazione preliminare del gruppo carbossilico, essendo un metodo di coniugazione più blando.

Metodo DCC/NHS

10 mg di SWCNT-COOH sono stati dispersi in un volume di 2 mL di DMF, contenute 100 mg di DCC e 200 mg di NHS, e fatti reagire per 2 ore a temperatura ambiente e poi per altre 22 ore a 4°C, sotto continua agitazione. Dopo che sono trascorse 24 ore, vengono aggiunti 0.2 mL di DMF in cui sono stati solubilizzati 5 mg di VB, e fatti reagire per altre 2 ore a temperatura ambiente. La sospensione di nanotubi derivatizzati viene filtrata e lavata abbondantemente (con acqua distillata ed etanolo), per eliminare l'eccesso della VB adsorbita ed i prodotti secondari di reazione. I nanotubi così derivatizzati vengono ridispersi in 8 mL di etanolo. Lo schema di reazione prevede la formazione di un intermedio di reazione sotto forma di estere, che reagisce rapidamente e con una buona resa, con i gruppi amminici per formare un legame ammidico:



Schema di reazione C.1. Coniugazione tra un ammina ed un acido carbossilico mediante l'utilizzo della NHS e DCC.

E' stata eseguita anche una reazione di verifica, in assenza di DCC e NHS, per accertare se la Variamine blue venga adsorbita sulla struttura grafittica dei nanotubi.

Nella Figura C.7. gli spettri FT-IR indicano la presenza della I, II e III banda ammidica (1630 , 1577 e 1437 cm^{-1}), confermando che la reazione di coniugazione tra i SWCNT-COOH e la VB è avvenuta con successo. La reazione di verifica, in cui la VB si potrebbe adsorbire sulla struttura grafittica dei nanotubi a parete singola, indica che tale fenomeno avviene, in quanto la presenza dei picchi a 1579 e 1213 cm^{-1} corrisponde alle vibrazioni di *bending* (-NH) e *stretching* (-CN) della struttura amminica della VB. Inoltre il picco situato a 1717 cm^{-1} (-COOH) non diminuisce in intensità, così come succede per la reazione di derivatizzazione in presenza di DCC e NHS.

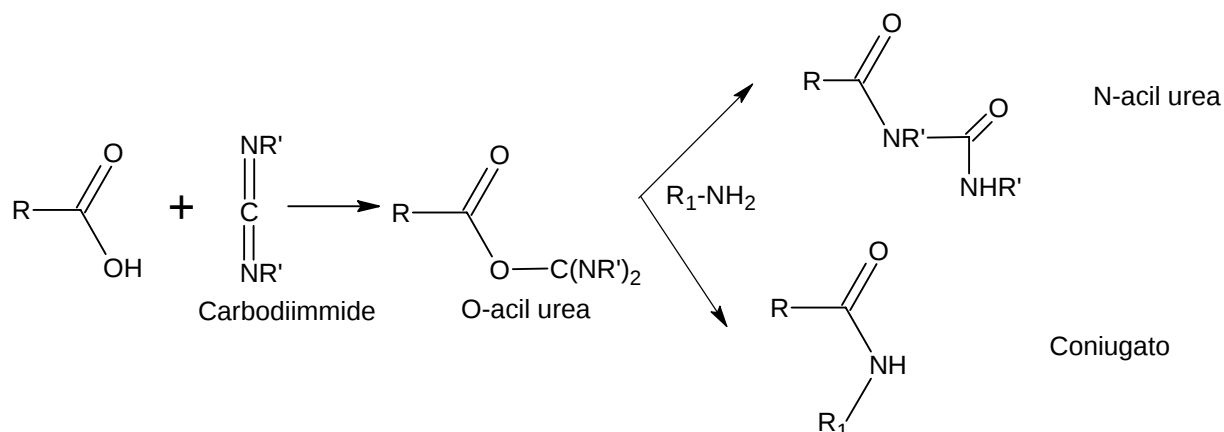
Metodo EDC

10 mg di SWCNT-COOH sono stati dispersi in un volume di 2 mL di tampone fosfato, 0.1 M , $\text{pH}=6$, contenente 100 mg di EDC e 5 mg di VB, e fatti reagire per 24 ore , in agitazione, a temperatura ambiente. La sospensione di nanotubi derivatizzati è stata filtrata e lavata abbondantemente (con acqua distillata ed etanolo), per eliminare l'eccesso della VB adsorbita ed i prodotti secondari di reazione. I nanotubi così derivatizzati sono stati ridispersi in 10 mL di etanolo. Lo schema di reazione prevede la formazione di un intermedio di reazione, O-acil urea, che reagisce con minor resa con i gruppi amminici, per formare un legame ammidico e un prodotto di reazione secondario, la N-acil urea (Schema di reazione C.2.)

E' stata eseguita anche una reazione di verifica, in assenza di EDC, per accertare se la Variamine blue venga adsorbita sulla struttura grafittica dei nanotubi.

Nella Figura C.8. gli spettri FT-IR non rivelano la presenza certa della tre bande ammidiche, anche se il picco situato a 1587 cm^{-1} potrebbe essere assegnato alla II banda

ammidica; in questa zona si sovrappongono anche le vibrazioni di *bending* (per -NH) e di *stretching* (C=C dello scheletro dei nanotubi).



Schema di reazione C.2. Coniugazione tra un ammina ed un acido carbossilico mediante l'utilizzo della EDC.

Il bianco di reazione, indica che la VB è stata adsorbita, in quanto la presenza dei picchi a 1302 e 1230 cm⁻¹ corrisponde alle vibrazioni di *stretching* (-CN) della struttura amminica della VB. Inoltre il picco situato a 1713 cm⁻¹ (-COOH) è ancora ben visibile.

La Tabella C.1. e la Figura C.9. riassumono le principali caratteristiche degli spettri FT-IR.

L'indagine morfologica eseguita tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) ha confermato la presenza dei nanotubi in tutti i quattro campioni (Immagine SEM C.1., C.2., C.3. e C.4.), ed illustra una diversa morfologia del campione. Il campione trattato in ambiente organico si presenta sotto forma di cristalli appuntiti (Immagine SEM C.1.1., C.2.1., C.2.3. e C.2.4.), mentre il campione trattato in ambiente acquoso si presenta sotto forma granulare.

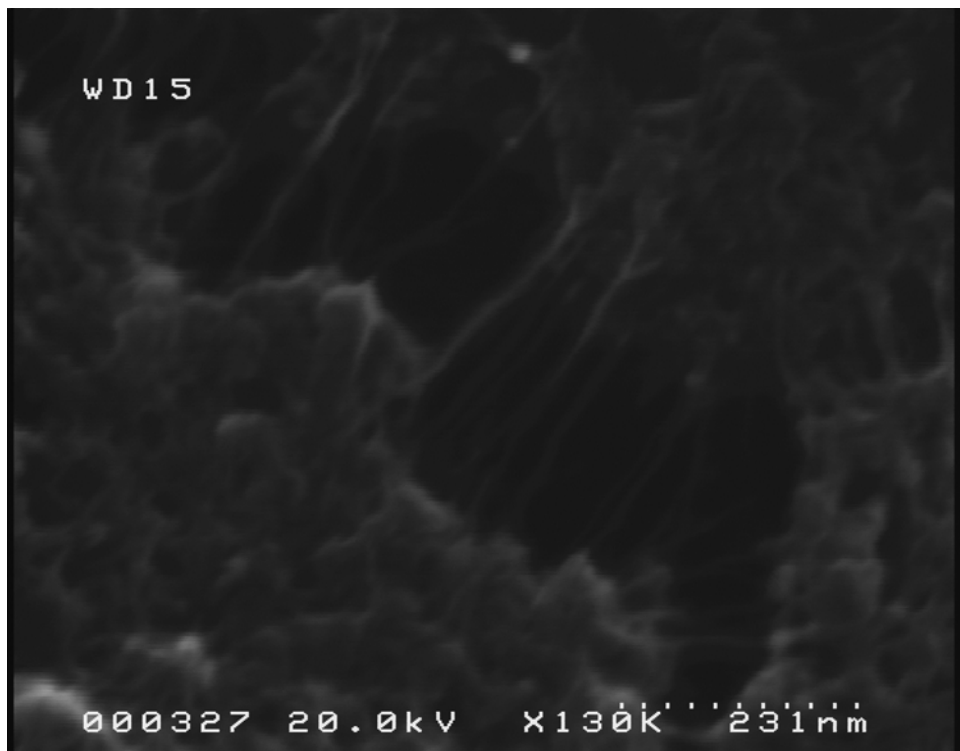


Immagine SEM C.1. Metodo DCC/NHS; substrato di Si.

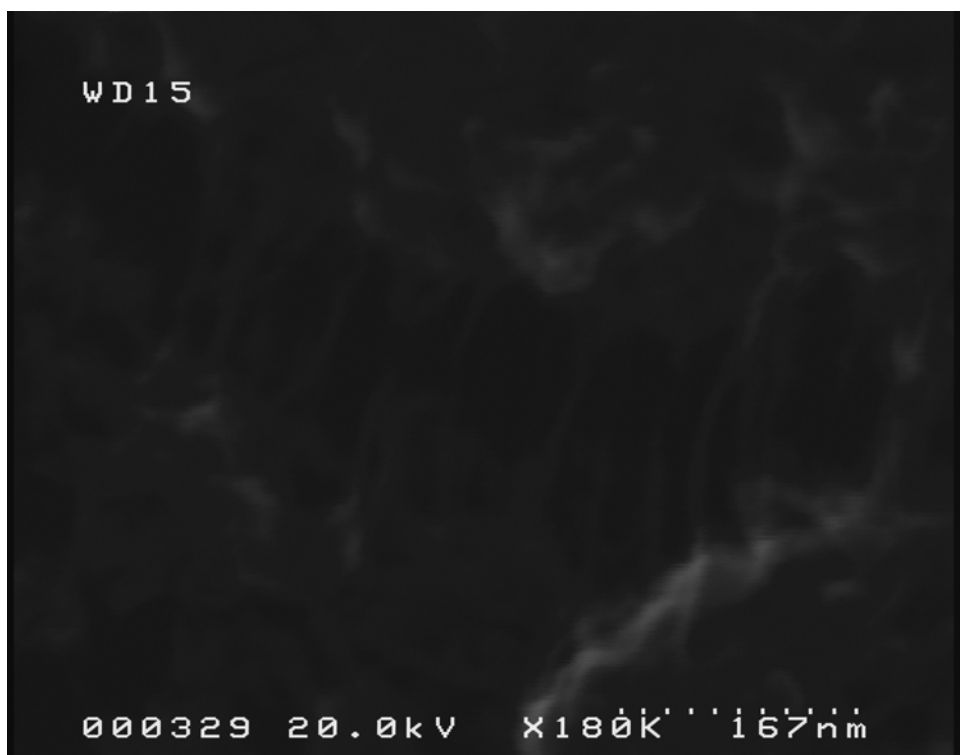


Immagine SEM C.2. Metodo DCC/NHS-bianco di reazione; substrato di Si.

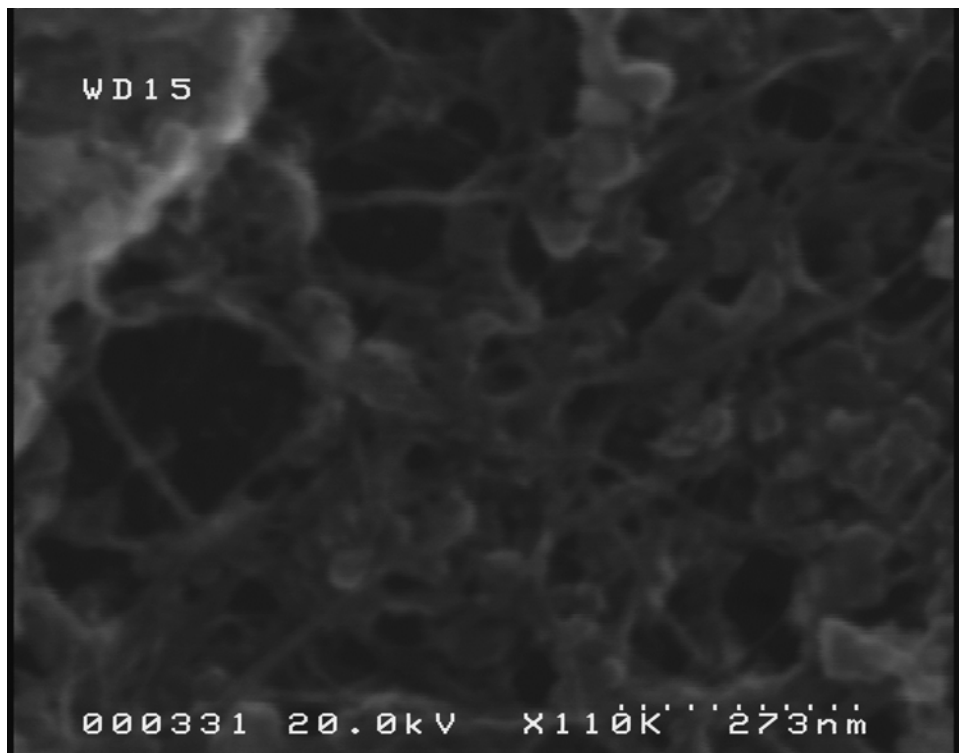


Immagine SEM C.3. Metodo EDC; substrato di Si.

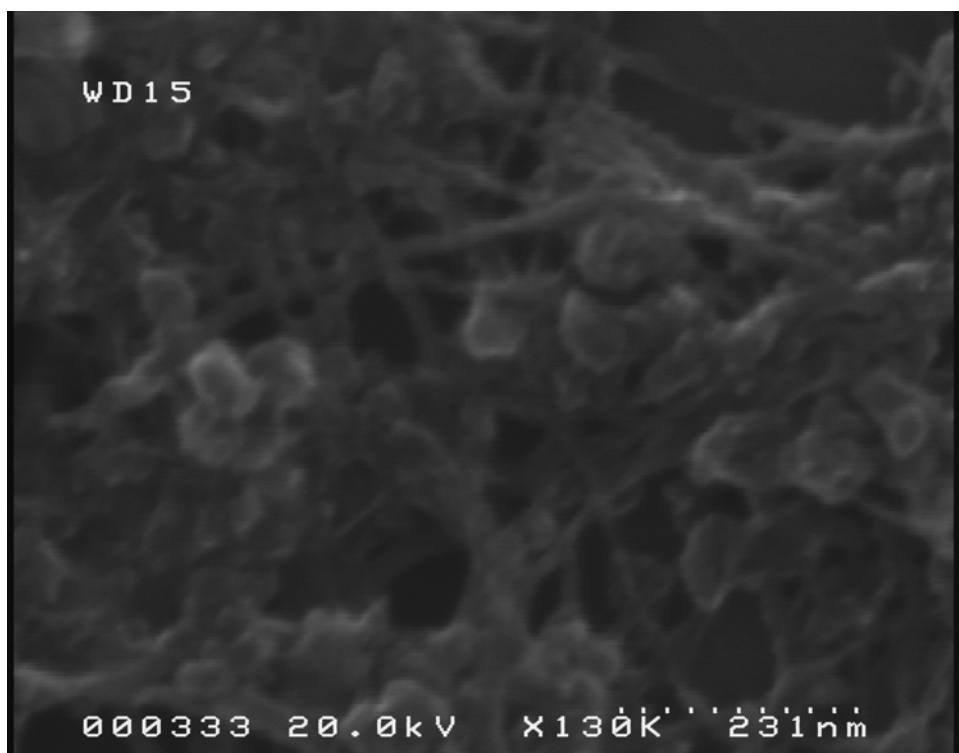


Immagine SEM C.4. Metodo EDC-bianco di reazione; substrato di Si.

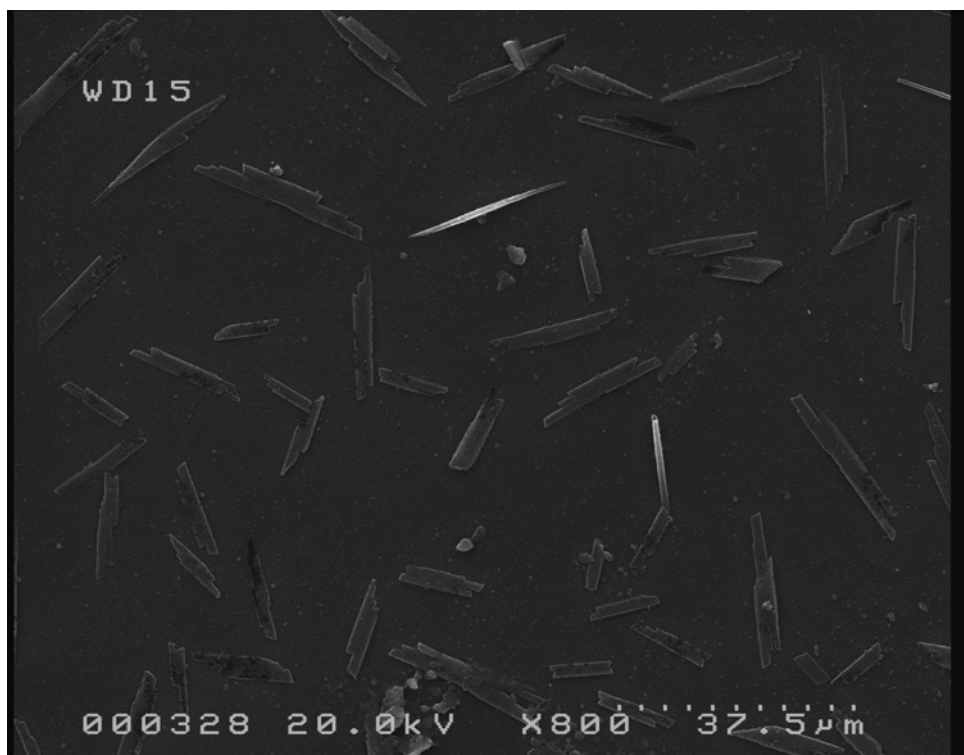


Immagine SEM C.1.1. Metodo DCC/NHS; substrato di Si.

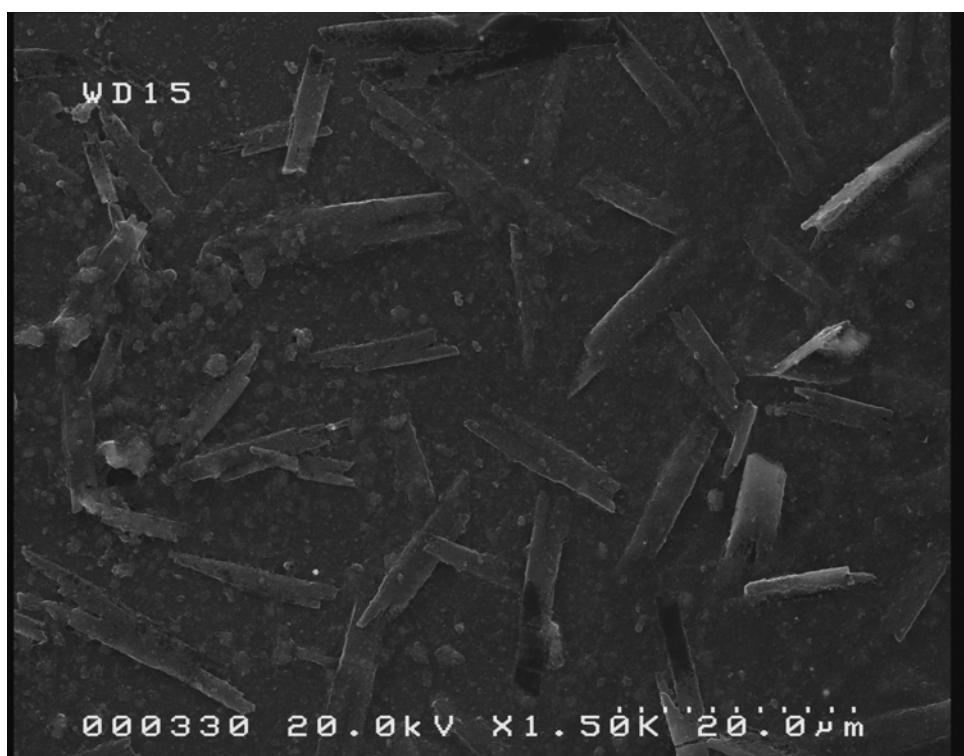


Immagine SEM C.2.1. Metodo DCC/NHS-bianco di reazione; substrato di Si.

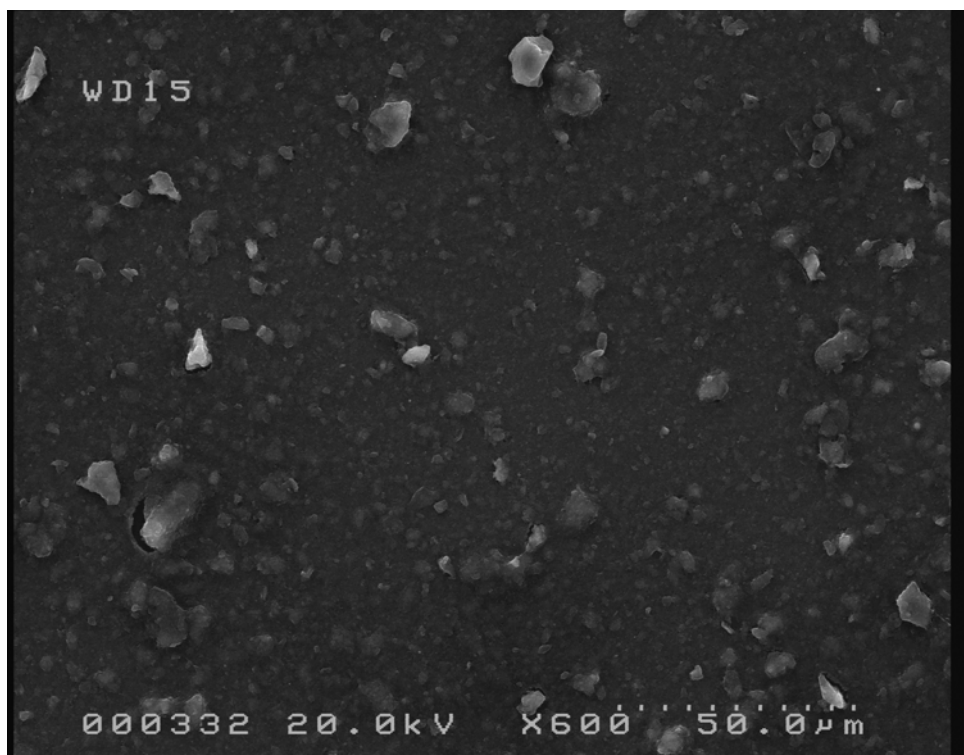


Immagine SEM C.3.1. Metodo EDC; substrato di Si.

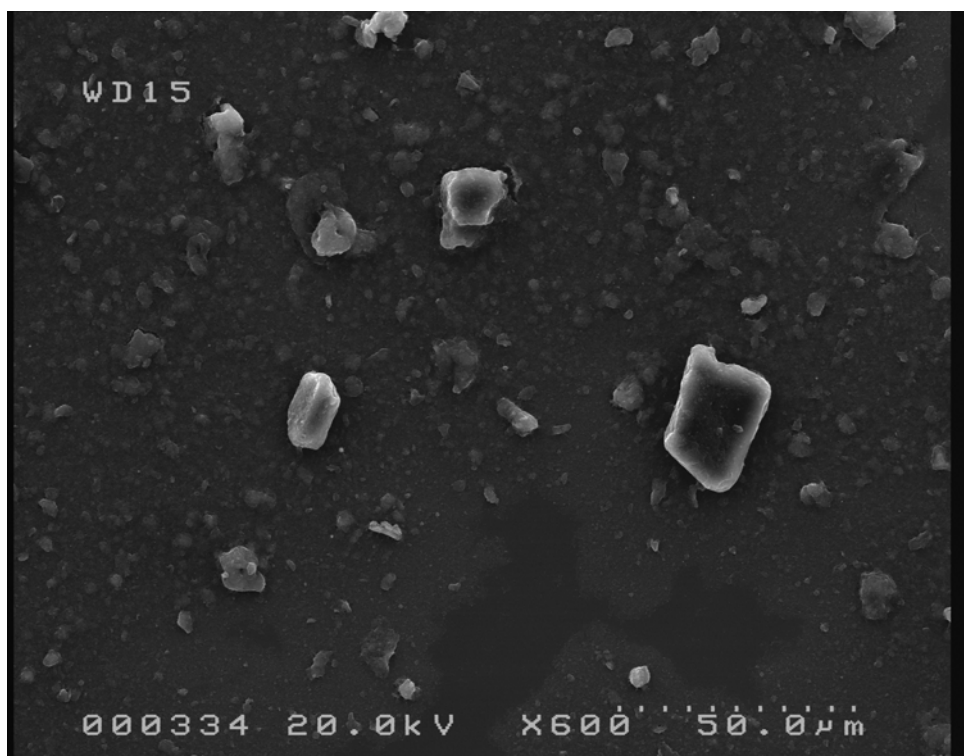


Immagine SEM C.4.1. Metodo EDC-bianco di reazione; substrato di Si.

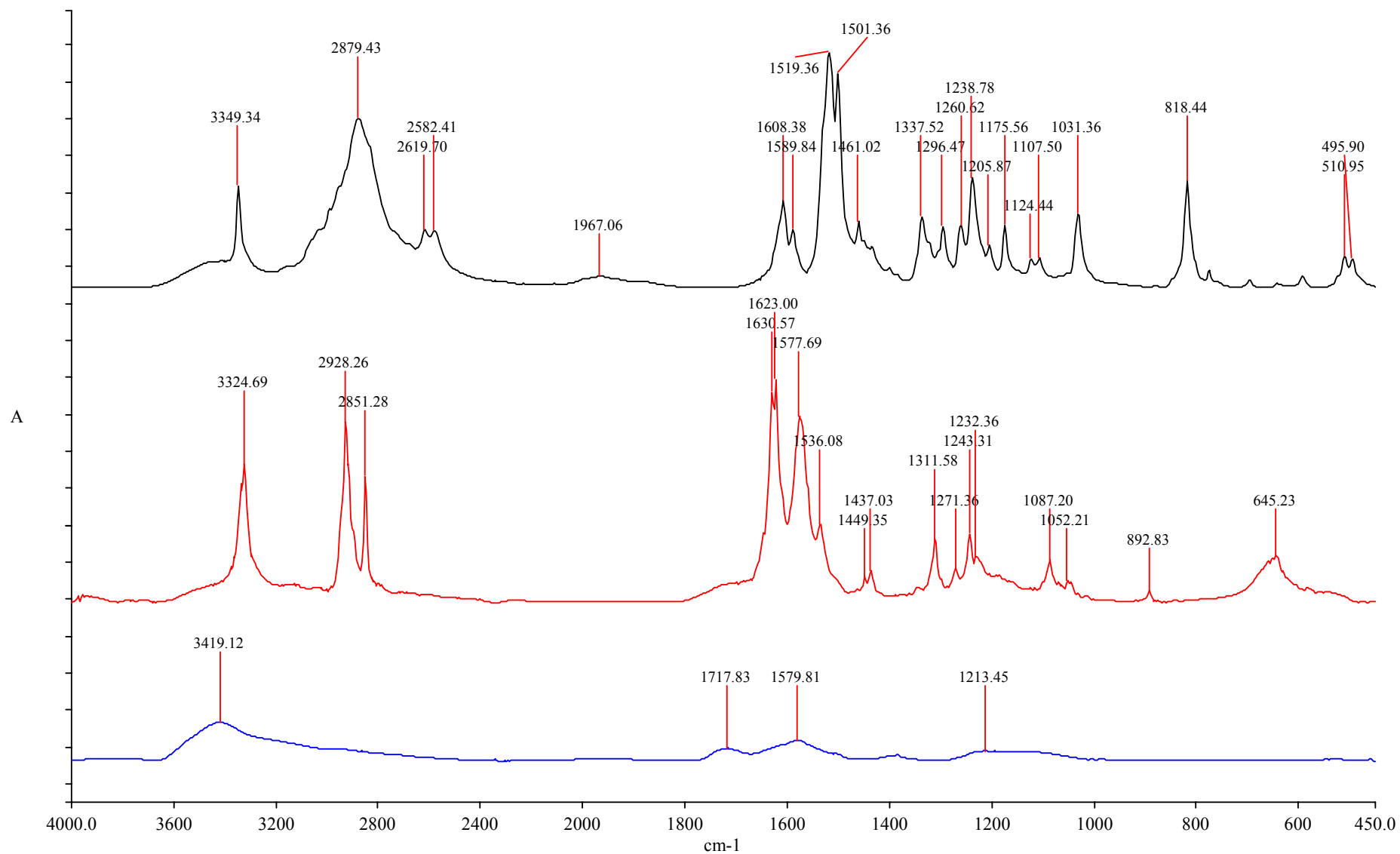


Figura C.7. Spettro FT-IR della VB (nero), SWCNT-CO-VB (derivatizzato DCC/NHS, rosso) e SWCNT-COOH+VB (adsorbito, blu); misure effettuate in KBr.

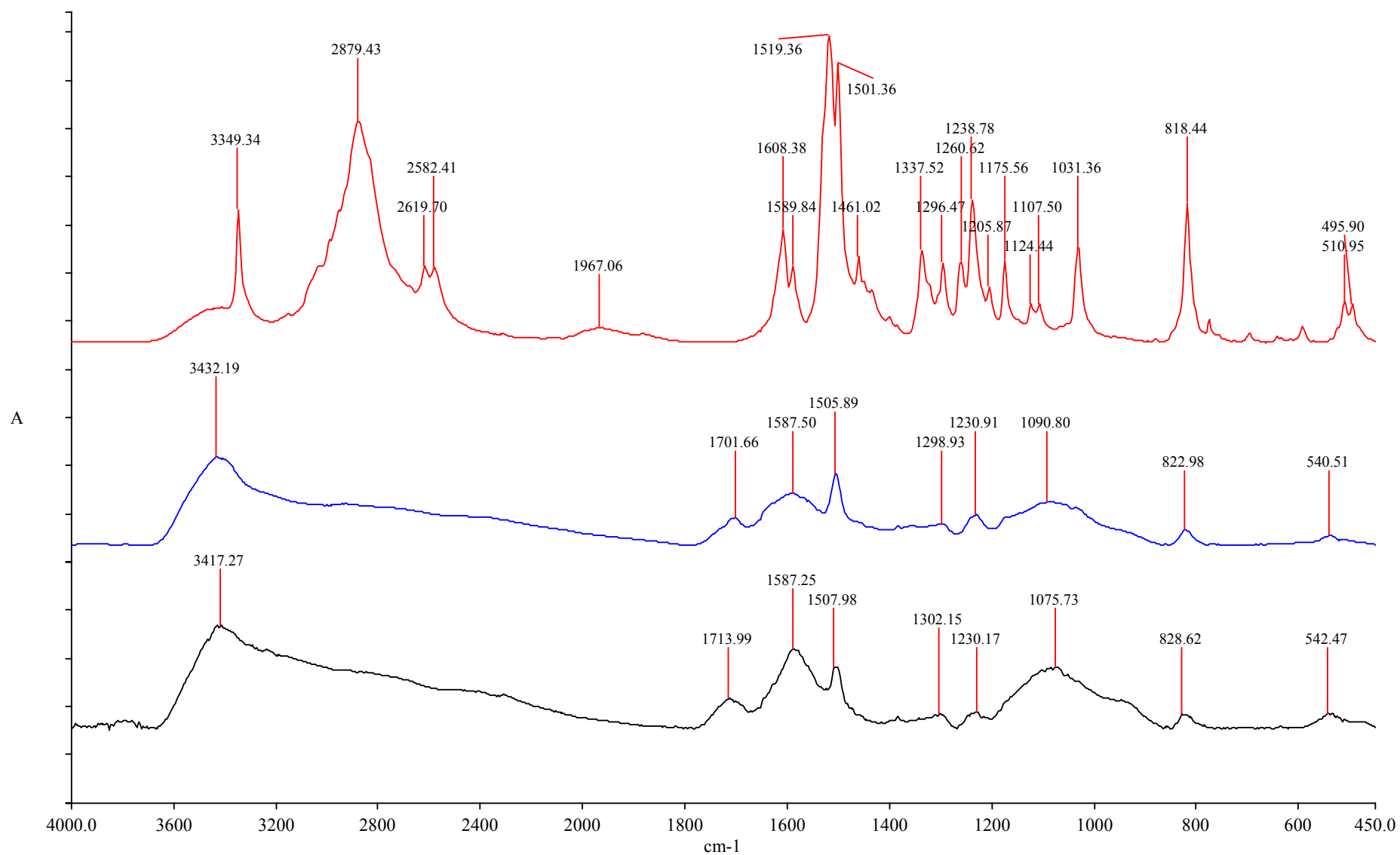


Figura C.8. Spettro FT-IR della VB (rosso), SWCNT-CO-VB (derivatizzato EDC, blu) e SWCNT-COOH+VB (adsorbito, nero); misure effettuate in KBr.

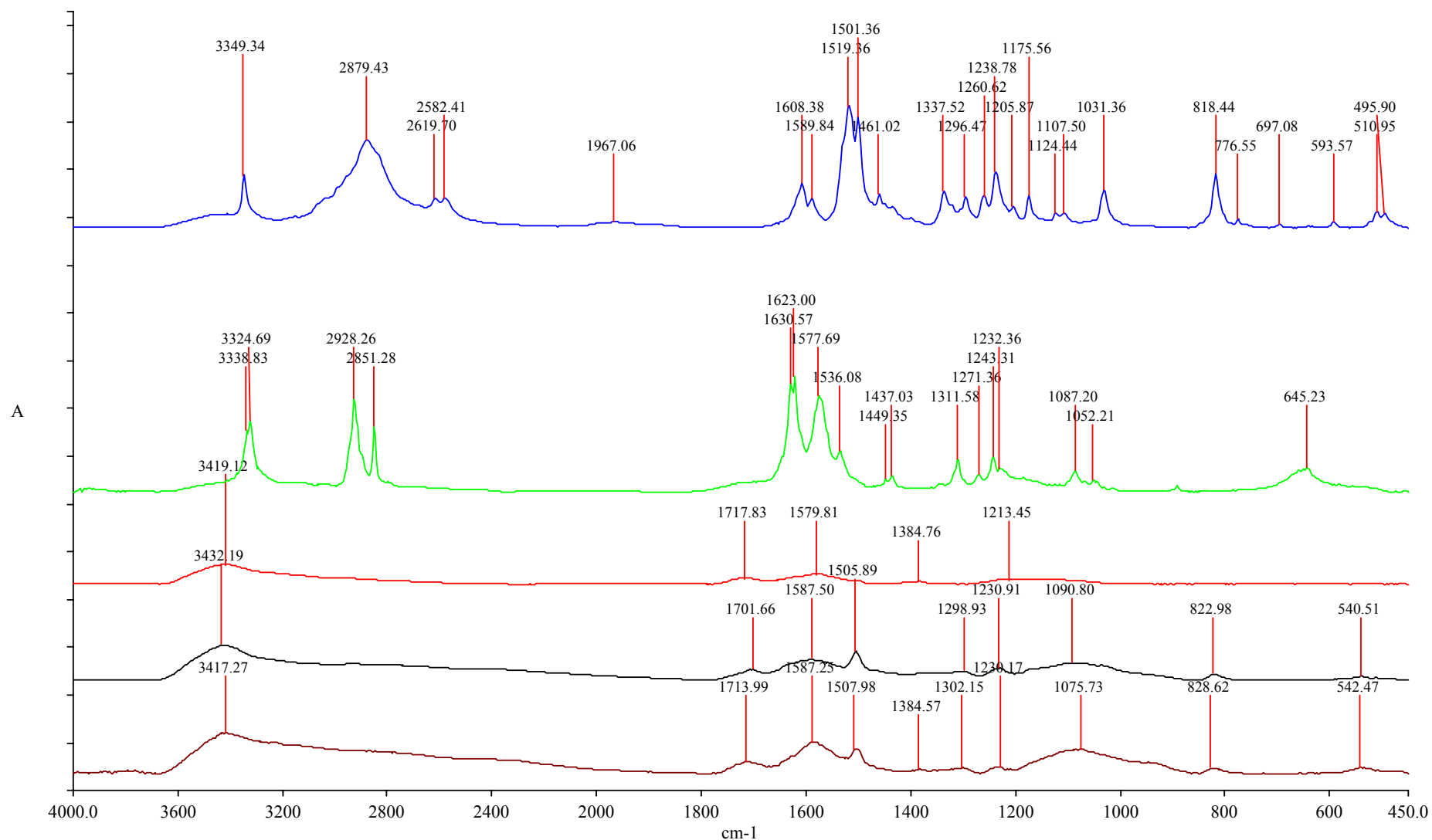


Figura C.9. Spettri FT-IR della VB (blu), SWCNT-CO-VB (DCC/NHS, verde; EDC, nero) e SWCNT-COOH+VB (adsorbito, DCC/NHS, rosso; EDC, marrone) a confronto; misure effettuate in KBr.

Tabella C.1. Dati riassuntivi degli spettri FT-IR.

SWCNTs		SWCNT-COOH		Variamine blue (VB)		SWCNT-VB (metodo DCC/NHS)		SWCNT+VB (metodo DCC/NHS, adsorbito)	
cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione
3430	H ₂ O	3969	O-H str.	3349	N-H str.	3324	N-H str.	3419	H ₂ O
1709	?	3755	O-H str.	2879	CH ₃ str. (Ar-O-CH ₃)	2928	C-H str.	1717	C=O str. (-COOH)
1567	C=C str.	3436	H ₂ O	2619	NH ₃ ⁺ , NH ₂ ⁺ str.	2851	C-H str.	1579	C=C str., N-H bend.
1054	C=C str.	2306	C-H str.	2582	NH ₃ ⁺ , NH ₂ ⁺ str.	1630	I banda ammidica (C=O str.)	1213	C-H str., C-H def. vib., C-N str.
-	-	1714	C=O str. (COOH)	1967	H ₂ O	1623	N-H def. e bend.	-	-
-	-	1630	H ₂ O	1608	N-H def. e bend. C-C str.	1577	II banda ammidica (N-H def., C-N str.)	-	-
-	-	1553	C=C str.	1589	N-H def.	1536	N-H bend.	-	-
-	-	1384	HNO ₃	1519	C-C str., N-H bend.	1449	CH ₃ str. (Ar-O-CH ₃)	-	-
-	-	1084	C-O str. (COC), C-H def.	1501	C-C str., N-H bend.	1437	N-H def. vib., III banda ammidica (C-N str.)	-	-
-	-	-	-	1461	C-C str., CH ₃ str. (Ar-O-CH ₃)	1311	C-N str.	-	-
-	-	-	-	1337	C-N str.	1271	C-N str. C-H str.	-	-
-	-	-	-	1296	C-N str. C-H def.	1243	C-N str., C-H def.	-	-
-	-	-	-	1260	C-N str. C-H def.	1232	NH ₃ ⁺ rock.	-	-
-	-	-	-	1238	NH ₃ ⁺ rock.	1087	C-H def. NH ₂ rock/twist.	-	-
-	-	-	-	1205	NH ₃ ⁺ rock.	1052	C-H def. NH ₂ rock. twist.	-	-
-	-	-	-	1175	C-N str., C-H def.	892	C-H def. vib. anello aromatico	-	-

SWCNT-VB (metodo EDC)		SWCNT+VB (metodo EDC, adsorbito)		Variamine blue (VB)		SWCNT-VB (metodo DCC/NHS)		-	
cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	cm ⁻¹	Osservazione	-	-
3432	H ₂ O	3417	H ₂ O	1124	NH ₃ ⁺ rock., C-N str.	645	C-H bend., N-C=O def.	-	-
1701	C=O str. (-COOH)	1713	C=O str. (-COOH)	1107	NH ₃ ⁺ rock., C-N str.	-	-	-	-
1587	C-C str., II banda ammidica? (N-H def., C-N str.)	1587	C=C str.,	1031	C-H def. NH ₂ rock. twist.	-	-	-	-
1505	C=C str.,	1507	C=C str.,	818	C-H def. N-H def.	-	-	-	-
1298	C-N str., C-H def. vib.	1302	C-N str.	510	C-N-C def. vib., N-H bend.	-	-	-	-
1230	C-N str., C-H def. vib.	1230	C-N str., C-H def. vib.	495	ring def.	-	-	-	-
1090	C-H def. vib., NH ₂ rock/twist.	1075	C-H def. vib., NH ₂ rock/twist.	-	-	-	-	-	-
822	NH ₂ rock/twist.	828	C-H e N-H def. vib.	-	-	-	-	-	-
540	CO ₂ rocking	542	CO ₂ rocking	-	-	-	-	-	-

Elettrodi screen-printed modificati con Variamine blue

Gli elettrodi screen-printed sono stati modificati, depositando sulla superficie dell'elettrodo di lavoro 4 o 6 μL della sospensione di nanotubi in etanolo. In funzione del metodo di coniugazione, si ottengono quattro tipi di elettrodi:

- elettrodi di tipo A (metodo DCC/NHS), 4 μL ;
- elettrodi di tipo A₀ (bianco di reazione per il metodo DCC/NHS), 4 μL ;
- elettrodi di tipo B (metodo EDC), 6 μL ;
- elettrodi di tipo B₀ (bianco di reazione per il metodo EDC), 6 μL .

Risultati e discussione

Investigazione elettrochimica degli elettrodi screen-printed modificati con Variamine blue

L'investigazione elettrochimica permette di valutare il comportamento degli elettrodi modificati con la VB. Sono stati valutati alcuni dei più importanti parametri:

- effetto catalitico verso il NADH;
- comportamento redox: reversibile, irreversibile o quasi-irreversibile;
- dipendenza dal pH;
- stabilità della risposta elettrochimica;
- meccanismo redox;

Studi preliminari

Studi elettrochimici preliminari, condotti sugli elettrodi screen-printed modificati con SWCNTs-COOH, indicano la presenza della coppia redox COO^-/COOH ($E^{\circ'}=205\text{ mV}$, $\Delta E=84\text{ mV}$), e che naturalmente, non si osserva sugli elettrodi modificati con SWCNTs non ossidati (Figura C.10.).

Per gli elettrodi A, A₀, B e B₀ si osserva un processo di attivazione elettrochimica (Figura C.11., C.12., C.13., e C.14., rispettivamente), del gruppo amminico terminale (picco “b”), con la formazione della coppia redox reversibile $\text{VB}_{\text{oss.}}/\text{VB}_{\text{rid.}}$ (picco “a”, Equazione C.0.0.). Il fenomeno è comune a tutti e quattro i tipi di elettrodi. Questo tipo di comportamento non deriva da processi secondari di elettropolimerizzazione del mediatore, specialmente del mediatore adsorbito. Da studi condotti in voltammetria ciclica, si è visto che

la VB è adatta ad essere elettropolimerizzata (Figura C.15.), ma con conseguenze drammatiche sulle sue proprietà elettrochimiche, in quanto subisce un fenomeno di inattivazione. Dopo la polimerizzazione, sempre da studi voltammetrici, non si osserva la presenza della coppia redox reversibile, caratteristica degli elettrodi A, A₀, B e B₀ (Figura C.16.).

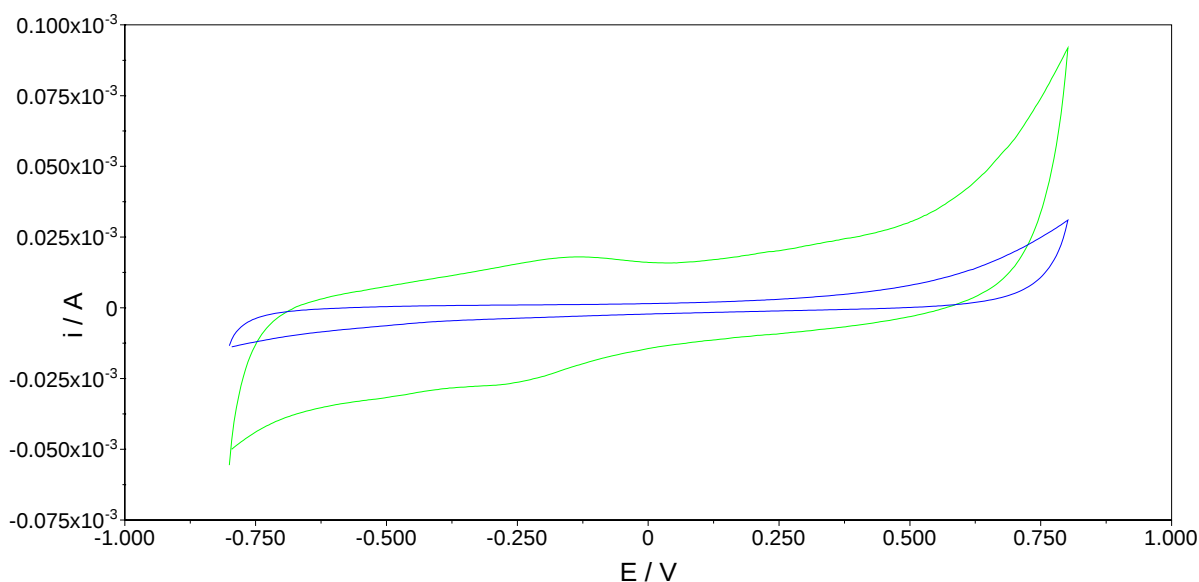
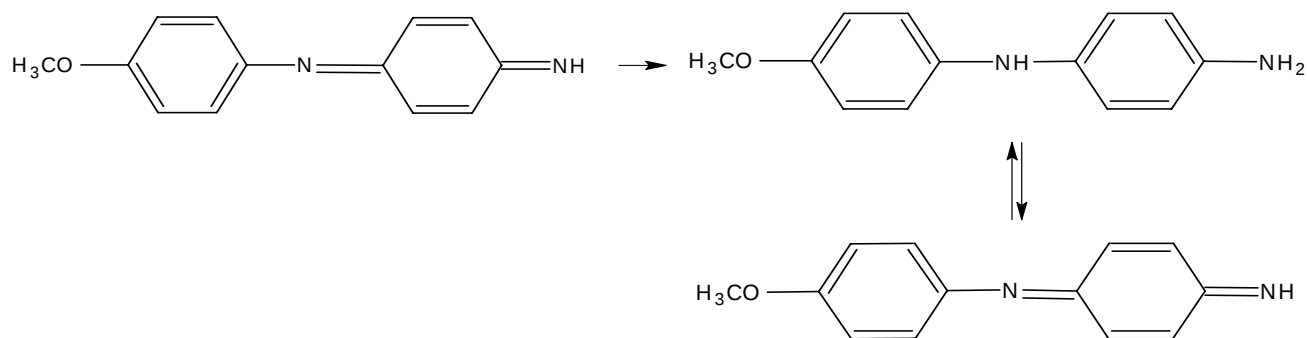


Figura C.10. Voltammetria ciclica in tampone Britton-Robinson, 0.1 M, pH 7.0, 50 mV/s; SPE modificato con SWCNT-COOH (verde) e SPE modificato con SWCNT (blu).



Equazione C.0.0. Schema di attivazione della coppia redox VB_{oss.}/VB_{rid.}.

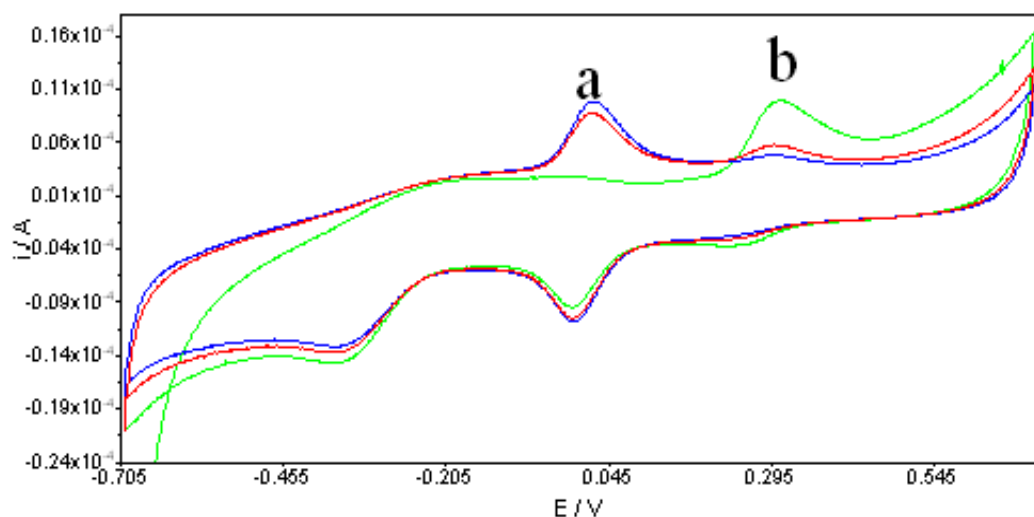


Figura C.11. Elettrodo A: voltammetria ciclica in tampone fosfato, 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0, 50 mV/s; prima scansione (verde), seconda scansione (rosso), terza scansione (blu); **a**-coppia redox $VB_{oss.}/VB_{rid.}$; **b**- $VB_{rid.}$.

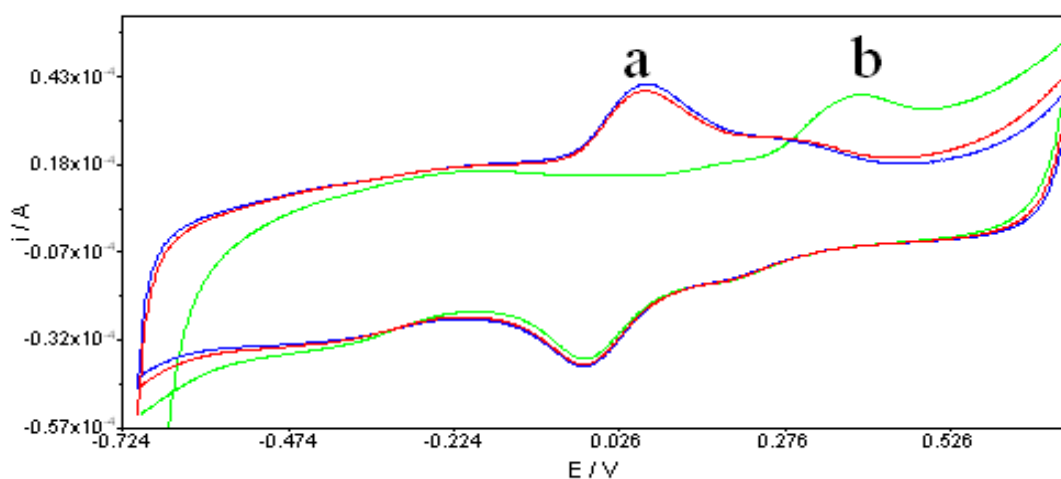


Figura C.12. Elettrodo A₀: voltammetria ciclica in tampone fosfato, 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0, 50 mV/s; prima scansione (verde), seconda scansione (rosso), terza scansione (blu); **a**-coppia redox $VB_{oss.}/VB_{rid.}$; **b**- $VB_{rid.}$.

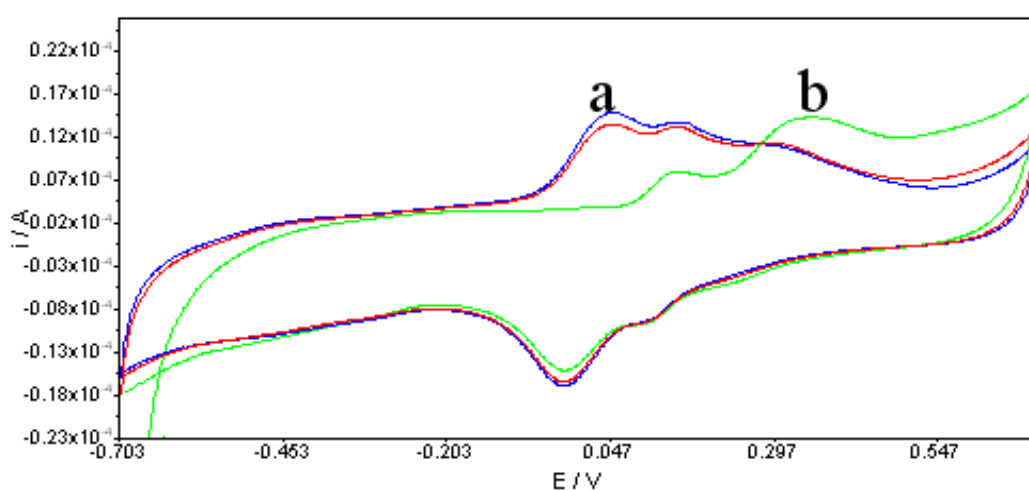


Figura C.13. Elettrodo B: voltammetria ciclica in tampone fosfato, 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0, 50 mV/s; prima scansione (verde), seconda scansione (rosso), terza scansione (blu); **a**-coppia redox $VB_{oss.}/VB_{rid.}$; **b**- $VB_{rid.}$.

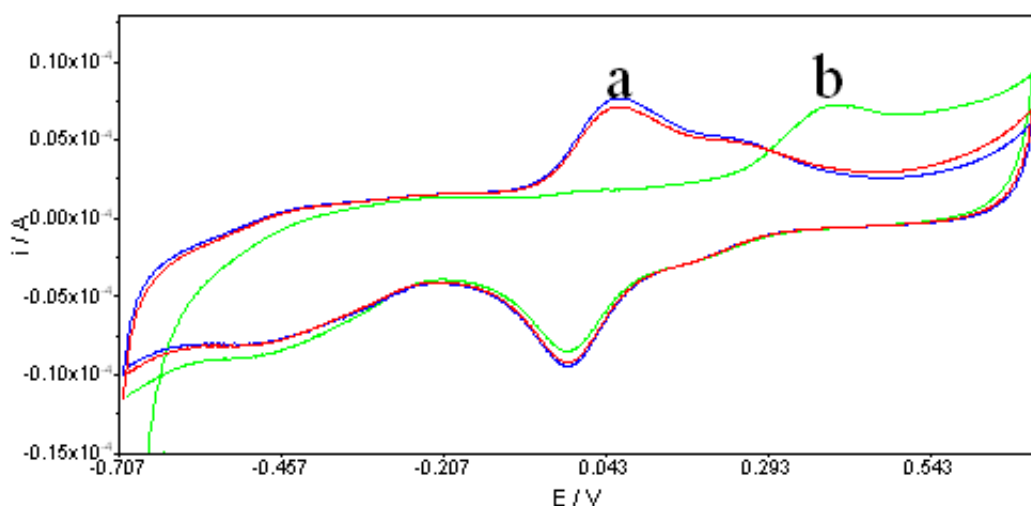


Figura C.14. Elettrodo B₀: voltammetria ciclica in tampone fosfato, 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0, 50 mV/s; prima scansione (verde), seconda scansione (rosso), terza scansione (blu); **a**-coppia redox VB_{oss}/VB_{rid}; **b**-VB_{rid}.

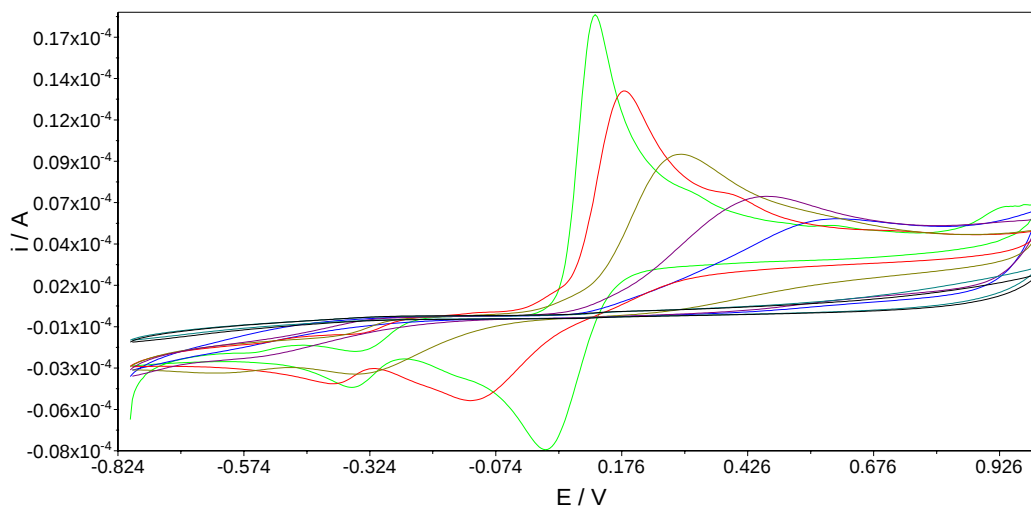


Figura C.15. Elettropolimerizzazione della Variamine blue in tampone Britton-Robinson, 0.1 M, pH 7.0, 25 mV/s, condotta ad un elettrodo *screen-printed*; I scansione (verde); II scansione (rosso), III scansione (marrone); IV scansione (viola); V scansione (blu), XXIV scansione (celestino); XXXIII scansione (nero).

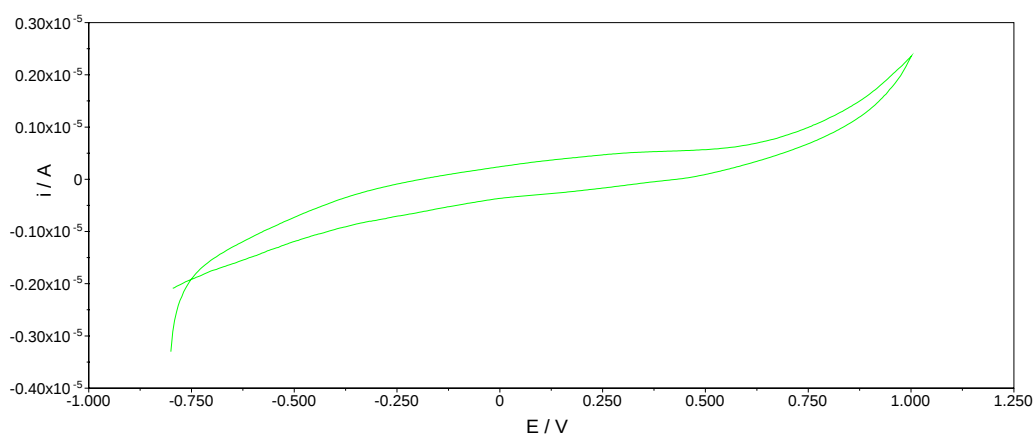


Figura C.16. Voltammetria ciclica dell'elettrodo con la VB elettropolimerizzata; tampone Britton-Robinson, 0.1 M, pH 7.0, 100 mV/s.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi di tipo A

Una coppia redox in cui la specie ossidata e ridotta scambiano rapidamente elettroni con l'elettrodo è considerata una coppia elettrochimica reversibile. Tale coppia redox viene identificata tramite studi di voltammetria ciclica, calcolando la differenza tra il picco catodico e anodico, secondo l'Equazione C. 0:

$$\Delta E_p = E_{p_a} - E_{p_c} = \frac{0.059}{n}$$

Equazione C.0.

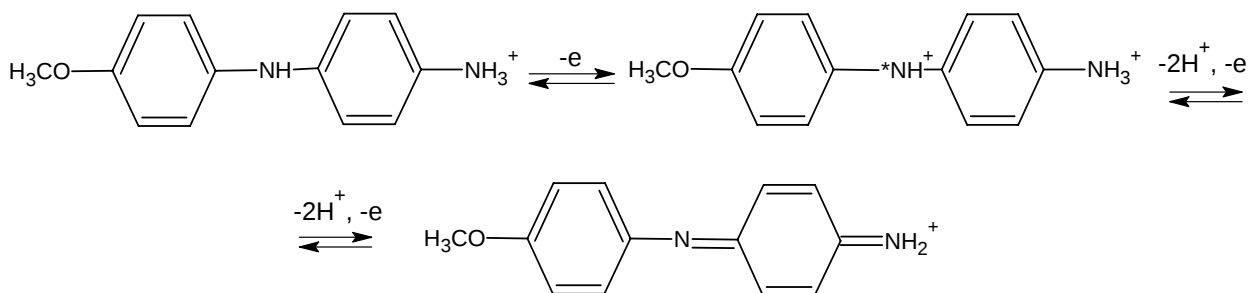
dove: ΔE_p = separazione dei picchi, V;

E_{p_a} = potenziale di picco anodico, V;

E_{p_c} = potenziale di picco catodico, V;

n = numero di elettroni scambiati.

La separazione dei picchi, per la principale coppia redox investigata è stata di 53 mV, nell'intervallo di velocità di scansione compreso fra 10 e 100 mV/s. Ne risulta che $n=1$. La Commissione sulle Reazioni Analitiche e Reagenti¹⁴³ (Commission on Analytical Reactions and Reagents, IUPAC) ha indicato per la *Variamine blue* un processo sequenziale a due elettroni, e due protoni, come illustrato nella Equazione C.1.:



Equazione C.1.

Quindi si potrebbe ipotizzare un processo di trasferimento elettronico in cui i due elettroni vengono scambiati all'elettrodo con velocità nettamente diverse. Si è visto che per velocità di scansione inferiori a 10 mV/s e fino a 2 mV/s, la separazione di picco è diventata 29 mV, indicando chiaramente un processo di trasferimento a due elettroni.

Laviron¹⁴⁴ ha sviluppato un metodo di calcolo per determinare il valore del coefficiente di trasferimento di carica elettrica (α) ed il valore della costante di velocità di trasferimento di carica apparente (k_s , s⁻¹). Il coefficiente α rappresenta la frazione di energia

elettrica applicata dall'esterno, tramite l'elettrodo, per diminuire il valore della barriera di energia libera di attivazione per la reazione diretta. La costante di velocità k_s è una misura del grado con cui il mediatore viene riossidato all'elettrodo (Equazione C.2.).



Equazione C.2.

Come indicato da Laviron, la separazione di picco ha valori vicino a zero, quando la velocità di trasferimento elettronico è maggiore della velocità di scansione, e cresce quando questa condizione non è più soddisfatta (Grafico C.1.).

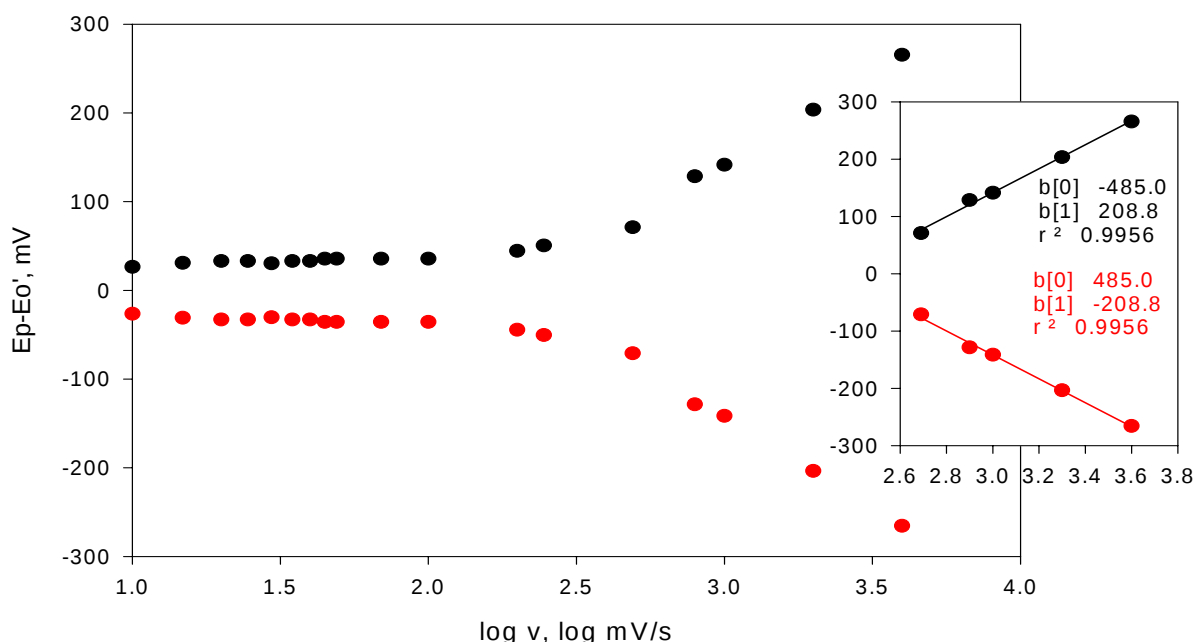
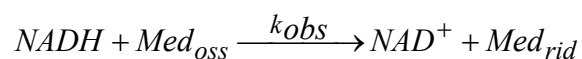


Grafico C.1. Separazione di picco in funzione della di log v; elettrodo A, pH 7.0, 0.1 M Britton-Robinson.

Per velocità superiori a 500 mV/s, la separazione di picco ($E_p - E^{o'}$) è stata proporzionale al logaritmo della velocità di scansione, così come descritto da Laviron. I valori calcolati di α e k_s sono: 0.6 e 0.8 s^{-1} , rispettivamente. I valori ottenuti sono in buona correlazione con valori teorici calcolati per sistemi reversibili ($\alpha=0.5$, $k_s=0.1-1 \text{ s}^{-1}$). Chiaramente il valore calcolato di α e k_s corrisponde al processo elettronico rapido; se il valore del coefficiente di trasferimento di carica elettrica venisse calcolato per un processo bi-elettronico, il valore sarebbe 0.3, situato al margine inferiore dell'intervallo di 0.3-0.7.

La costante catalitica di secondo ordine (k_{obs} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) misura il grado di interazione fra il mediatore ed il NADH:



Equazione C.3.

Secondo l'equazione C.4.:

$$I_{cat} / I_L = \pi^{1/2} (k_{obs} C_o t)^{1/2}$$

Equazione C.4.

dove: I_{cat} = corrente catalitica, A;

I_L = corrente limite, A;

k_{obs} = costante catalitica di secondo ordine, $M^{-1}s^{-1}$;

C_o = concentrazione, M;

t = tempo, s.

il valore della k_{obs} , in presenza di 5 mM NADH, pH 7.0, è stato $13850 M^{-1}s^{-1}$.

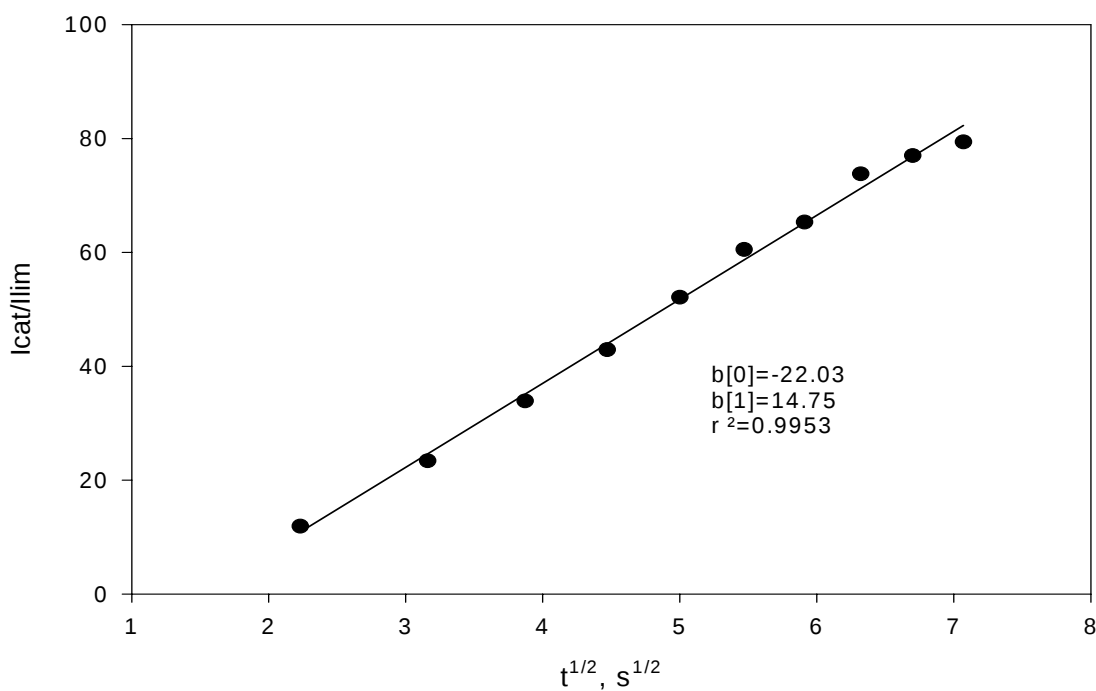


Grafico C.2. Illustrazione grafica dell'equazione C.4.

Valori della k_{obs} , dello stesso ordine di grandezza, sono stati trovati da Gorton¹⁴⁵ per il Meldola blu.

Il numero di protoni scambiati dalla Variamine blue è stato calcolato secondo l'equazione C.5., rappresentata graficamente (Grafico C.3.):

$$E_p = E^o - \frac{2.3RTm}{nF} pH$$

Equazione C.5.

dove: E_p = potenziale di picco, V;
 E^0 = potenziale formale redox, V;
 R : costante universale dei gas (8.314 J/mol K)
 T : temperatura (K);
 m : numero degli protoni scambiati;
 n : numero degli elettroni trasferiti;
 F : costante di Farady (96485 C/mol).

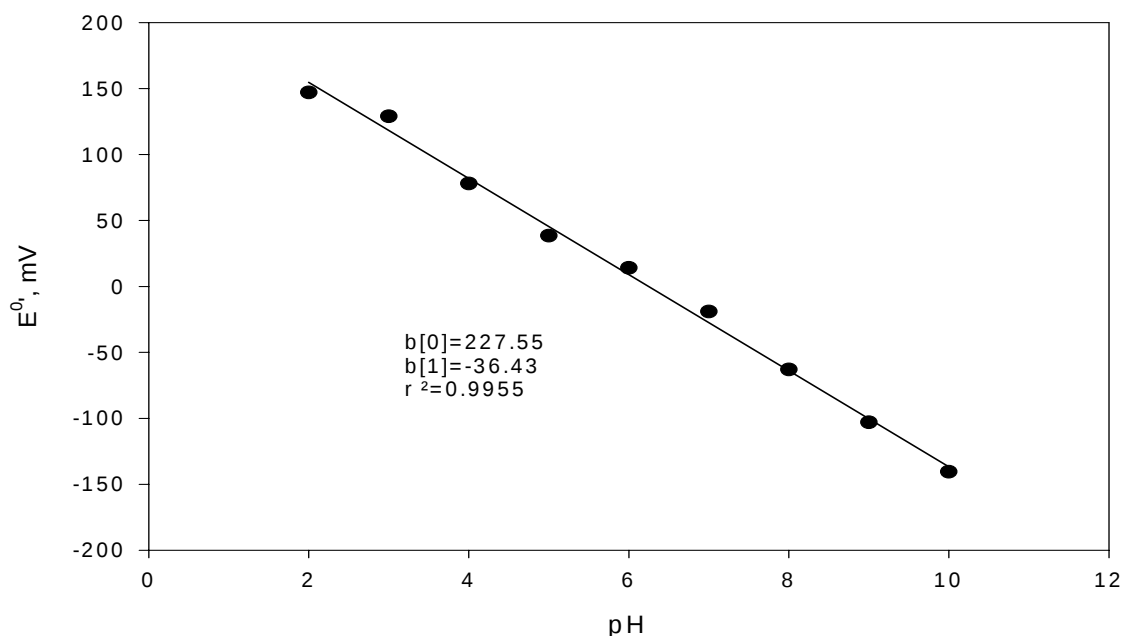


Grafico C.3. Variazione del potenziale formale redox in funzione del pH; soluzioni tampone Britton-Robinson, 0.1 M.

Nell'intervallo di pH 2.0-10.0, il valore calcolato della pendenza ha indicato $m=1$. Lo scambio di un solo protone è coerente con gli elettrodi di tipo A.

Il Grafico C.4. indica una correlazione lineare tra la corrente di picco anodica e catodica con la radice quadrata della velocità di scansione (sino a 100 mV/s), fenomeno caratteristico per processi di diffusione controllata all'elettrodo. Poiché l'analisi FT-IR indica chiaramente la presenza delle tre bande ammidiche, il processo di diffusione controllata che si manifesta può essere attribuito alla diffusione dell'elettrolita di supporto attraverso l'interfaccia elettrodo|soluzione durante il processo redox, per mantenere l'elettroneutralità.¹⁴⁶ Il fenomeno di diffusione controllata potrebbe essere anche attribuito al comportamento delle molecole di VB, che comunque sono presenti come specie adsorbite sullo scheletro dei nanotubi.

La correlazione lineare tra la corrente di picco e la velocità di scansione (Grafico C.5.) è caratteristica per coppie redox situate sulla superficie elettrodica. Per le correnti anodiche, la linearità si manifesta fino a 500 mV/s, mentre per le correnti catodiche la linearità è aumentata fino a 2000 mV/s.

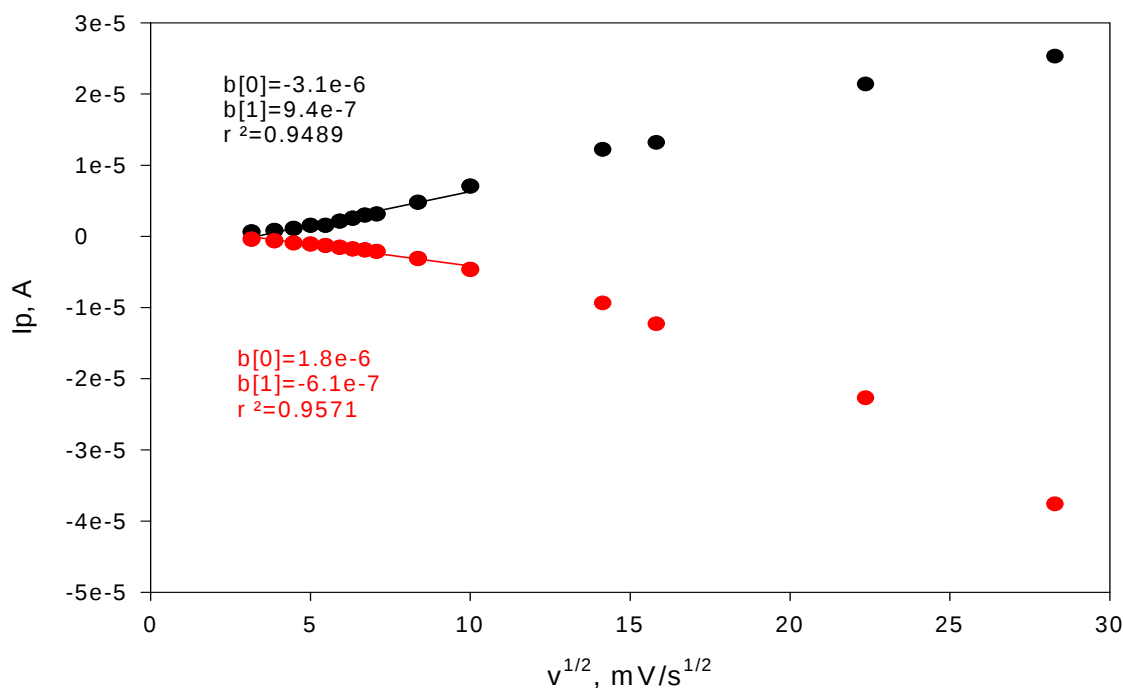


Grafico C.4. Corrente di picco in funzione della radice quadrata della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

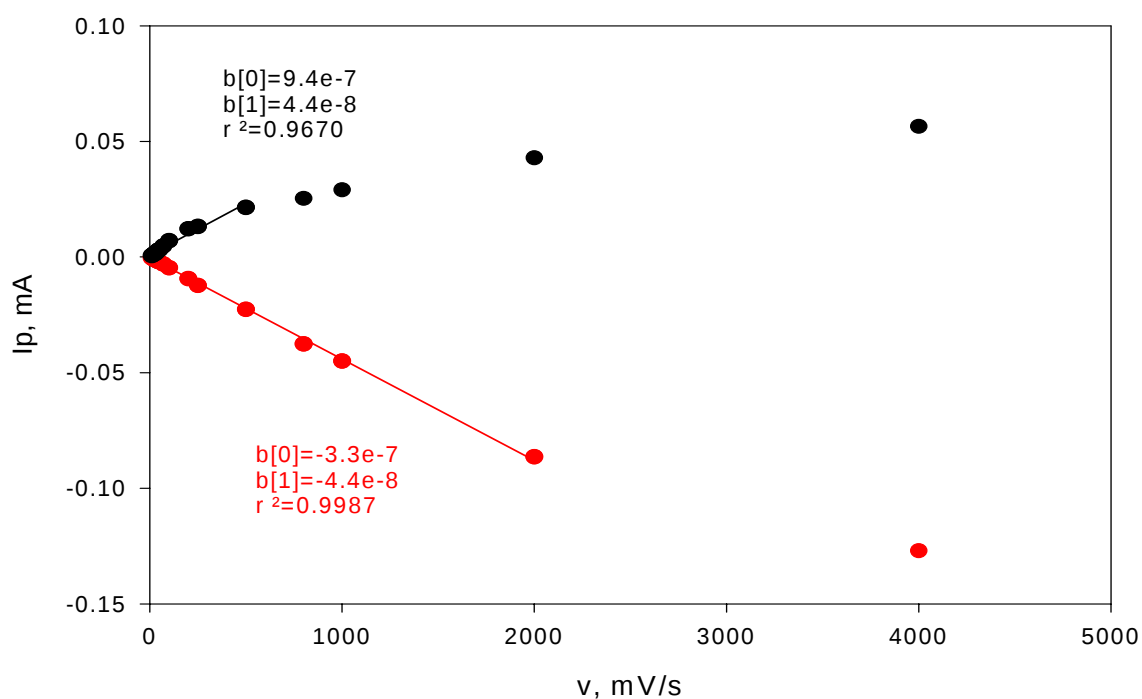


Grafico C.5. Corrente di picco in funzione della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi di tipo A_0

La separazione dei picchi, per la principale coppia redox investigata è stata di 56 mV, nell'intervallo di velocità di scansione compreso fra 50 e 250 mV/s. Ne risulta che $n=1$. Si è visto che per velocità di scansione inferiori a 10 mV/s e fino a 2 mV/s, la separazione di picco è diventata 26 mV, indicando chiaramente un processo di trasferimento a due elettroni.

Come indicato dal metodo di Laviron, il coefficiente α e la k_s vengono calcolati dal Grafico C.6. I valori di α e k_s sono: 0.3 e 0.9 s^{-1} . Chiaramente il valore calcolato di α e k_s corrisponde al processo mono-elettronico rapido; se il valore del coefficiente di trasferimento di carica elettrica venisse calcolato per un processo bi-elettronico, il valore sarebbe 0.15, inferiore al valore minimo dell'intervallo di 0.3-0.7.

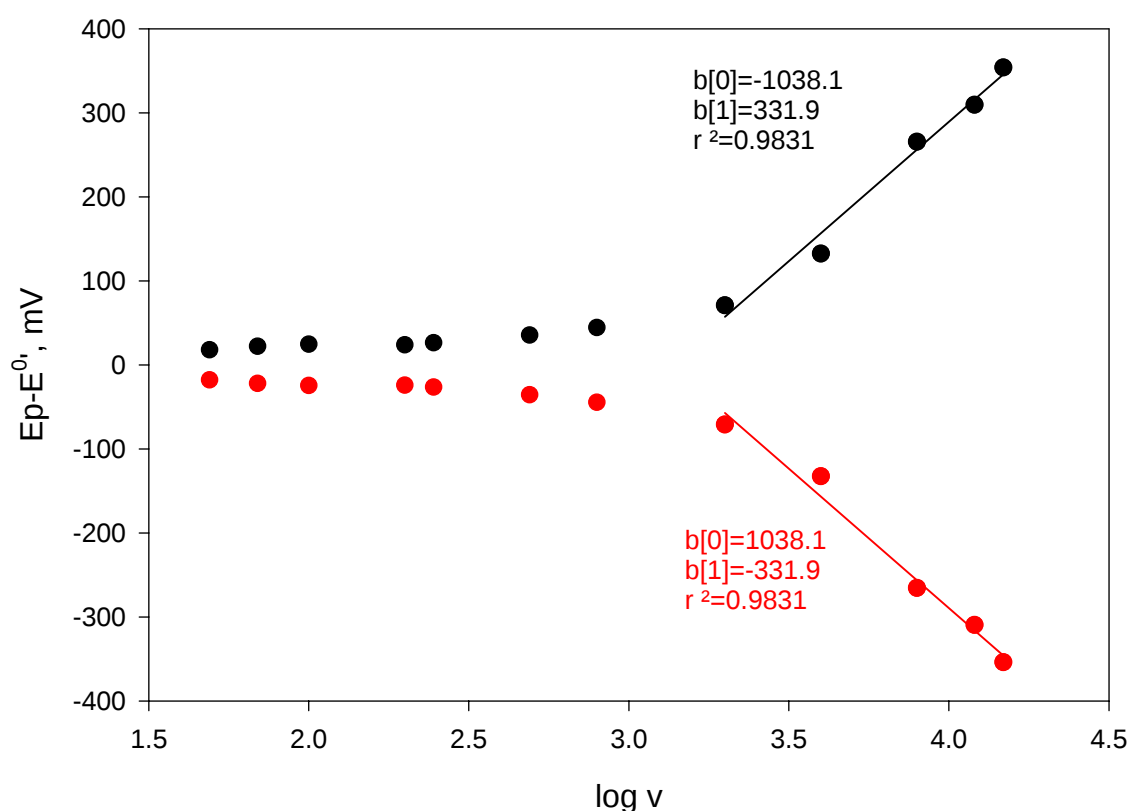


Grafico C.6. Separazione di picco in funzione della di $\log v$; elettrodo A_0 , pH 7.0, 0.1 M Britton-Robinson.

Il valore della k_{obs} , in presenza di 5 mM NADH, pH 7.0, è stato $15000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Grafico C.7.). Il valore è simile agli elettrodi di tipo A, in quanto, generalmente, un mediatore reagisce in modo analogo sia se è adsorbito o legato covalentemente, a condizione che non sia alterata profondamente la sua struttura chimica.

Dal Grafico C.8. si osserva che gli elettrodi di tipo A_0 hanno un comportamento diverso dagli omologhi di tipo A, in quanto il potenziale formale redox in funzione del pH rimane pressoché costante nell'intervallo di pH 2.0-10.0. Sull'intero *range* di pH studiato (2.0-13.0) l' E^0 in funzione del pH descrive una curva sigmoideale, con il punto di flesso a pH 11.0. Il Grafico C.9. indica una correlazione lineare tra la corrente di picco anodica e catodica con la radice quadrata della velocità di scansione (sino a 800 mV/s), fenomeno caratteristico per processi di diffusione controllata all'elettrodo. A differenza degli elettrodi di tipo A, la linearità è estesa di circa 8 volte. Il processo di diffusione controllata può essere attribuito al comportamento delle molecole di VB adsorbite.

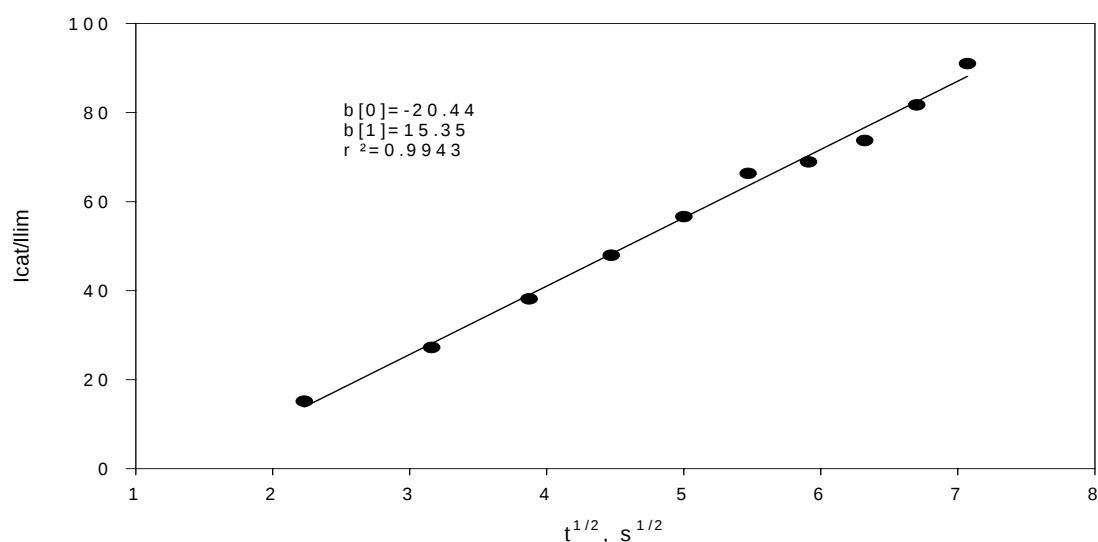


Grafico C.7. Illustrazione grafica dell'equazione C.4 per gli elettrodi di tipo A_0 .

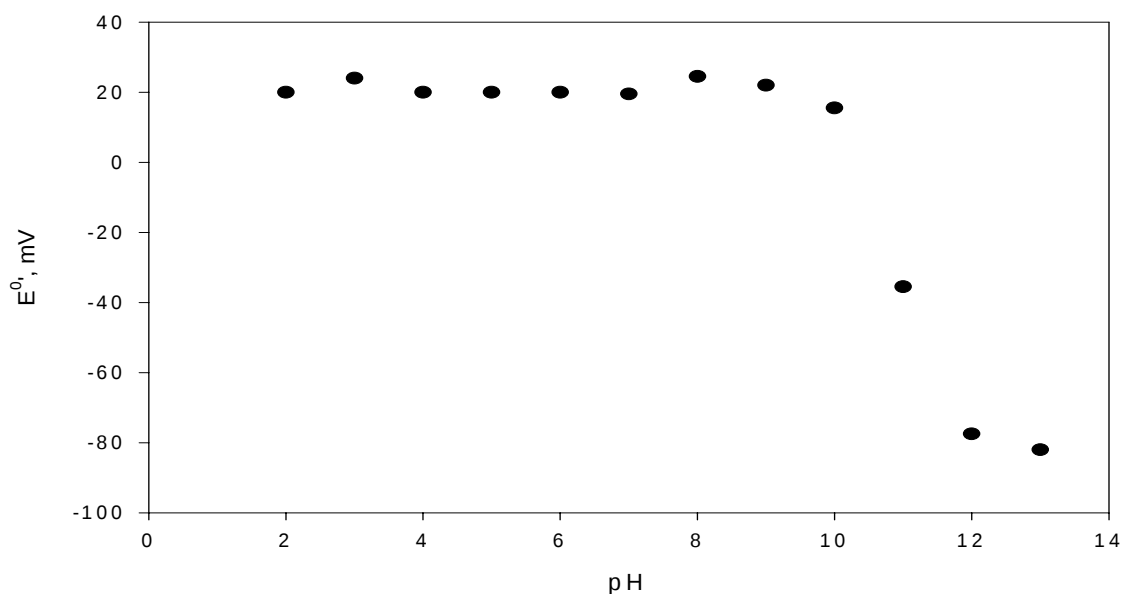


Grafico C.8. Variazione del potenziale formale redox in funzione del pH; soluzioni tampone Britton-Robinson, 0.1 M.

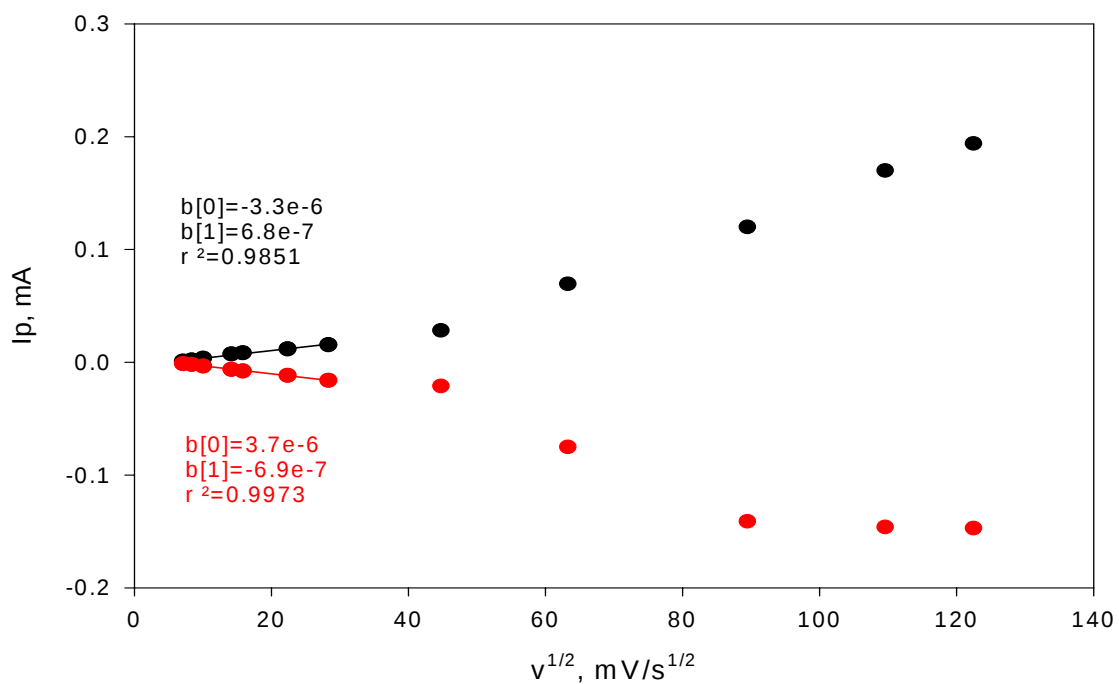


Grafico C.9. Corrente di picco in funzione della radice quadrata della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

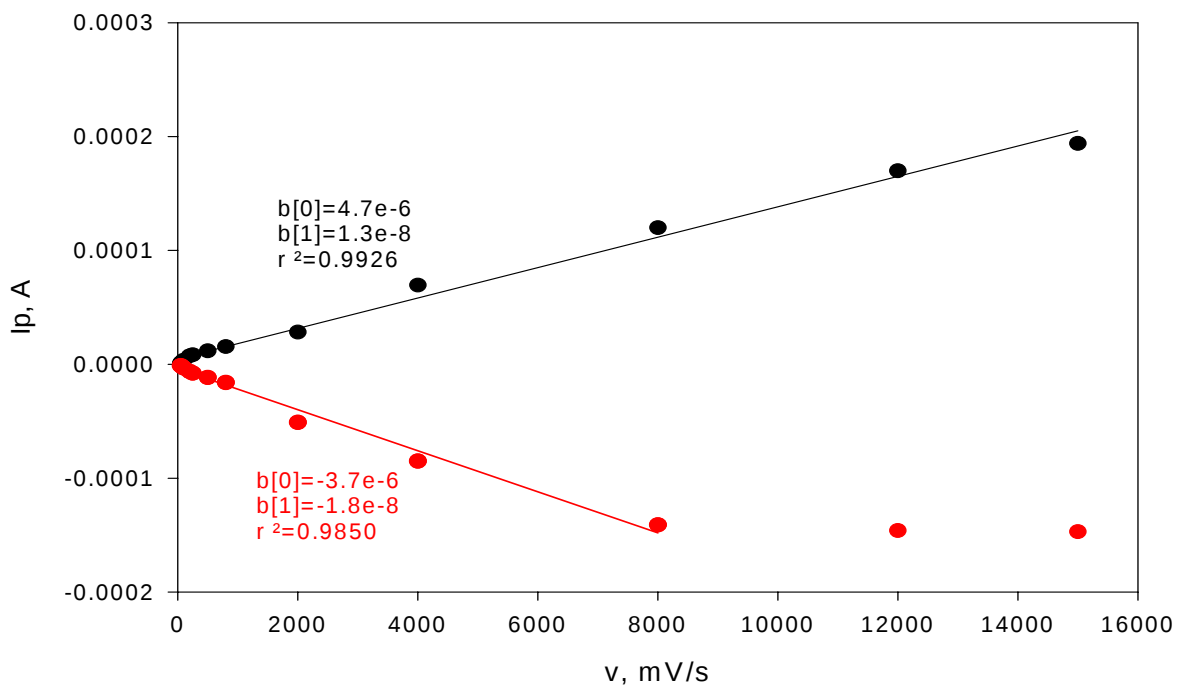


Grafico C.10. Corrente di picco in funzione della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

La correlazione lineare tra la corrente di picco e la velocità di scansione (Grafico C.10.) è caratteristica per coppie redox situate sulla superficie elettrodica. Per le correnti

anodiche, la linearità si manifesta fino a 15000 mV/s, maggiore di quella degli elettrodi A, mentre per le correnti catodiche la linearità si manifesta fino a 8000 mV/s.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi di tipo B

La separazione di picco, per la principale coppia redox investigata è di 57.2 mV, nell'intervallo di velocità di scansione compreso fra 10 e 250 mV/s. Ne risulta che $n=1$. Si è visto che per velocità di scansione inferiori a 10 mV/s e fino a 2 mV/s, la separazione di picco diventa 35 mV, indicando un processo di trasferimento a due elettroni, similmente al comportamento degli elettrodi di tipo A e A₀.

Come è stato indicato dal metodo di Laviron, il coefficiente α e la k_s vengono calcolati dal Grafico C.11. I valori di α e k_s sono: 0.53 e 1.1 s^{-1} . Chiaramente il valore calcolato di α e k_s corrisponde al processo mono-elettronico rapido; se il valore del coefficiente di trasferimento di carica elettrica venisse calcolato per un processo bi-elettronico, il valore sarebbe 0.3, situato al limite dell'intervallo compreso tra 0.3-0.7.

Il valore della k_{obs} , in presenza di 5 mM NADH, pH 7.0, è stato $3825 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Grafico C.12.). La k_{obs} è quasi 4 volte inferiore della costante catalitica di secondo ordine osservata agli elettrodi di tipo A e A₀. Questa differenza viene attribuita essenzialmente alle condizioni di reazione diverse tra i due metodi utilizzati.

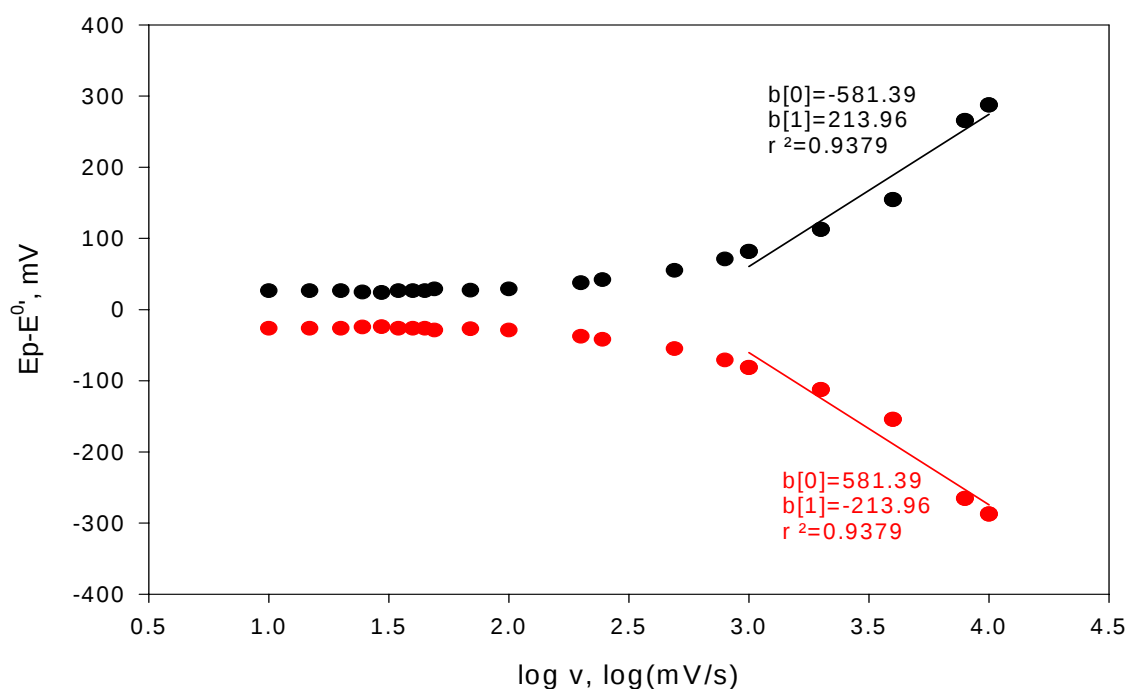


Grafico C.11. Separazione di picco in funzione della di log v; elettrodo B, pH 7.0, 0.1 M Britton-Robinson.

Il numero di protoni scambiati dalla Variamine blue è stato calcolato secondo l'equazione C.5. Il Grafico C.13. ha indicato, nell'intervallo di pH 2.0-9.0, che $m=1.1$. Lo scambio di un solo protone implica che gli elettrodi di tipo B hanno un comportamento simile agli elettrodi di tipo A, e presuppone che la reazione di derivatizzazione sia avvenuta anche in questo caso, anche se è una prova indiretta.

Il Grafico C.14. indica la correlazione lineare tra la corrente di picco anodica e catodica con la radice quadrata della velocità di scansione (nell'intervallo 10-8000 mV/s), fenomeno caratteristico per processi di diffusione controllata all'elettrodo. L'analisi FT-IR ha indicato la possibile presenza della seconda banda ammidica (1587 cm^{-1}), che se correlata con i dati ottenuti dalla curva $E^{\circ'}\sim\text{pH}$, dimostra che gli elettrodi di tipo B hanno un comportamento simile agli elettrodi di tipo A.

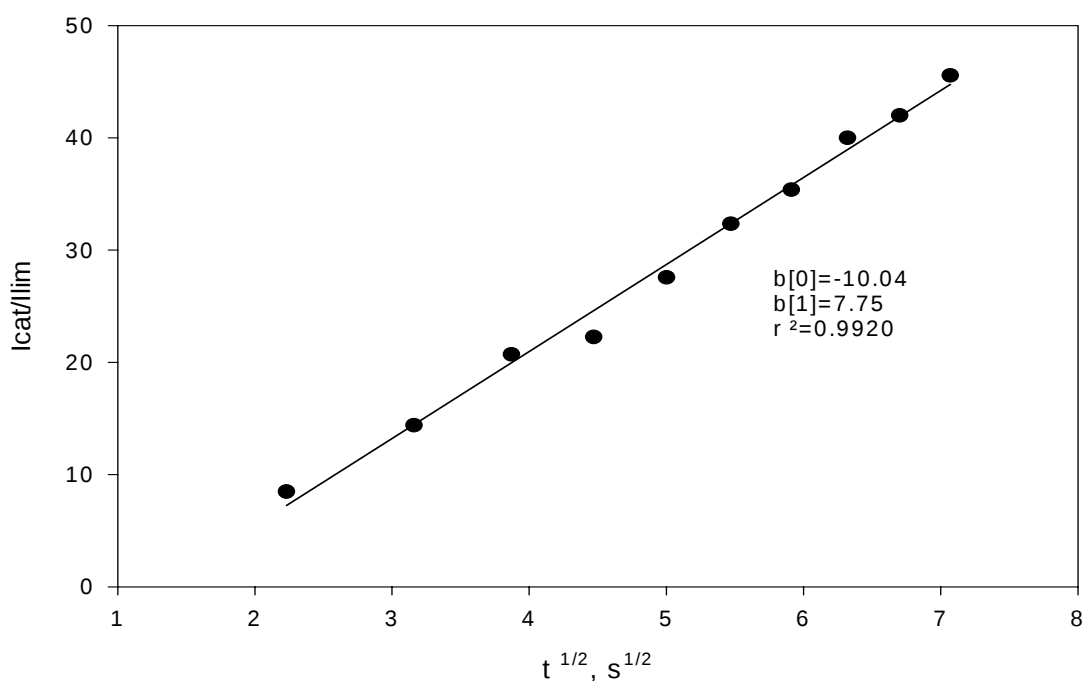


Grafico C.12. Illustrazione grafica dell'equazione C.4.

Quindi il processo di diffusione controllata che si manifesta potrebbe essere attribuito alla diffusione dell'elettrolita di supporto attraverso l'interfaccia elettrodo|soluzione durante il processo redox, per mantenere l'elettroneutralità.¹⁴⁷ Inoltre, il fenomeno di diffusione controllata può essere anche attribuito al comportamento delle molecole di VB, che comunque sono presenti come specie adsorbite sullo scheletro dei nanotubi.

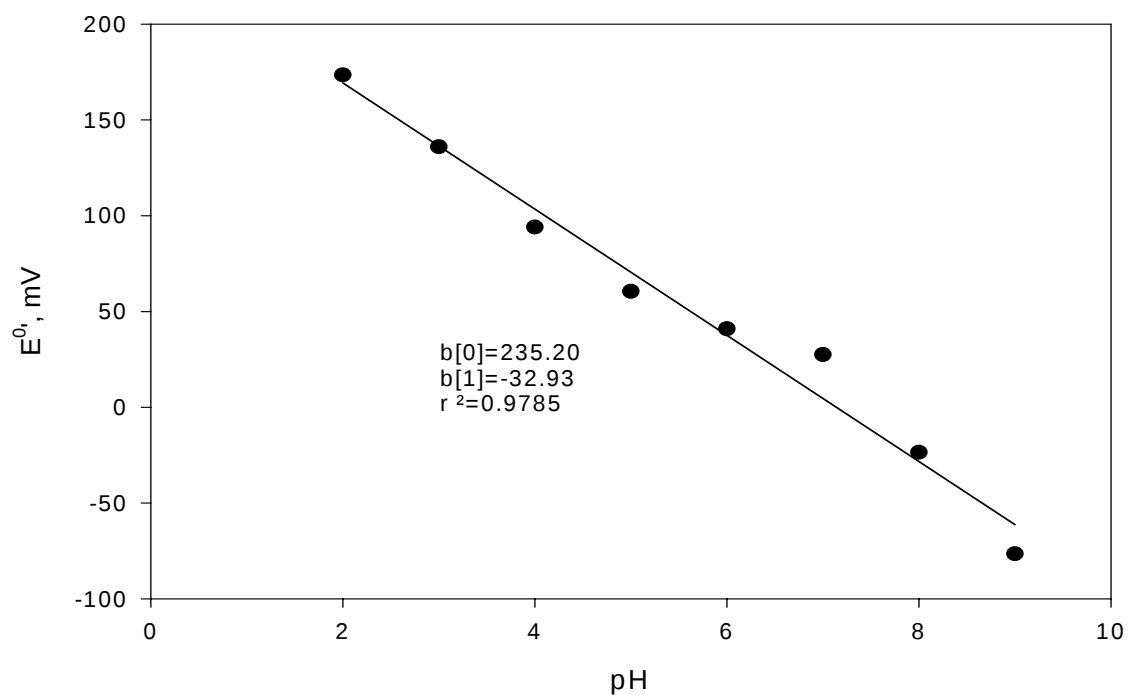


Grafico C.13. Variazione del potenziale formale redox in funzione del pH; soluzioni tampone Britton-Robinson, 0.1 M

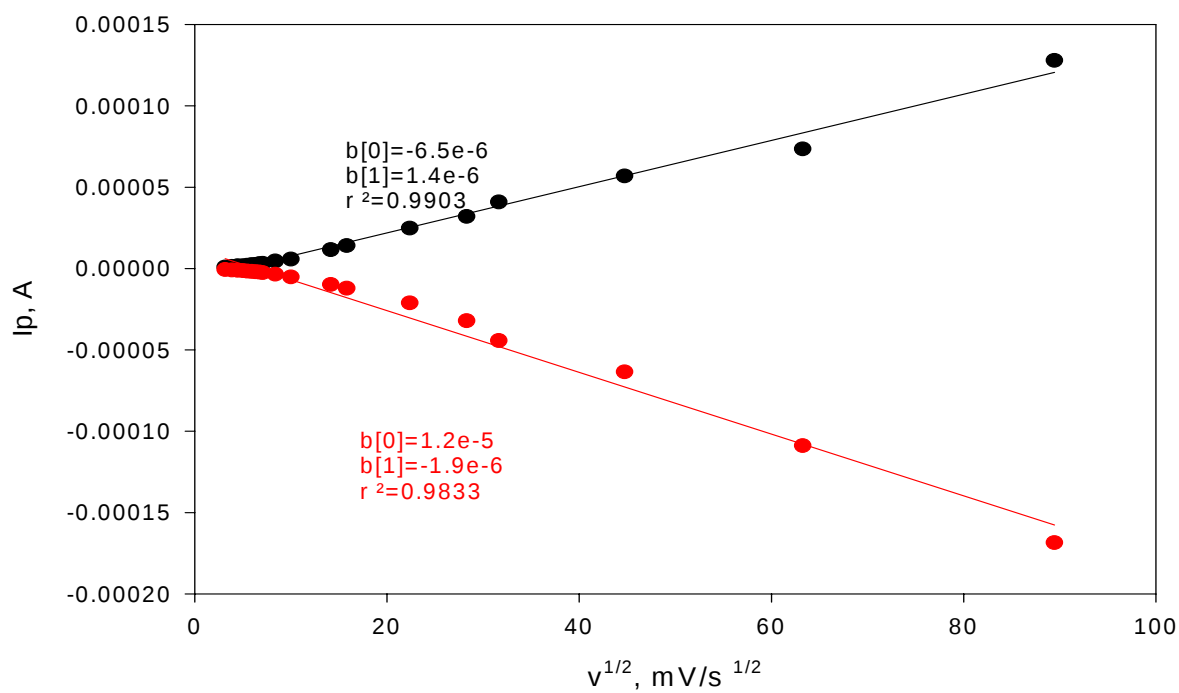


Grafico C.14. Corrente di picco in funzione della radice quadrata della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

La correlazione lineare tra la corrente di picco e la velocità di scansione (Grafico C.15.) è caratteristica per coppie redox situate sulla superficie elettrodica. Per le correnti anodiche e catodiche, la linearità si manifesta fino a 1000 mV/s, nell'intervallo 10-1000 mV/s.

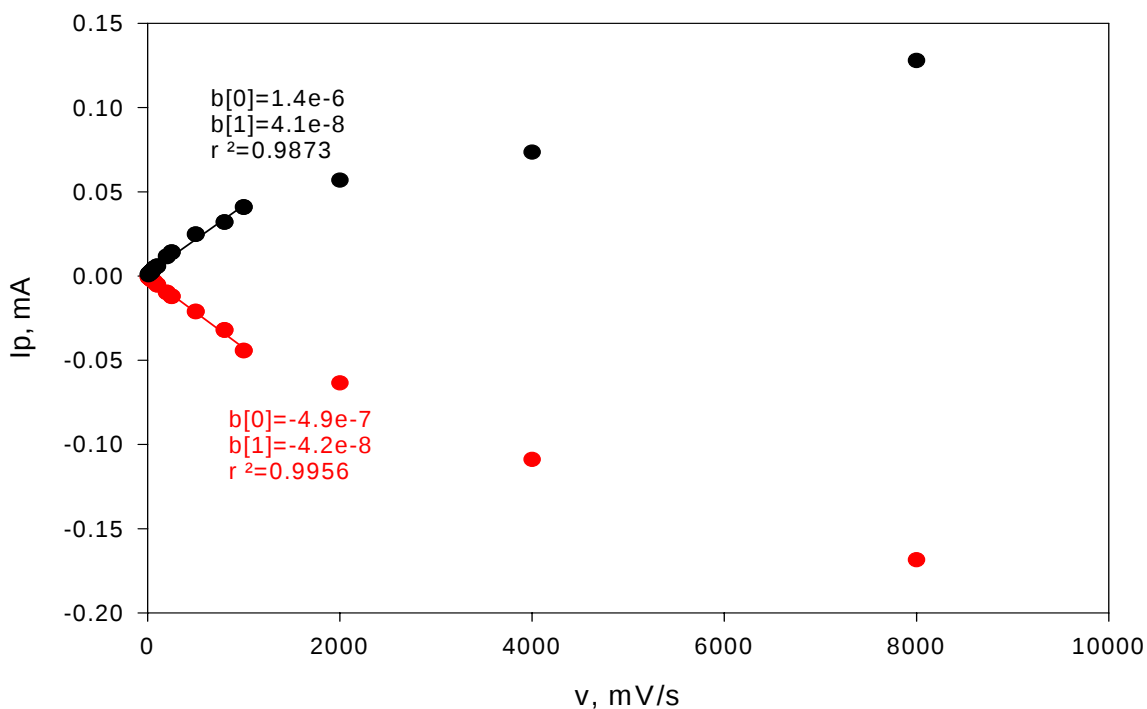


Grafico C.15. Corrente di picco in funzione della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

Investigazione elettrochimica degli elettrodi di tipo B₀

La separazione di picco, per la principale coppia redox investigata è stata di 64 mV, nell'intervallo di velocità di scansione compreso fra 10 e 250 mV/s. Ne risulta che $n=1$. Si è visto che per velocità di scansione inferiori a 10 mV/s e fino a 2 mV/s, la separazione di picco diventa 27 mV, indicando un processo di trasferimento bi-elettronico, similmente al comportamento degli elettrodi di tipo B, A e A₀.

Come indicato dal metodo di Laviron, il coefficiente α e la k_s vengono calcolati dal Grafico C.16. I valori di α e k_s sono: 0.45 e 1.1 s^{-1} . Chiaramente il valore calcolato di α e k_s corrisponde al processo mono-elettronico rapido; se il valore del coefficiente di trasferimento di carica elettrica venisse calcolato per un processo bi-elettronico, il valore sarebbe 0.25, situato sotto il limite inferiore dell'intervallo compreso tra 0.3-0.7.

Il valore della k_{obs} , in presenza di 5 mM NADH, pH 7.0, è stato $2952 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Grafico C.17.). Il valore è simile agli elettrodi di tipo B, in quanto, generalmente, un mediatore risponde in modo identico sia se è adsorbito o legato covalentemente, a condizione che non sia alterata la sua struttura chimica. Come per gli elettrodi di tipo B, il valore della k_{obs} degli elettrodi di tipo B_0 è inferiore di circa 4 volte rispetto agli elettrodi di tipo A e A_0 .

Dal Grafico C.18. si osserva che gli elettrodi di tipo B_0 hanno un comportamento diverso dagli omologhi di tipo B, in quanto il potenziale formale redox in funzione del pH rimane pressoché costante nell'intervallo di pH 2.0-10.0. Sull'intero *range* di pH studiato (2.0-13.0) l' $E^{\circ'}$ in funzione del pH descrive una curva sigmoideale, con il punto di flesso a pH 11.0. Questo comportamento è del tutto simile agli elettrodi di tipo A_0 .

Il Grafico C.19. indica una correlazione lineare tra la corrente di picco anodica e catodica con la radice quadrata della velocità di scansione (sino a 8000 mV/s), fenomeno caratteristico per processi di diffusione controllata all'elettrodo. A differenza degli elettrodi di tipo A e A_0 che hanno un comportamento diverso, la linearità è identica a quella degli elettrodi di tipo B. Il processo di diffusione controllata è attribuito al comportamento delle molecole di VB adsorbite.

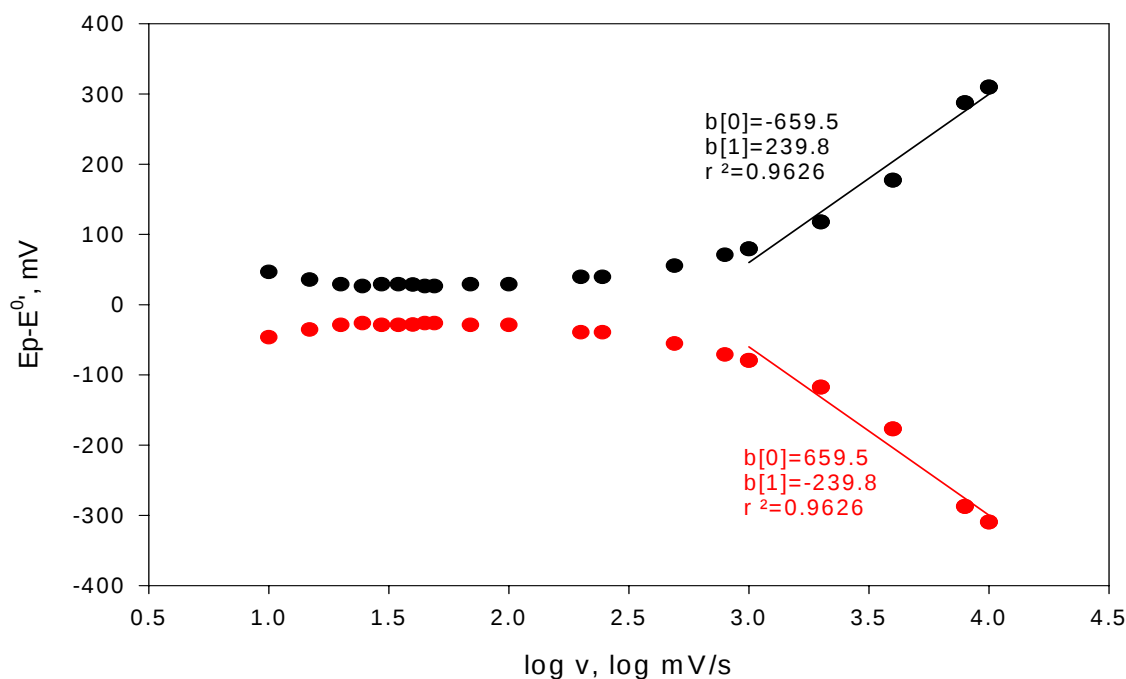


Grafico C.16. Separazione di picco in funzione della di log v; elettrodo A_0 , pH 7.0, 0.1 M Britton-Robinson.

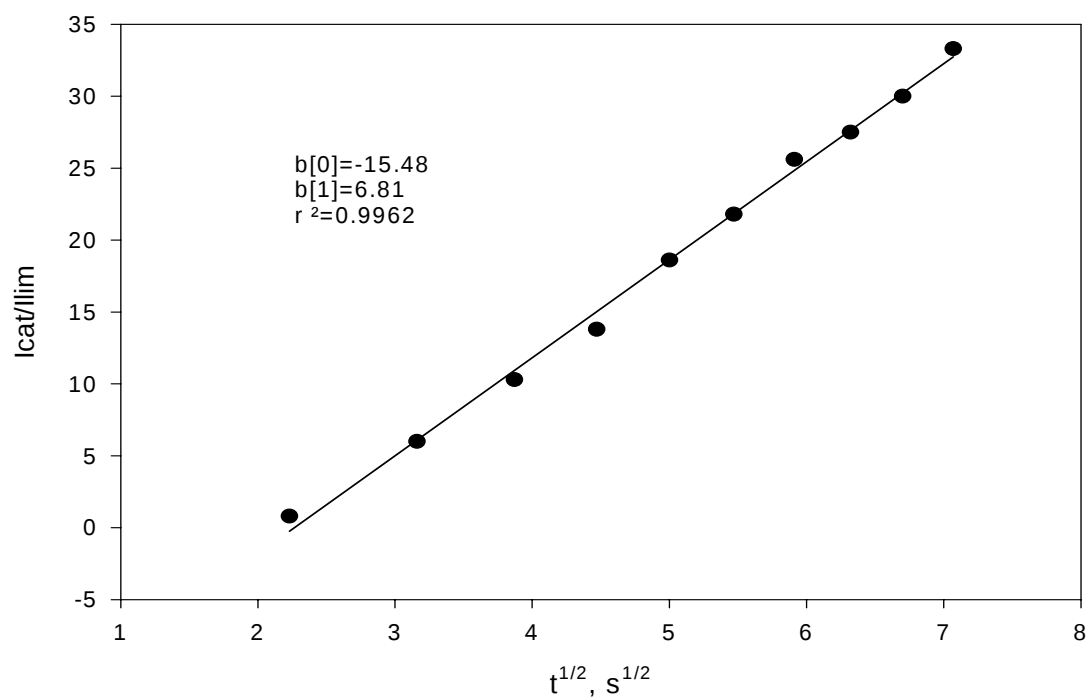


Grafico C.17. Illustrazione grafica dell'equazione C.4 per gli elettrodo di tipo B_0 .

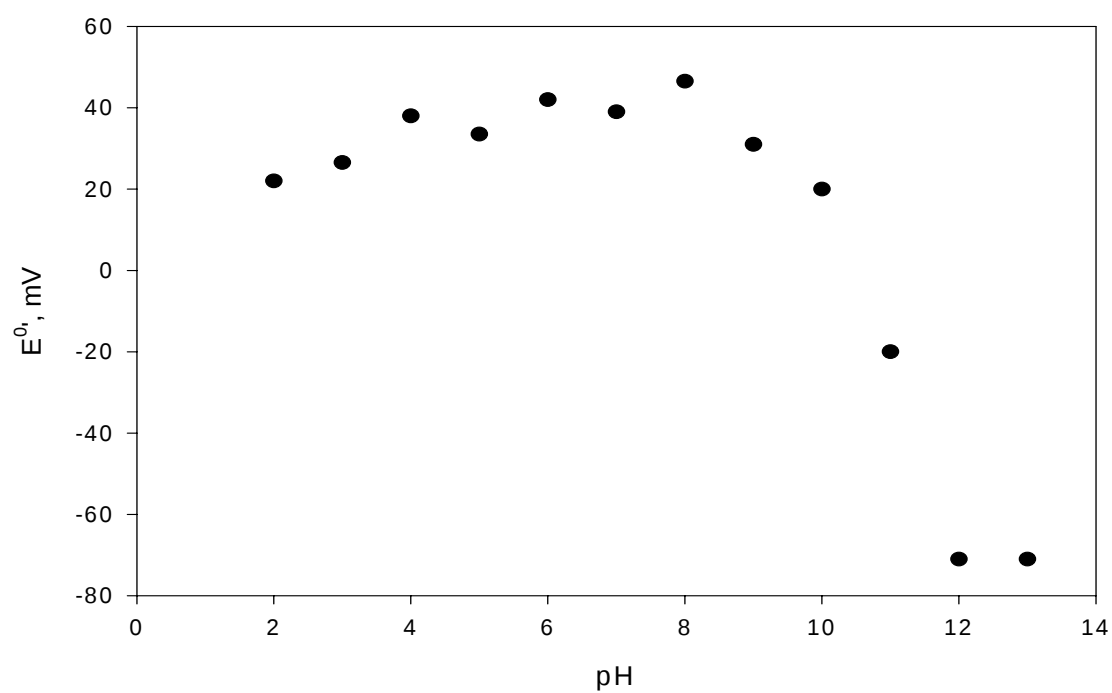


Grafico C.18. Variazione del potenziale formale redox in funzione del pH; soluzioni tampone Britton-Robinson, 0.1 M.

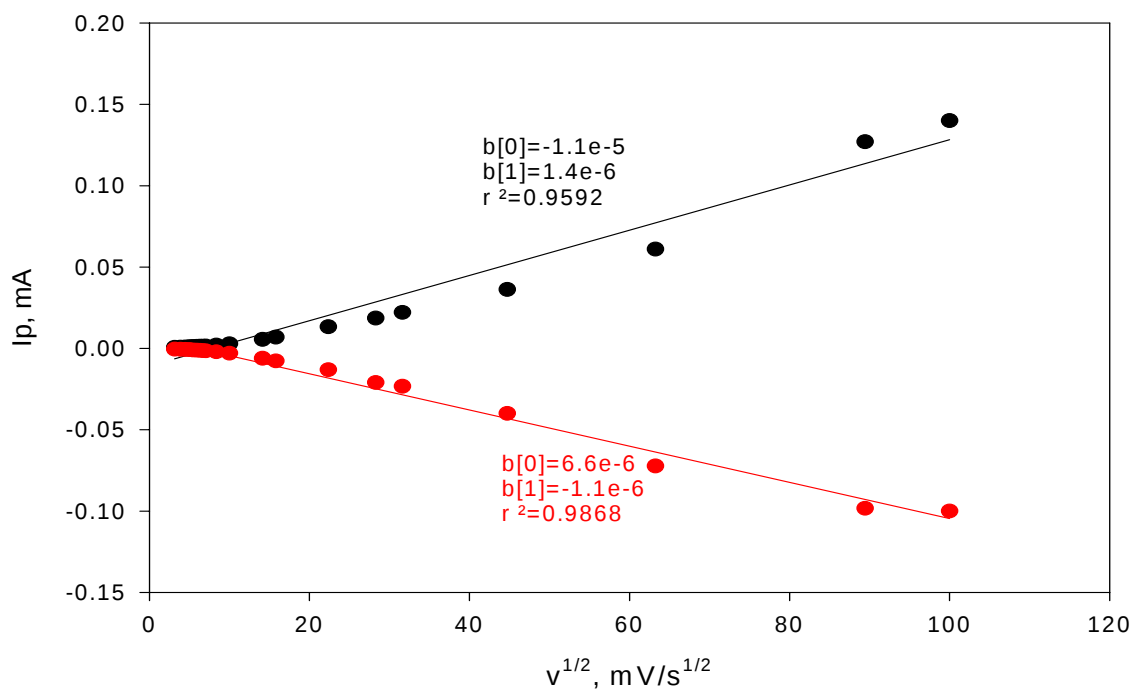


Grafico C.19. Corrente di picco in funzione della radice quadrata della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

La correlazione lineare tra la corrente di picco e la velocità di scansione (Grafico C.20.) è caratteristica per coppie redox situate sulla superficie elettrodica. Per le correnti anodiche e catodiche, la linearità si manifesta fino a 4000 mV/s.

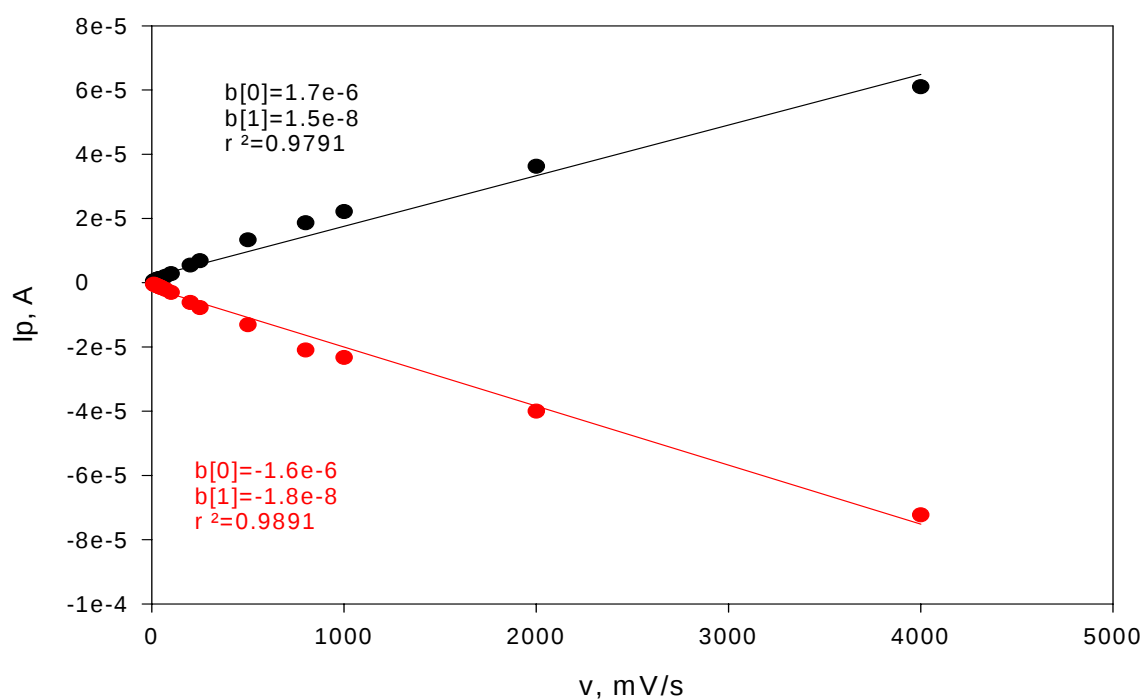


Grafico C.20. Corrente di picco in funzione della velocità di scansione; 0.1 M Britton-Robinson, pH 7.0.

Tabella C.2. Tabella riassuntiva per gli elettrodi di tipo A, A₀, B e B₀.

	Elettrodo B	Elettrodo B ₀	Elettrodo A	Elettrodo A ₀
n	2	2	2	2
ΔE _p , mV	57 (10-250 mV/s) 35 (10-2 mV/s)	64 (10-250 mV/s) 27 (10-2 mV/s)	53 (10-100 mV/s) 29 (10-2 mV/s)	56 (10-250 mV/s) 26 (10-2 mV/s)
α	0.5 (mono-elettronico) 0.3 (bi-elettronico)	0.5 (mono-elettronico) 0.25 (bi-elettronico)	0.6 (mono-elettronico) 0.3 (bi-elettronico)	0.3 (mono-elettronico) 0.15 (bi-elettronico)
k _{cat} , M ⁻¹ s ⁻¹ (5mM NADH)	3825	2952	13850	15000
H ⁺	1 (pH: 2.0-9.0)	-	1 (pH: 2.0-10.0)	-
k, s ⁻¹	1.1	1.1	0.8	0.9

Elettrodi screen-printed modificati con Variamine blue: sensori per il NADH

Gli elettrodi modificati con la Variamine blue sono stati testati in voltammetria ciclica (Figure C.17., C.18., C.19, C.20.) per accertarne l'effetto catalitico verso l'ossidazione del NADH. Si osserva che il processo di ossidazione del NADH avviene a bassi potenziali anodici (<50 mV vs. l'elettrodo di pseudoriferimento di Ag|AgCl, pH 7.0), ed è comune a tutti e quattro i tipi di elettrodi.

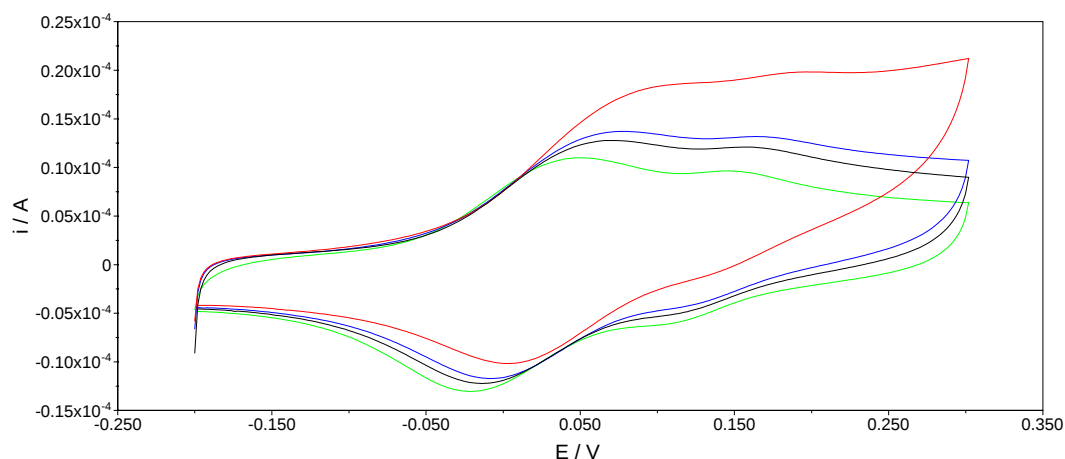


Figura C.17. Elettrodo B: tampone fosfato 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0 (verde), 0.5 mM NADH (nero), 1 mM NADH (blu), 5mM NADH (rosso); 50 mV/s;

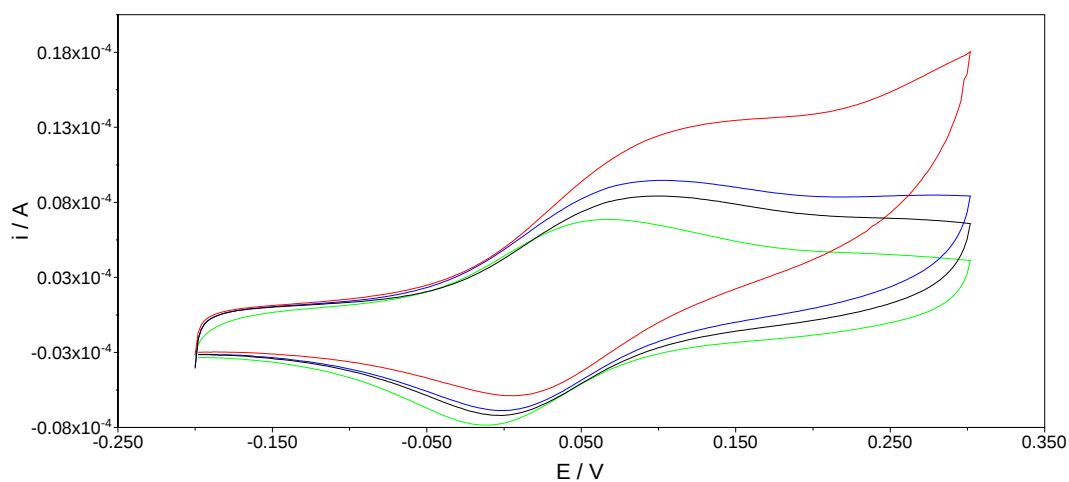


Figura C.18. Elettrodo B₀: tampone fosfato 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0 (verde), 0.5 mM NADH (nero), 1 mM NADH (blu), 5mM NADH (rosso); 50 mV/s;

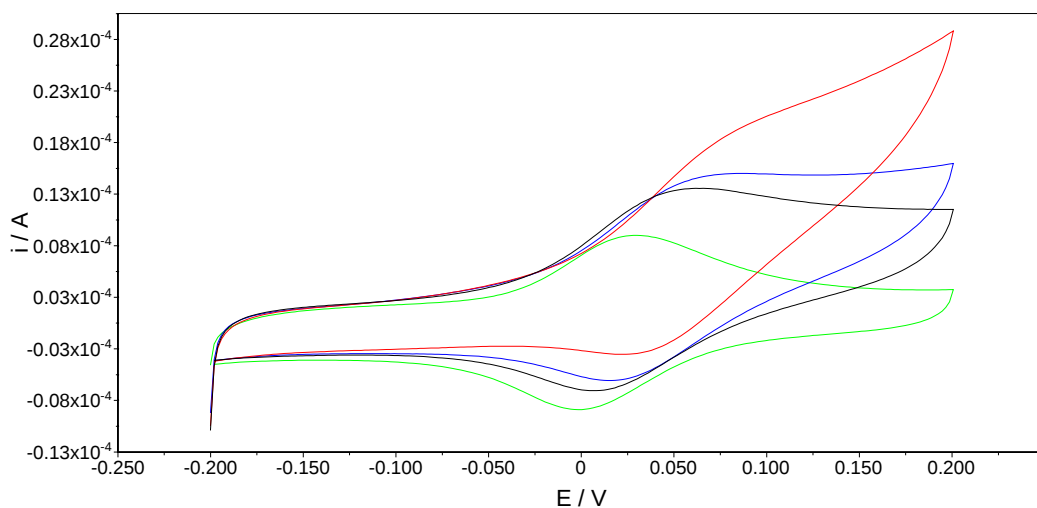


Figura C.19. Elettrodo A: tampone fosfato 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0 (verde), 0.5 mM NADH (nero), 1 mM NADH (blu), 5mM NADH (rosso); 50 mV/s;

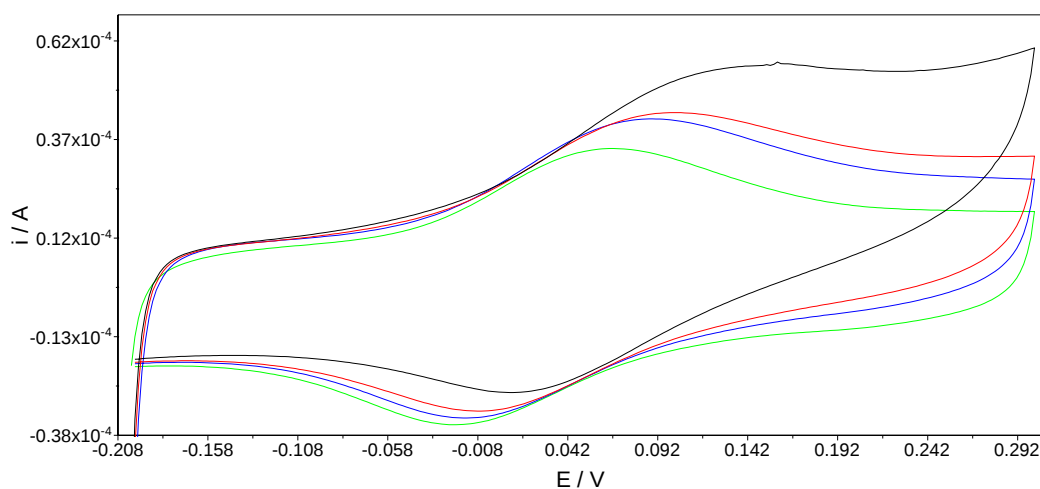


Figura C.20. Elettrodo A₀: tampone fosfato 0.1 M+0.1 M KCl, pH 7.0 (verde), 0.5 mM NADH (nero), 1 mM NADH (blu), 5mM NADH (rosso); 50 mV/s;

Gli elettrodi screen-printed modificati con Variamine blue sono stati testati in FIA, con un *loop* da 50 μL e ad una velocità di flusso di 350 mL/min. Prima di essere introdotti nel sistema a flusso, l'area dell'elettrodo di lavoro è stata ricoperta con una soluzione all'1% v/v di Nafion[®] neutralizzato, per formare una membrana protettiva che previene l'eventuale perdita dei nanotubi modificati depositati sulla superficie dell'elettrodo. Le curve di calibrazione sono illustrate nelle Figure C.21., C.22., C.22.1., C.23., C.24. e C.24.1. I valori di pH studiati ricoprono l'intero intervallo di lavoro delle deidrogenasi (pH 5.0÷10.0). Le soluzioni tampone utilizzate sono: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0. e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl). Si osserva che la risposta elettrochimica è pH dipendente, e che l'intervallo lineare di lavoro degli elettrodi varia sia in funzione del pH, sia in funzione del tipo di elettrodo. Gli elettrodi di tipo A e A₀ mostrano di avere un *WLR* di circa un ordine di grandezza superiore agli omologhi di tipo B e B₀. Il limite di rilevabilità è dell'ordine delle micromoli/L, ed è leggermente inferiore per gli elettrodi di tipo B e B₀. I parametri analitici sono illustrati nella Tabella C.3.

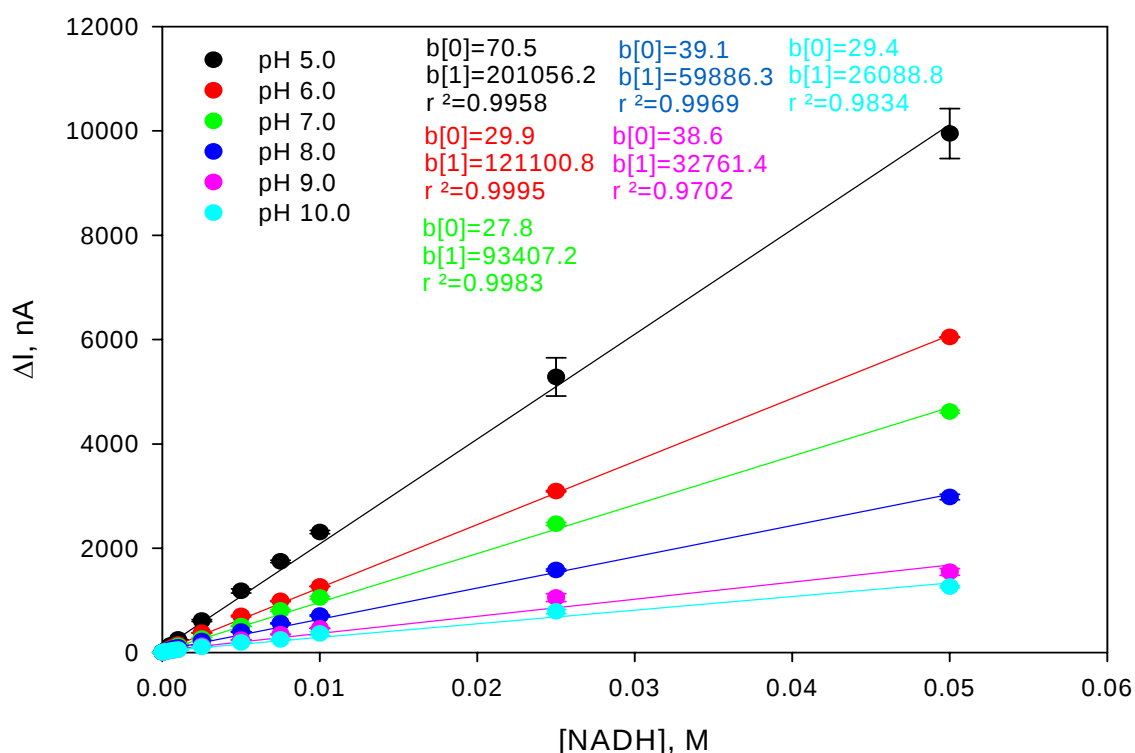


Figura C.21. Elettrodo A. Curve di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0. e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl).

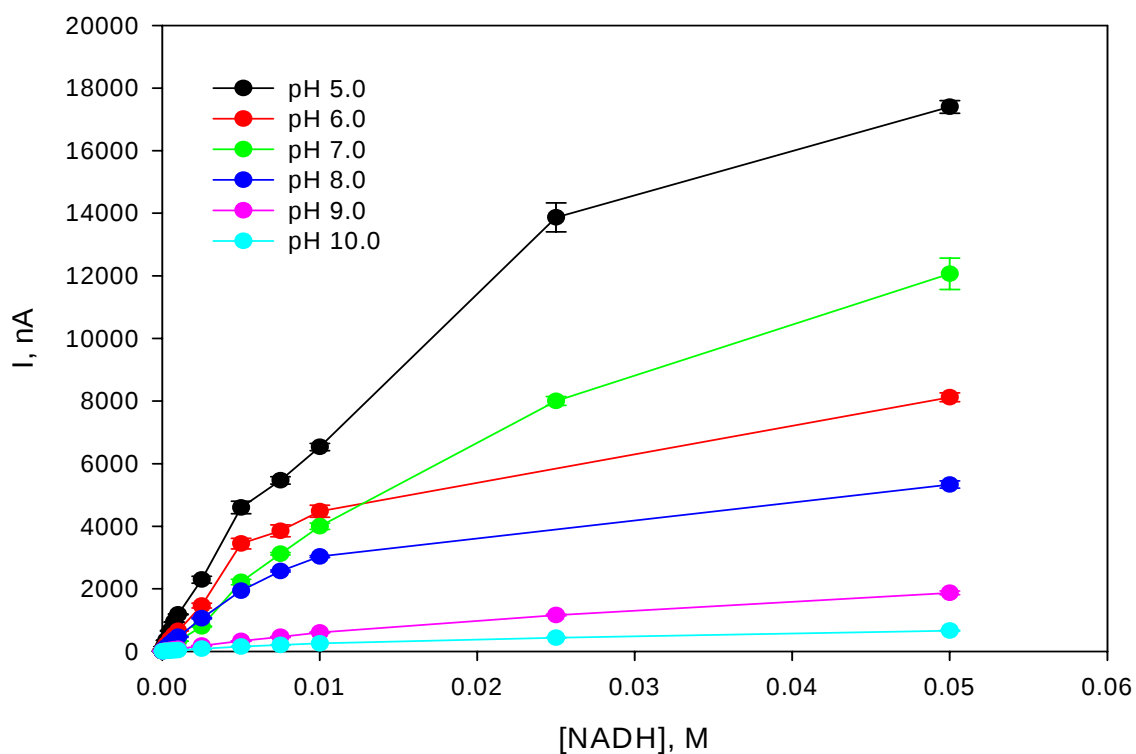


Figura C.22. Elettrodo B. Curve di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0, e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl).

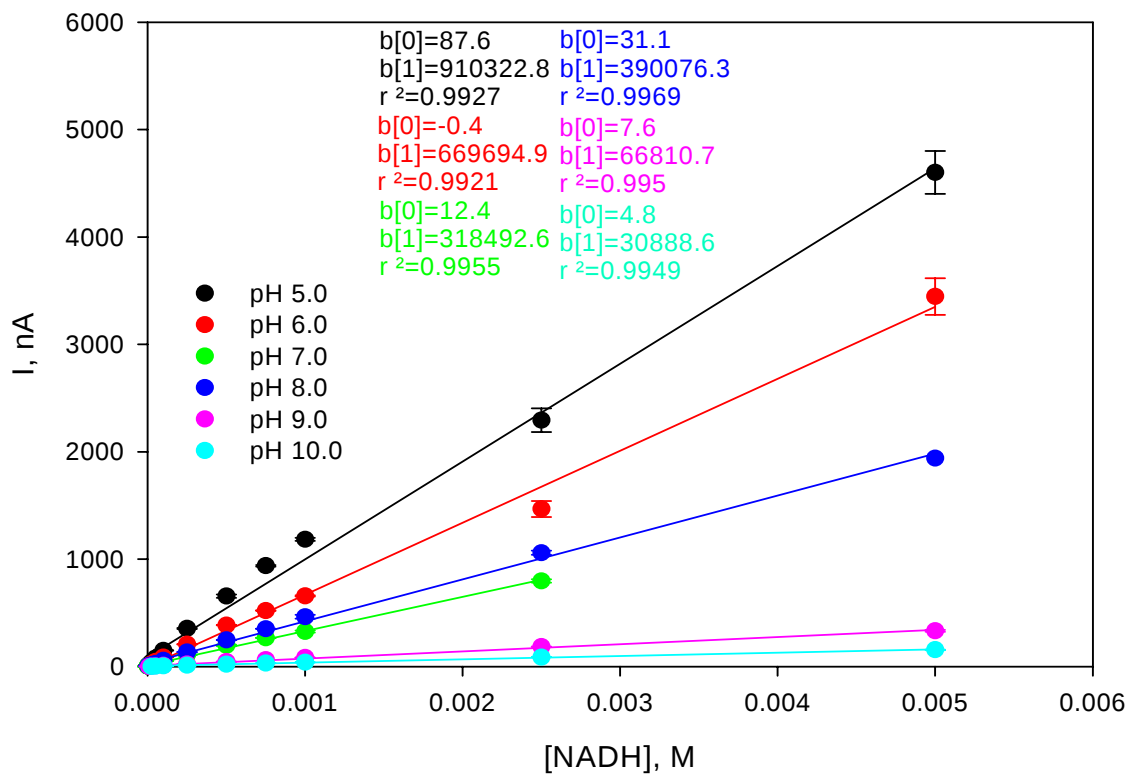


Figura C.22.1. Elettrodo B. Intervallo lineare di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0, e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl).

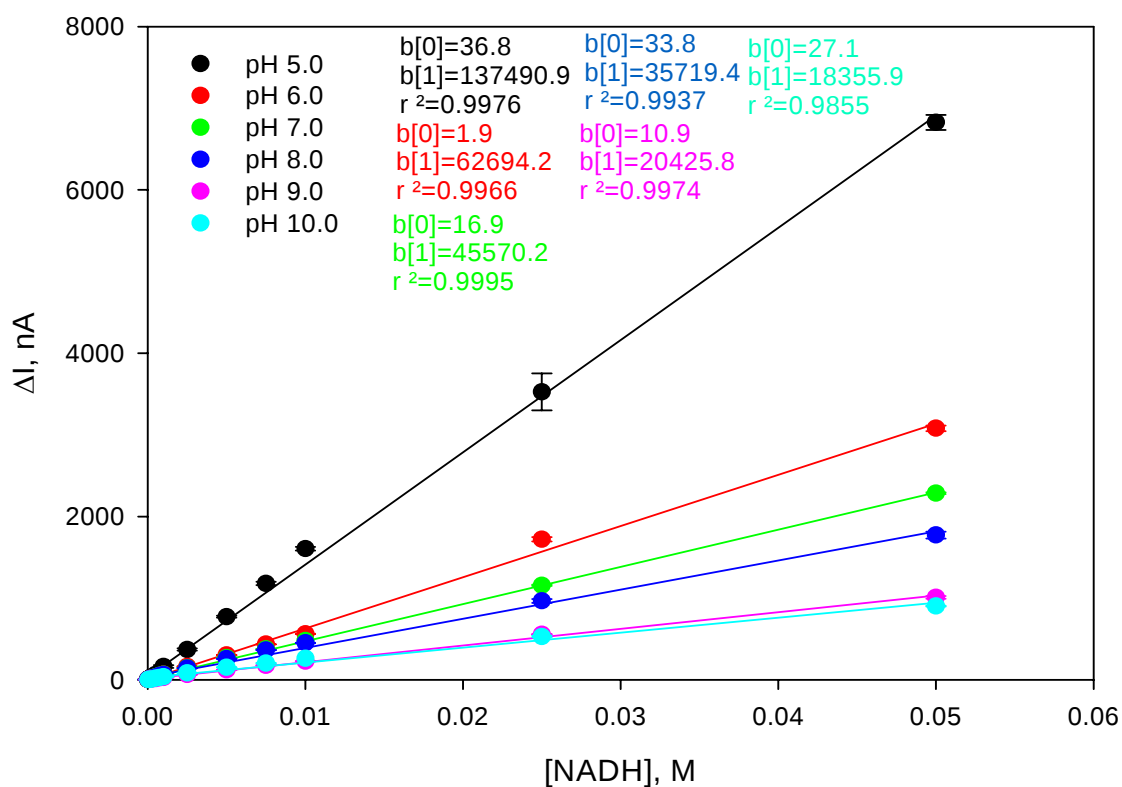


Figura C.23. Elettrodo A₀. Curve di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0. e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M glicina+0.1 M KCl).

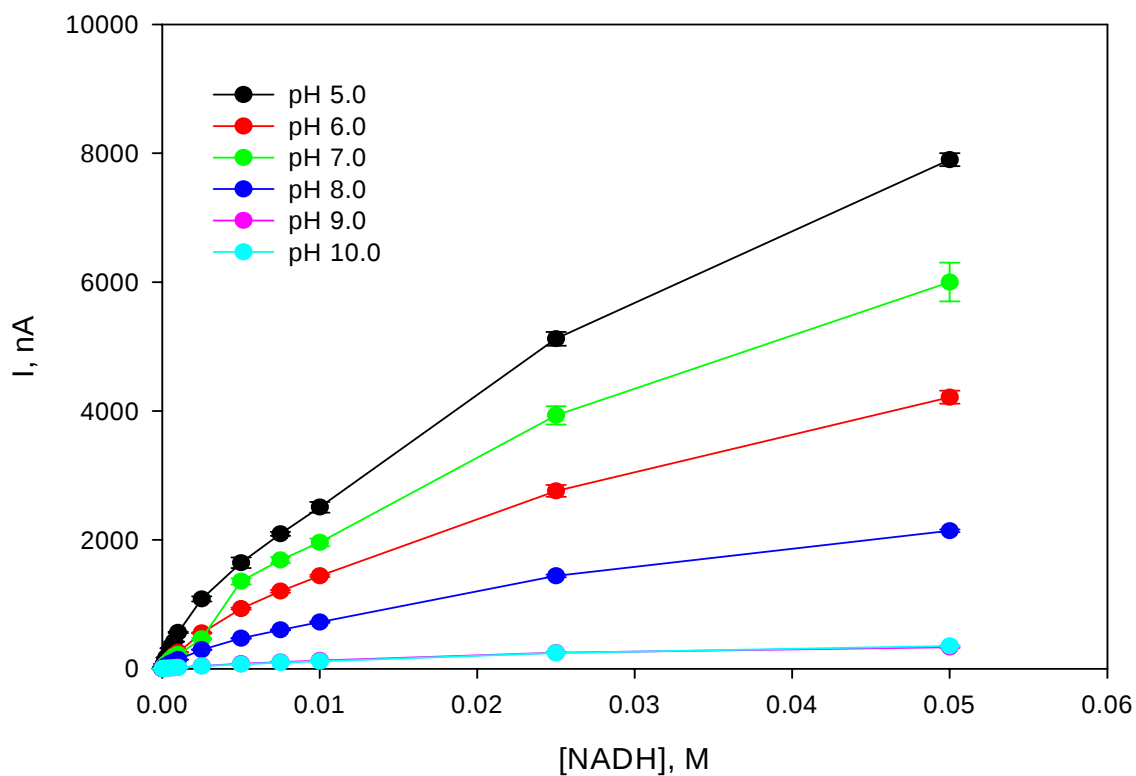


Figura C.24. Elettrodo B₀. Curve di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0. e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl).

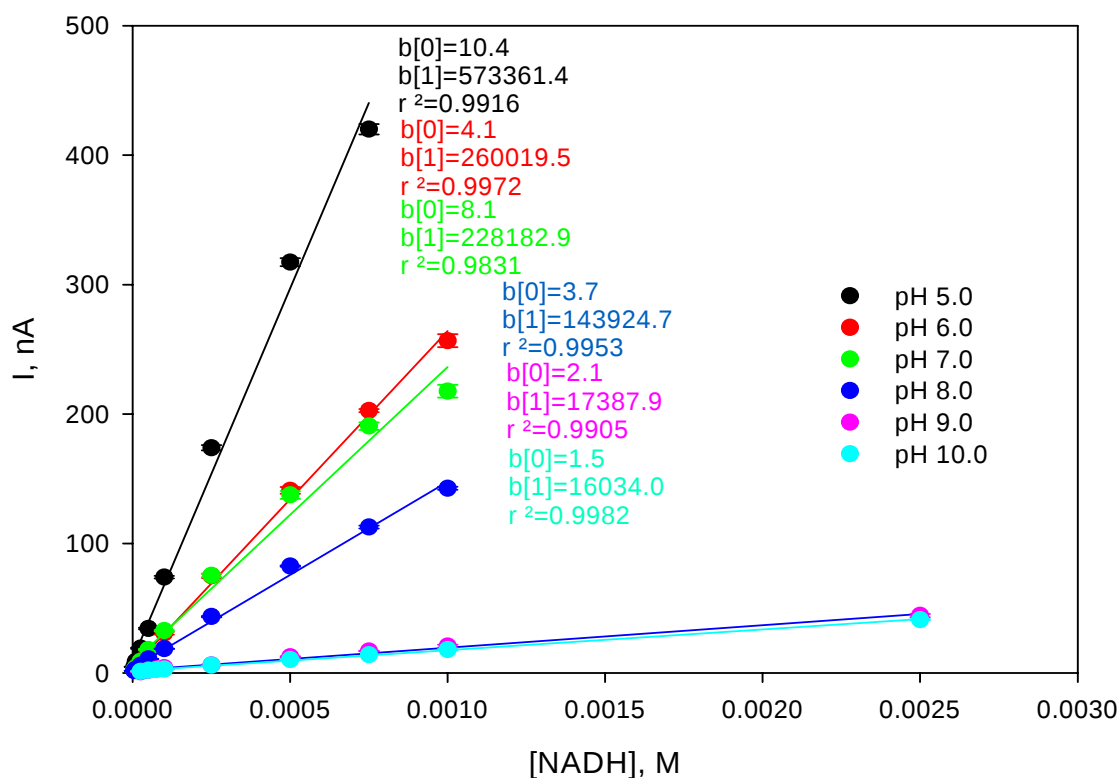


Figura C.24.1. Elettrodo B₀. Intervallo lineare di calibrazione: pH 5.0 (0.1 M citrato fosfato+0.1 M KCl); pH 6.0, 7.0, e 8.0 (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); pH 9.0 (0.1 M Tris+0.1 M KCl); pH 10.0 (0.1 M carbonato+0.1 M KCl).

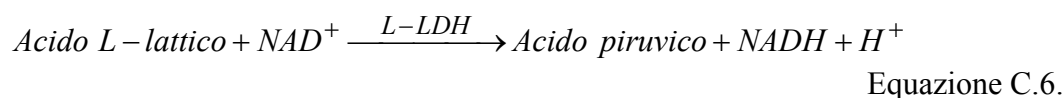
Tabella C.3. Tabella riassuntiva per gli elettrodi di tipo A, A₀, B e B₀. Il LOD ed il LOQ sono calcolati secondo l'equazione: LOD =3*s_b*/*S*; LOQ=10*s_b*/*S*, dove *s_b* è la deviazione standard del segnale *blank* ed *S* è la sensibilità.

Elettrodo	pH	WLR, M	LOD, μM	LOQ, μM	E _{appl.} , mV
A	5.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	0.8	2.7	+200
	6.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	1.4	4.5	+150
	7.0	7.5x10 ⁻⁶ ÷5x10 ⁻²	1.7	5.9	+100
	8.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	2.7	9.2	+50
	9.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	5.1	1.7	±0
	10.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	6.3	2.1	-50
A₀	5.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	1.2	4.0	+150
	6.0	2.5x10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	2.6	8.7	+150
	7.0	2.5x 10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	3.6	1.2	+150
	8.0	2.5x 10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	4.6	1.5	+100
	9.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	8.1	2.7	+50
	10.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻²	8.9	2.9	-30
B	5.0	2.5x 10 ⁻⁶ ÷5x10 ⁻³	0.2	0.7	+200
	6.0	2.5x 10 ⁻⁶ ÷5x10 ⁻³	0.3	0.9	+150
	7.0	10 ⁻⁶ ÷2.5x10 ⁻³	0.6	1.9	+100
	8.0	5x10 ⁻⁶ ÷5x10 ⁻³	0.5	1.6	+50
	9.0	10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻³	2.8	9.3	+20
	10.0	2.5x10 ⁻⁵ ÷5x10 ⁻³	6.1	20	-50
B₀	5.0	5x10 ⁻⁶ ÷7.5x10 ⁻⁴	0.3	1.1	+200
	6.0	5x10 ⁻⁶ ÷10 ⁻³	0.7	2.4	+200
	7.0	5x10 ⁻⁶ ÷10 ⁻³	0.8	2.7	+130
	8.0	5x10 ⁻⁶ ÷10 ⁻³	1.3	4.3	+80
	9.0	2.5x10 ⁻⁵ ÷2.5x10 ⁻³	10.0	3.6	+50
	10.0	2.5x10 ⁻⁵ ÷2.5x10 ⁻³	12.0	3.8	+10

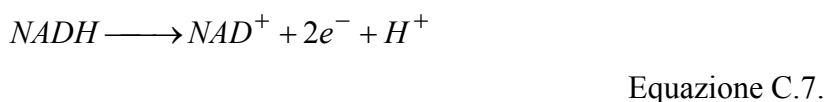
Studio preliminare di un biosensore per l'acido L-lattico

Per dimostrare le potenzialità di questi sensori a NADH, un elettrodo di tipo A viene accoppiato con l'enzima L-lattato deidrogenasi (L-LDH, 140 IU/mg). Praticamente 4 IU di L-LDH sono state immobilizzate sull'elettrodo A, per semplice intrappolamento con una soluzione all'1% v/v di Nafion[®] neutralizzato. Tra le tre quantità di enzima considerate (2, 4 e 6 IU), quella corrispondente a 4 IU si è rivelata essere la quantità ottimale.

La misura dell'acido L-lattico si basa sulla seguente schema di reazione:



Applicando un potenziale di +200 mV *vs.* Ag|AgCl (il potenziale applicato di +200 mV *vs.* Ag|AgCl è stato selezionato mediante studi di voltammetria idrodinamica), il NADH prodotto dalla reazione enzimatica è ossidato all'elettrodo modificato con Variamine blue:



La reazione enzimatica avviene in presenza di 2 mM NAD⁺ (valore ottimale, scelto tra i seguenti valori testati: 0.5 mM, 2 mM e 5 mM), e ad un valore di pH 7.5 (0.1 M tampone fosfato+0.1 M KCl). La misura elettrochimica è di tipo amperometrico, in *batch*. Nella Figura C.25 e C.26. sono illustrate la curva di calibrazione ed il *WLR* del biosensore.

Il biosensore presenta un intervallo lineare di lavoro compreso tra 5×10^{-6} e 4.5×10^{-4} M (acido L-lattico) ed un limite di rilevabilità pari a 1×10^{-6} M di acido L-lattico.

Rimangono da valutare, in un futuro proseguimento di questo lavoro, alcuni parametri importanti, come la riproducibilità della risposta, la stabilità operativa e non-operativa e la risposta in matrice.

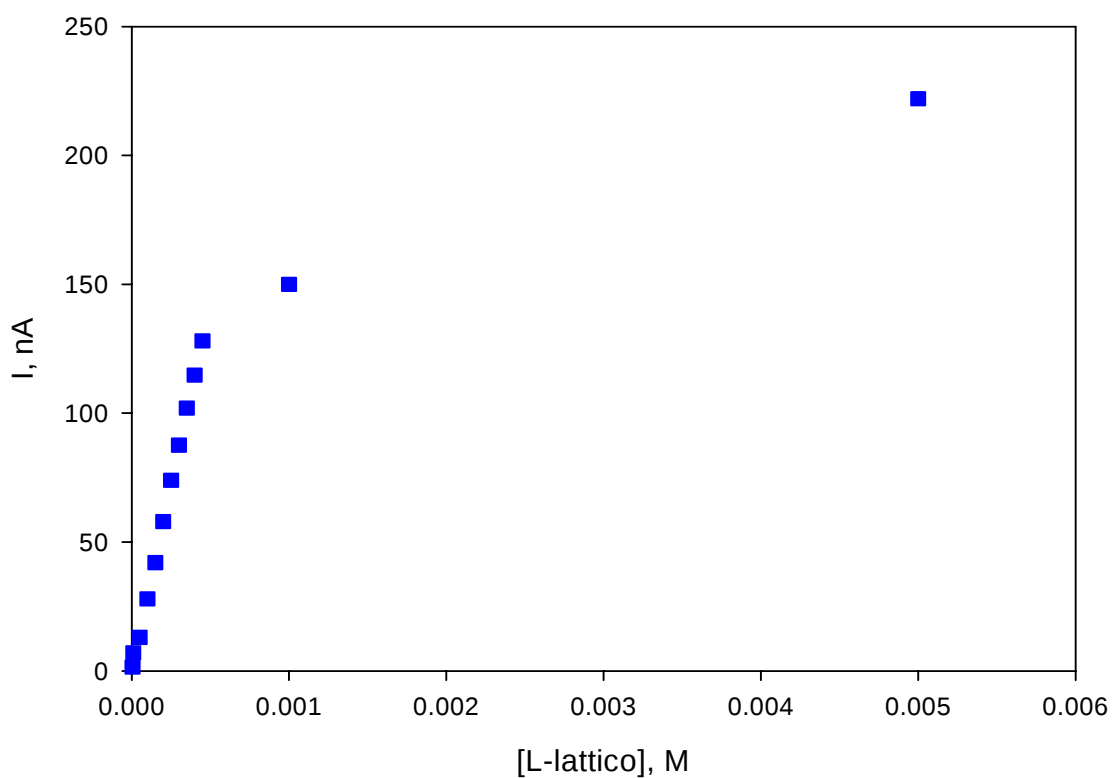


Figura C.25. Biosensore ad acido L-lattico basato sugli elettrodi di tipo A. Curva di calibrazione: pH 7.5, (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); +200 mV vs. Ag|AgCl.

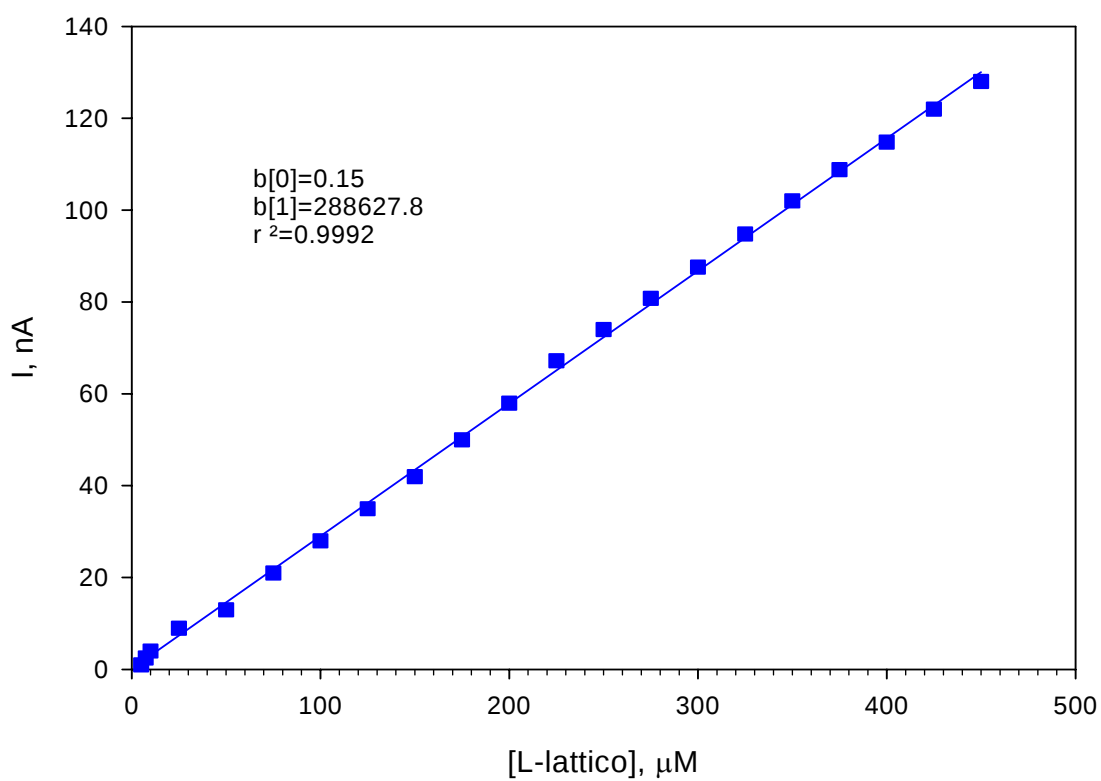


Figura C.26. Biosensore ad acido L-lattico basato sugli elettrodi di tipo A. Intervallo lineare di lavoro: pH 7.5, (0.1M tampone fosfato+0.1 M KCl); +200 mV vs. Ag|AgCl.

Conclusioni

L'immobilizzazione del mediatore Variamine blue su nanotubi di carbonio ha permesso di ottenere degli elettrodi modificati per la misura del NADH.

I differenti sensori sono tutti in grado di catalizzare l'ossidazione del NADH a basso potenziale applicato, con caratteristiche analitiche adatte per la realizzazione di biosensori. La stabilità operativa dei sensori a NADH è stata valutata osservando una minima diminuzione della risposta. Dopo aver effettuato 300 misure in FIA, è stata osservata una diminuzione del segnale del 6% (per gli elettrodi di tipo A e B), mentre gli elettrodi di tipo A₀ e B₀ hanno mostrato una perdita del segnale, nelle stesse condizioni, del 8%.

Tra le diverse configurazioni adottate è certamente da preferire l'immobilizzazione chimica del mediatore rispetto all'adsorbimento sui nanotubi, poiché ciò consente un tempo di vita maggiore del sensore. Questo approccio potrebbe consentire la realizzazione di sensori modificati con enzimi e mediatori direttamente su nanotubi.

L'accoppiamento tra un sensore per NADH con Variamine blue immobilizzata covalentemente e l'enzima L-LDH è risultato in un biosensore ad acido lattico che deve essere ulteriormente caratterizzato.

Capitolo III - Elettrodo mediato per la determinazione del glucosio nel vino

D) Elettrodo mediato per la determinazione del glucosio nel vino

*Il vino*¹⁴⁸

Il termine “vino” indicava in origine qualsiasi bevanda ottenuta dal processo di fermentazione degli zuccheri contenuti in alcuni frutti, cereali e miele. Con il passare del tempo il termine “vino” è stato utilizzato per indicare esclusivamente il prodotto ottenuto dalla fermentazione dei frutti di *vitis*, principalmente *Vitis vinifera*.

La composizione del vino è condizionata principalmente dalla composizione dell'uva, ma anche la fermentazione e la tecnologia di vinificazione giocano un ruolo molto importante, per cui è possibile ottenere vini con composizione completamente diversa dalla stessa uva. I principali costituenti del vino sono i seguenti:

acqua: è di gran lunga il componente più abbondante, con un contenuto compreso tra l'80 e 90%;

alcoli:

alcol etilico – è il principale prodotto della fermentazione alcolica (9-16% vol.);

glicerina – è il terzo composto per quantità presente nei vini (4-15 g/L), ed è un prodotto secondario della fermentazione alcolica;

alcol metilico – composto molto tossico che deriva dalla demolizione enzimatica delle pectine della buccia; i tenori che si riscontrano nei vini (20-200 mg/L) sono largamente al di sotto della soglia di tossicità;

alcoli superiori – sono prodotti secondari (1-propanolo, 2-metil-1-propanolo, 3-metil-1-butanolo, 2-metil-1-butanolo) della fermentazione alcolica, derivanti principalmente dalla degradazione degli aminoacidi; il loro contenuto globale varia da 100 a 500 mg/L;

butilenglicole – è un polialcole presente in tutti i composti fermentati quale prodotto secondario della fermentazione alcolica; nei vini si trova in quantità comprese tra 0.3 e 0.5 g/l.

zuccheri: se la fermentazione è completa, nel vino rimane qualche frazione di grammo degli zuccheri dell'uva (fruttosio, glucosio e gli zuccheri infermentescibili quali arabinosio e xilosio);

acidi organici: gli acidi organici identificati nel vino superano la cinquantina; insieme concorrono a determinare l'acidità totale dei vini; i principali acidi organici che compongono l'acidità fissa sono: tartarico (3-8 g/L), malico (0-7 g/L), citrico (0.1-0.5 g/L), succinico (1-3 g/L) e lattico (1-4 g/L); l'acidità volatile è costituita quasi completamente da acido acetico (0.2-1 g/L);

sostanze azotate: le proteine presenti nei vini li rendono velati, per cui vengono eliminate mediante chiarificazione; la maggior parte delle proteine vengono consumate dai lieviti oppure precipitano; si esprimono sotto forma di azoto totale (0.05-0.9 g/L);

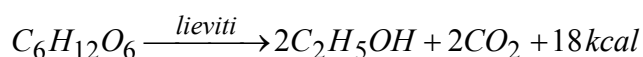
sostanze fenoliche: provengono direttamente dall'uva ed il loro contenuto dipende dalla tecnica di vinificazione utilizzata; i composti fenolici (flavonoli, tannini, antociani, acidi fenolici, etc.) condizionano il colore, l'aroma e la stabilità del vino;

minerali: provengono direttamente dall'uva e sono costituite da cationi (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) e anioni (fosfati, solfati e cloruri), il cui contenuto complessivo nel vino è intorno ai 2-3 g/L; sono presenti anche numerosi oligoelementi (ferro, iodio, cobalto, rame, manganese, molibdeno, piombo, arsenico, cadmio, etc.);

vitamine: provengono direttamente dall'uva e favoriscono l'azione dei lieviti;

gas disciolti: *anidride carbonica; ossigeno; e anidride solforica.*

La trasformazione del mosto in vino avviene per azione dei lieviti che trasformano gli zuccheri in alcol, anidride carbonica e una serie di prodotti secondari:



Equazione D.1.

La fermentazione alcolica essendo una reazione esotermica, è accompagnata dalla produzione di calore. La temperatura influenza l'andamento della fermentazione e la produzione di prodotti secondari per cui va opportunamente controllata, in quanto i lieviti si trovano in difficoltà quando si superano i 30°C e si possono avere arresti fermentativi. La fermentazione malo-lattica costituisce il primo importante atto del processo di maturazione e di invecchiamento del vino. Essa inizia dopo qualche tempo dall'inizio della fermentazione alcolica.

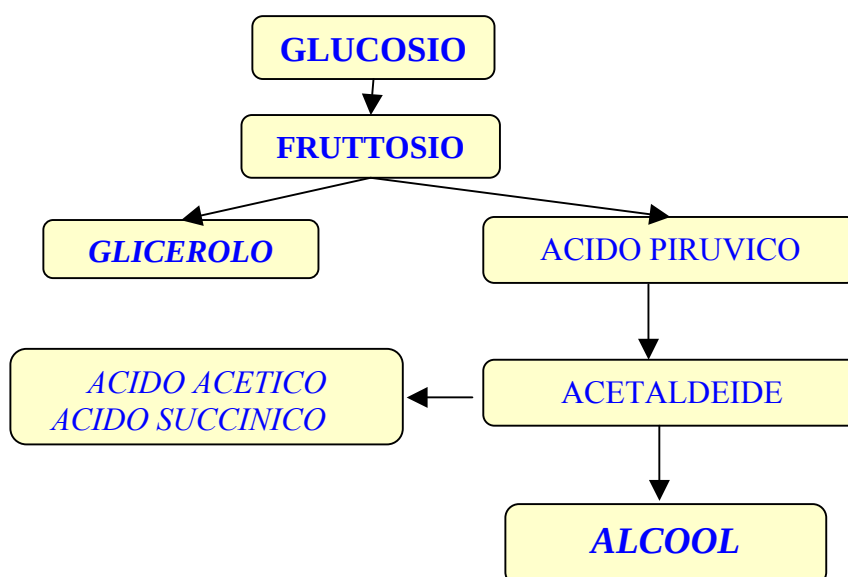


Figura D.1. Biochimismo della fermentazione alcolica (sono illustrati i principali prodotti di fermentazione).

Temperatura e pH sono i fattori più importanti che ne condizionano lo sviluppo. Si verifica raramente o con molta difficoltà nei vini con pH inferiori a 3.0-3.1; maggiore è il pH più è facilitato lo sviluppo di batteri che ne promuovono il processo di fermentazione malolattica. L'acido L-malico presente nel vino viene trasformato esclusivamente in acido L-lattico ed anidride carbonica:

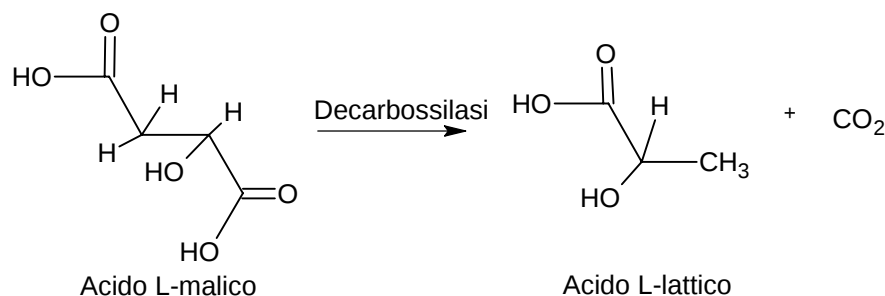


Figura D.2. Fermentazione malo-lattica.

L'effetto principale della fermentazione malo-lattica è la diminuzione dell'acidità fissa ed un incremento del pH.

Gli zuccheri

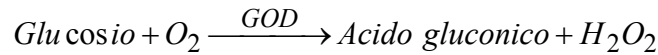
Rappresentano una parte importante del mosto e quindi del vino e sono costituiti principalmente da glucosio (destrosio) e fruttosio (levulosio), che vengono fermentati dai lieviti naturalmente presenti nel mosto con produzione di alcool; quando la fermentazione è terminata non sono più presenti o si ritrovano in tracce. Secondo il tenore di zuccheri presenti i vini vengono classificati come secchi, amabili, dolci, ecc. Glucosio e fruttosio nel mosto si trovano inizialmente in quantità pressoché uguali per cui il loro rapporto è prossimo all'unità.

Nel caso di una normale fermentazione alcolica di un mosto, il glucosio viene fermentato per primo; ciò comporta una sua diminuzione e il rapporto fra i due zuccheri, al procedere della fermentazione, si allontana sempre di più dall'unità. Nel caso di vini dolci e nei casi in cui non è consentita la dolcificazione, il valore di questo rapporto può rappresentare un elemento di controllo della genuinità.

Sensori e biosensori per la misura del glucosio

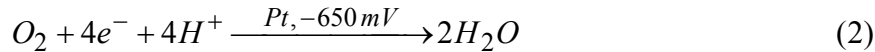
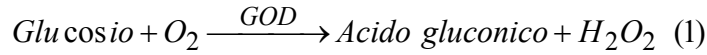
Una semplice reazione enzimatica, catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi (GOD), offre più possibilità di rivelazione elettrochimica:

- l'acido gluconico produce una variazione di pH:



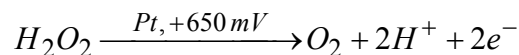
Equazione D.2.

- il consumo dell'ossigeno da parte della GOD viene monitorato con l'elettrodo di Clark:



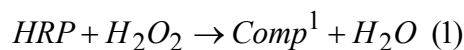
Equazione D.3.

L'acqua ossigenata è decisamente il “*most popular*” analita per tutti coloro che lavorano nel campo dei biosensori elettrochimici. Infatti, oltre ad essere il prodotto di reazione della numerosissima famiglia delle ossidasi, per la determinazione dell' H_2O_2 esiste anche un'ampia letteratura a cui attingere;^{149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163} la misura dell'acqua ossigenata può essere effettuata con il classico elettrodo a disco di Pt; all'anodo si applica un potenziale di +0.650 V, provocando l'ossidazione dell' H_2O_2 :



Equazione D.4.

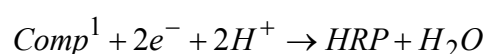
La perossidasi da rafano (HRP, *horseradish peroxidase*), possiede una singola unità eme, intimamente racchiusa all'interno della catena polipeptidica, in grado di ridurre l'acqua ossigenata:



Equazione D.5.

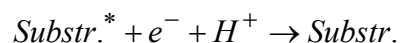
dove: Comp^1 e Comp^2 sono intermedi del ciclo catalitico, mentre Substr. e Substr.* sono, rispettivamente, il substrato donatore di elettroni ed il radicale dell'ossidazione monoelettronica.

L'HRP Immobilizzata sulla superficie elettrodica può subire essa stessa un processo ossidativo da parte del perossido, come descritto nella Equazione D.5. (1), per poi ridursi direttamente all'elettrodo (trasferimento elettronico diretto):



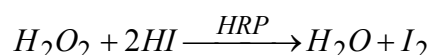
Equazione D.6.

Quando il prodotto radicalico dell'ossidazione monoelettronica viene ridotto elettrochimicamente all'elettrodo:



Equazione D.7.

e questo processo è accoppiato al ciclo catalitico dell'HRP, si parla di trasferimento elettronico mediato. L'efficienza della reazione è limitata dall'orientamento enzimatico all'elettrodo, nel caso del trasferimento elettronico diretto, mentre l'efficienza è completa per il trasferimento mediato.¹⁶⁴ Un biosensore ad acqua ossigenata, con trasferimento elettronico mediato, è stato descritto da Eggins.¹⁶⁵ La perossidasi da rafano è stata immobilizzata all'elettrodo iono-selettivo per l'anione ioduro:

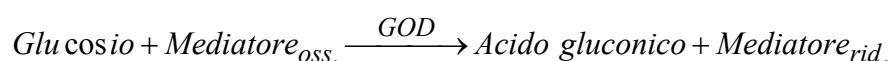


Equazione D.7.

Un metodo alternativo all'impiego delle perossidasi è rappresentato dalla possibilità di modificare gli elettrodi di carbonio/grafite con vari metalli nobili: Au, Ag, Pt, etc. Gli elettrodi screen-printed sono tra i più utilizzati, in quanto gli inchiostri che servono per la stampa degli elettrodi di lavoro, possono essere molto facilmente modificati. Cagnini,¹⁶⁶ immobilizzando la colina ossidasi su di un SPE, il cui elettrodo di lavoro viene modificato con rutenio, ottiene un biosensore per il monitoraggio dei pesticidi.

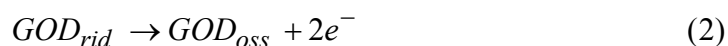
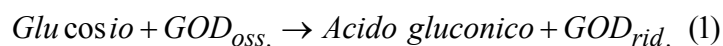
Il maggior difetto per questo tipo di elettrodi, condiviso anche dall'elettrodo di Pt, è rappresentato dall'alto potenziale di lavoro applicato: +0.650 V.

Quando l'ossigeno può essere sostituito con un mediatore, la misura elettrochimica del glucosio diventa indipendente dalla presenza dell'O₂ in soluzione, in quanto il ruolo di trasportatore di elettroni viene preso dal mediatore stesso:



Equazione D.8.

I biosensori di terza generazione sfruttano la capacità dell'enzima di comunicare direttamente con il trasduttore di segnale, cosicché la GOD può essere riossidata all'elettrodo:

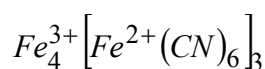


Equazione D.9.

Il blu di Prussia

Il blu di Prussia è considerato tutt'oggi il più vantaggioso sistema redox applicato per la misura dell' H₂O₂.

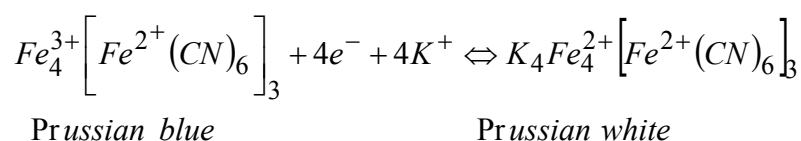
L'esacianoferrato ferrico è uno dei più antichi composti di coordinazione conosciuti, le cui proprietà elettrochimiche sono state rivelate per la prima volta da Neff nel 1978.¹⁶⁷ La sua formula chimica è stata definita nel 1936 tramite misure spettroscopiche:¹⁶⁸



Formula chimica D.1.

Il blu di Prussia, conosciuto anche come *Prussian blue*, si ottiene dalla miscela di due soluzioni, una contenente lo ione ferroso o ferrico e l'altra lo ione ferri- o il ferrocianuro, a condizione che il ferro delle due soluzioni si trovi in stati di ossidazione diversi.¹⁶⁹ Il blu di Prussia (PB) ha una struttura cubica in cui gli atomi di Fe^{3+} e quelli di Fe^{2+} si alternano in modo che lo ione ferrico sia circondato ottaedricamente da atomi di azoto, mentre lo ione ferroso è circondato da atomi di carbonio.^{170,171}

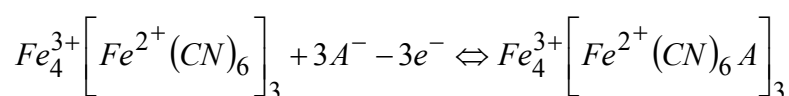
Il ferricianuro ferrico depositato sulla superficie di un elettrodo di lavoro, per via chimica o elettrochimica, manifesta un'elevata e specifica attività elettrochimica nei confronti dell'acqua ossigenata.¹⁷² Il film di PB ottenuto all'elettrodo può subire un processo di riduzione elettrochimica, trasformandosi nel *Prussian white* (PW); caratteristica di questo processo è la scomparsa del colore blu:



Equazione D.10.

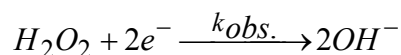
La partecipazione dello ione potassio alla reazione di trasformazione del PB in PW implica che il potenziale formale redox sia dipendente dall'attività degli ioni potassio in soluzione. È stato dimostrato che se la concentrazione degli ioni potassio in soluzione diminuisce di un ordine di grandezza, il potenziale redox *shifta* di circa 60 mV, verso la regione negativa di potenziale, così come è stato teorizzato dall'equazione di Nernst.¹⁷³ Oltre allo ione potassio, anche gli ioni monovalenti NH_4^+ , Cs^+ e Rb^+ possono penetrare all'interno del reticolo cristallino per promuovere la reazione di trasformazione PB a PW.

L'ossidazione del PB a *Prussian green* (PG), forma completamente ossidata del PB, è promossa da alti valori di potenziali anodici (>0.9 V), e l'elettroneutralità del complesso PG è mantenuta dall'intrappolamento nel reticolo cristallino di anioni:



La coppia redox PB/PW ha la proprietà di ridurre l'acqua ossigenata ad un potenziale vicino a ~0.0 V vs. Ag|AgCl, in presenza dell'ossigeno e per tale motivo viene chiamato

anche “perossidasi artificiale”.¹⁷⁴ Il meccanismo di riduzione dell’H₂O₂ all’elettrodo modificato con PB coinvolge due elettroni, in ambiente neutro:¹⁷⁵



Equazione D.11.

Per la prima volta, nel 1994,¹⁷⁶ viene riportato un biosensore amperometrico basato su elettrodi modificati con il blu di Prussia. Oltre al sistema classico basato sul sistema glucosio/glucosio ossidasi, in letteratura vengono riportati vari biosensori, che accoppiano gli enzimi ossidasi con la misura amperometrica dell’acqua ossigenata, all’elettrodo modificato con il blu di Prussia.^{177,178,179}

*Polimeri non conduttori nel campo dei biosensori*¹⁸⁰

I polimeri non conduttori, ottenuti tramite elettropolimerizzazione diretta all’elettrodo di lavoro, hanno una resistenza elettrica elevata, uno spessore compreso tra 10 e 100 nm, e manifestano una permeabilità selettiva nei confronti di vari analiti. A differenza degli omologhi conduttori (polipirrolo, polianilina, poliacetilene, poliindolo, politionina, politiofene, etc.),^{181,182,183} i polimeri non conduttori rappresentano un’alternativa interessante nel campo biosensoristico.

A differenza delle tecniche convenzionali di immobilizzazione del componente biologico attivo all’elettrodo, l’elettropolimerizzazione offre:

- un controllo accurato dello spessore del film polimerico;
- una elevata riproducibilità;
- una uniforme copertura dell’area reale elettrodica;
- una facile rigenerazione della superficie elettrodica.

I film polimerici non conduttori sono anche delle eccellenti barriere che regolano il processo diffusionale all’elettrodo, in quanto possono eliminare eventuali interferenti (specie elettrochimiche che subiscono facilmente il processo di ossidazione all’elettrodo) come l’acido ascorbico, l’urea, acetaminofene, etc.^{184,185}

La maggior parte delle applicazioni riportate in letteratura riguarda l’utilizzo dei polimeri non conduttori che fanno parte della famiglia dei fenoli,¹⁸⁶ delle fenilendiammine¹⁸⁷ e quella del polipirrolo sovraossidato.¹⁸⁸

L’utilizzo di un film non conduttore per la costruzione di biosensori presenta un doppio vantaggio, in quanto il polimero ha una doppia funzione: barriera protettiva e matrice di immobilizzazione. In più la risposta elettrochimica di questo tipo di biosensori è sensibile,

rapida e riproducibile, caratteristica conferita dallo spessore minimo del film polimerico ottenuto all'elettrodo.

I polimeri non conduttori, quando vengono impiegati nello sviluppo dei biosensori, presentano un grande svantaggio legato alla quantità di componente biologico attivo che viene immobilizzato all'elettrodo. Questa forte limitazione può essere superata utilizzando enzimi con un elevato numero di *turnover* o un'alta attività enzimatica. Anche i materiali compositi a base di polimeri non conduttori sono stati utilizzati per incrementare la quantità di componente biologico all'elettrodo.¹⁸⁹

Lavoro sperimentale

Scopo del lavoro

Lo sviluppo di un sistema elettrochimico per la misura del glucosio nei campioni di mosto/vino rappresenta lo scopo di questo lavoro sperimentale.

Il sistema studiato è basato sull'utilizzo del blu di Prussia come mediatore redox, in grado di ridurre l'acqua ossigenata ad un potenziale applicato di $-50\text{ mV vs. l'elettrodo di pseudoriferimento di argento}$. La componente biologica attiva è la glucosio ossidasi, immobilizzata sulla superficie dell'elettrodo di lavoro mediante intrappolamento in una matrice polimerica non conduttrice, ottenuta dalla co-polimerizzazione di due monomeri: il 2,6-diidrossinaftalene (2,6-DHN) e la 2-(4-amminofenil)-etilammina (AP-EA).

Come applicazione analitica viene presentata la misura del glucosio durante una fermentazione alcolica del mosto delle uve Tokay condotta in laboratorio.

Reagenti e strumenti e tecniche di analisi

Il 2,6-diidrossinaftalene (2,6-DHN) è stato fornito dalla Fluka Chemie, Buchs, Svizzera. La 2-(4-amminofenil)-etilammina (AP-EA) proviene dalla ditta Aldrich, Steinheim, Germania. La glutaraldeide (25% v/v), la glucosio ossidasi (GOD, EC 1.1.3.4, da *Aspergillus Niger* 157.500 IU/g), il D (+) glucosio monoidrato sono stati acquistati dalla Sigma, St. Louis, MO, USA. Il carbone vetroso, (Sigradur K, diametro $0.4\text{--}12\text{ }\mu\text{m}$) è stato fornito dalla Sigradur (HTM Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH, Germania). Il fosfato monosodico e monopotassico, il KCl, e l'HCl (37%) sono della Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia; il K_2HPO_4 è stato acquistato dalla Riedel-de Haen, Seelze, Germania. Viene utilizzata anche una stufa (High Performance Oven, MOD 2100, F.lli Galli, Milano, Italia).

Le misure elettroanalitiche sono state condotte in FIA. Il sistema FIA è composto da una pompa peristaltica (Gilson, modello Minipuls 3, Villers-le-Bel, Francia), da tubi di Tygon, da una cella in flusso a strato sottile ($d_{\text{int}}=15\text{ mm}$) e da una valvola di iniezione a 4 canali (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Per le misure amperometriche si impiega un potenziostato della Metrohm, (Herisau, Svizzera) connesso and un registratore analogico di tipo $X-t$, modello L250E (Linseis, Selb, Germania). Le misure elettrochimiche in voltammetria ciclica ed in cronoamperometria vengono condotte utilizzando un sistema

μ Autolab, Type II, Electrochemical System (Eco Chemie, Utrecht, Olanda) dotato di PGSTAT-12 e software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Olanda).

Elettrodi screen-printed bulk modificati con il blu di Prussia (bPB-SPEs)¹⁹⁰

La stampa degli elettrodi *bulk* modificati con il blu di Prussia è stata realizzata utilizzando una “High Performance Multi Purpose Screen Printer DEK 245” (DEK, Weymouth, UK). I supporti per la stampa utilizzati sono film di poliestere AUTOSTAT HT5 (spessore 0.175 mm) della AUTOTYPE (Milano, Italia). Gli inchiostri (Acheson Colloiden Italiana, Milano, Italia) usati sono: Elettrodag 477 SS RFU con un contenuto in solidi del 74-76% per lo strato d’argento, un inchiostro di grafite Elettrodag 423 SS RFU con un contenuto in solidi del 35-37% ed un inchiostro isolante Elettrodag 6010 SS.

Nel sistema a tre elettrodi utilizzato in questo lavoro, il primo strato depositato è stato quello d’argento con i contatti elettrici e l’elettrodo di riferimento.

L’inchiostro di grafite (Elettrodag 423 SS RFU) è stato modificato prima della stampa con il mediatore blu di Prussia. Brevemente, 1 g di polvere di carbone vetroso è stato disperso in 10 mL di una soluzione di $K_3Fe(CN)_6$ allo 0.1 M solubilizzato in 10 mM HCl. Successivamente, alla soluzione sono stati aggiunti 10 mL di $FeCl_3$, 0.1 M, preparati in HCl, 10 mM, e lasciati reagire, sotto agitazione, per 30 min. Il carbone vetroso così modificato è stato separato dalla rimanente miscela mediante filtrazione sotto vuoto, su di un imbuto di porcellana di tipo Buchner e lavato con HCl 10 mM, fino a quando la soluzione filtrata non è diventata incolore. A questo punto la polvere di carbone vetroso modificata con il blu di Prussia (GC-PB) è stata essiccata in stufa, per un’ora, a 100°C. La polvere di carbone vetroso così modificata è stata conservata in un essiccatore, a temperatura ambiente.

Il carbone vetroso modificato è stato omogeneizzato poi con l’inchiostro di grafite per la stampa dell’elettrodo di lavoro per ottenere un concentrazione finale di 2.5% w/w di componente attivo. Il secondo strato depositato è stato quindi, quello di inchiostro di grafite modificato con il mediatore blu di Prussia.

Il terzo strato di materiale isolante è stato applicato per delimitare la superficie attiva dell’elettrodo di lavoro (0.07 cm²).

I fogli con gli elettrodi serigrafati vengono conservati in luogo asciutto e protetti dalla luce. La risposta elettrochimica verso l'acqua ossigenata ed il potenziale di lavoro sono stati valutati mediante studi di voltammetria ciclica (Figura D.3.).

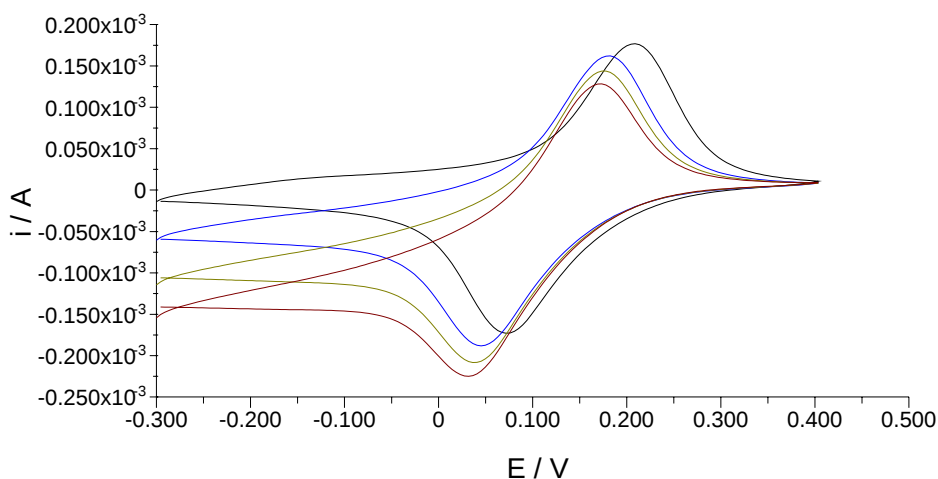


Figura D.3. Voltammetrie cicliche del *bPB-SPE*; (nero) tampone fosfato pH 7, (blu) H_2O_2 4 mM, (marrone) H_2O_2 8 mM, (rosso) H_2O_2 12 mM; velocità di scansione 50 mV/s.

Biosensore a glucosio

L'enzima glucosio ossidasi (GOD) è stato immobilizzato all'elettrodo *bPB-SPE*, mediante co-polimerizzazione dei monomeri precursori (2,6-DHN e AP-EA), ed in presenza di glutaraldeide (GAD).¹⁹¹ Tutte le soluzioni sono state preparate in tampone fosfato, 50 mM+0.1 M KCl, pH 7.0. Si eseguono 10 cicli di scansione tra 0.1 e 1.1 V, alla velocità di 15 mV/s (Figura D.5.). La soluzione che viene fatta reagire all'elettrodo è una miscela che contiene 10 μl di AP-EA (75.2 mM), 10 μl di 2,6-DHN (0.5 mM), 40 μl di GAD (0.01%) e 40 μl di GOD (500 U/ml), per un volume finale di 0.1 mL.

Il biosensore è stato conservato a 4°C, in tampone fosfato, 50 mM+0.1 M KCl, pH 7.0. La stabilità operativa è stata valutata in FIA, eseguendo iniezioni successive (ogni 150 s) di glucosio allo 0.5 mM; dopo 8 ore, la risposta residua è di $96 \pm 2\%$.

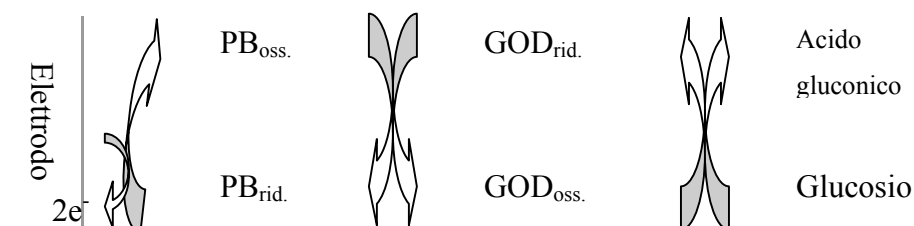


Figura D.4. Rappresentazione grafica del biosensore a glucosio

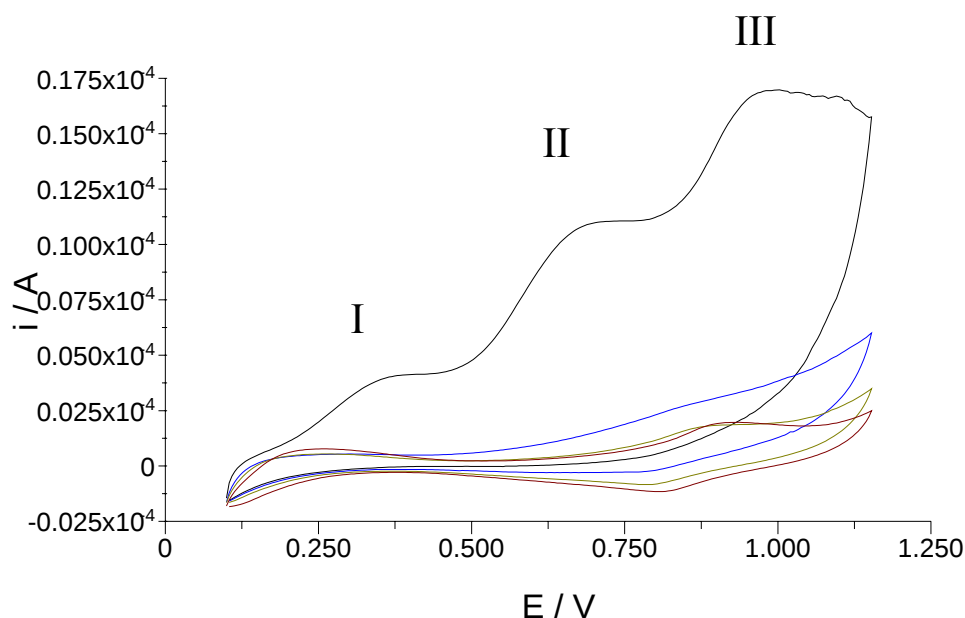


Figura D.5. Co-polimerizzazione all'elettrodo *bPB*; nero-primo ciclo, blu-secondo ciclo, marrone-ottavo ciclo, rosso-decimo ciclo; 15 mV/s.

La Figura D.5 illustra il processo di elettropolimerizzazione che avviene all'elettrodo *bPB*. Il primo picco di ossidazione ($E_p=355$ mV) è dovuto alla trasformazione irreversibile del 2,6-DHN, il secondo ($E_p=625$ mV) rappresenta il processo di ossidazione della AP-EA, mentre il terzo ($E_p=905$ mV) è stato assegnato alla coppia redox PG/PB. Si osserva la formazione del film polimerico non conduttore, in quanto la corrente di ossidazione subisce una diminuzione drammatica, che indica un fenomeno di passivazione della superficie dell'elettrodo di lavoro. Il film formatosi è trasparente e aderisce intimamente all'elettrodo. Il ruolo dei due co-polimeri è complementare. La AP-EA presenta gruppi amminici liberi, adatti per la realizzazione dei legami covalenti/*crosslinking*, mentre il 2,6-DHN ha il ruolo di conferire resistenza allo scheletro polimerico.¹⁹²

Risultati e discussione

Breve caratterizzazione degli elettrodi bPB

Gli elettrodi screen-printed *bulk* modificati con il blu di Prussia, a differenza del lavoro pubblicato da Ricci,¹⁹³ non necessitano nessuna preattivazione prima di effettuare la misura amperometrica dell'acqua ossigenata. Tale fenomeno riportato da Ricci¹⁹⁴ potrebbe essere attribuito alla quantità eccessiva di mediatore incorporato, e da qui la necessità di diminuirlo per via elettrochimica, applicando un potenziale fisso di riduzione (-50 mV vs. l'elettrodo di pseudoriferimento di Ag|AgCl), in presenza di un'elevata concentrazione (1

mM) di H_2O_2 , per 180 s. Nella figura D.6. è rappresentata una tipica voltammetria ciclica dell'elettrodo *bPB-SPE*.

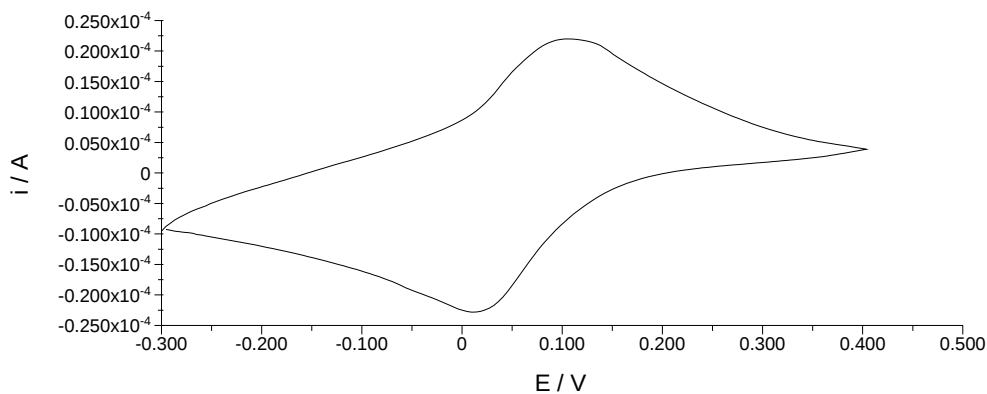


Figura D.6. Voltammetria ciclica in tampone fosfato 50mM+0.1M KCl, pH 7.0; 50 mV/s.

La riproducibilità interelettrodo (RSD=7%, n=6) rientra nei canoni previsti per gli elettrodi serigrafati (RSD≈10%). Il tempo di risposta (5 s per il 90% del segnale) e l'assenza del segnale in presenza di 0.1 mM di acido ascorbico, confermano i dati riportati in letteratura.¹⁹⁵

Misure in FIA del glucosio

Le misure in FIA (Figura D.7.) sono state realizzate iniettando in tampone fosfato, 50 mM+0.1 M KCl, pH 7.0, 0.6 mL/min., soluzioni standard di glucosio e/o di campioni opportunamente diluiti, e registrando il segnale in uscita. Il prodotto di reazione, l'acqua ossigenata, è stata misurata ad un potenziale applicato all'elettrodo di lavoro di -50 mV vs. Ag|AgCl. Le curve di calibrazione vengono costruite misurando l'altezza dei picchi di corrente generata dall'iniezione delle soluzioni standard di glucosio e/o di campioni opportunamente diluiti, dopo la stabilizzazione della corrente di fondo, e riportandone in un grafico il loro valore in corrispondenza della rispettiva concentrazione di glucosio.

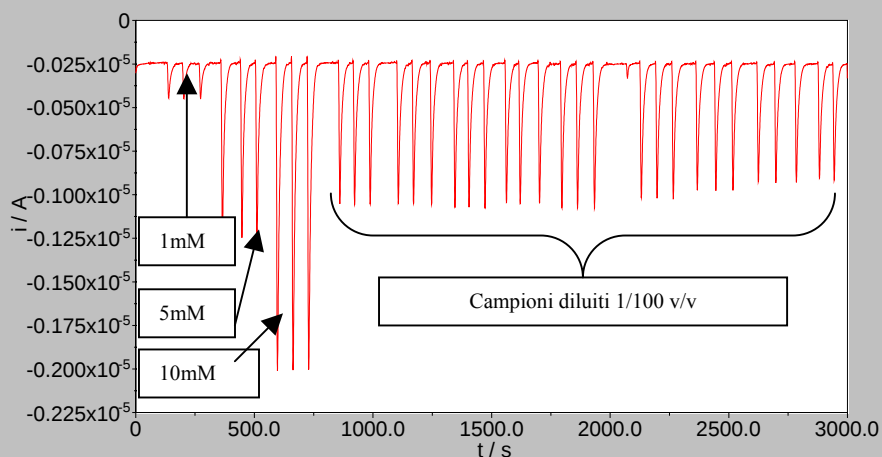


Figura D.7. Analisi in FIA del glucosio; $n=3$, -50 mV vs. Ag/AgCl; 50 mM tampone fosfato, 50mM+0.1M KCl, pH 7.0, 0.6 mL/min, loop: 50 μ L.

L'intervallo lineare di lavoro è compreso fra 7.5×10^{-5} e 1×10^{-2} M, ed il limite di rivelabilità ($\text{LOD}=3.3s/S$, dove s è la deviazione standard e S è la sensibilità) è di 2.1×10^{-5} M. La deviazione relativa standard intra-elettrodo è stata 2.8%.

Misure in FIA del glucosio su campioni reali

Il vino è una matrice molto complessa,¹⁹⁶ e per tale motivo, nelle misure analitiche, si deve ridurre al minimo l'influenza dei vari interferenti che potrebbero alterare il significato analitico dei dati ottenuti. Esistono diversi metodi utilizzati per diminuire l'effetto matrice del campione, quando si eseguono misure elettroanalitiche.^{197,198} Il più semplice è quello di poter diluire il campione. Studi preliminari sono stati eseguiti su campioni di vino Barbera per valutare il recupero del glucosio. Come si osserva dal Grafico D.1., diluizioni di vino rosso Barbera (1/5, 1/25 e 1/50 v/v) sono state valutate, testando in FIA, il biosensore a glucosio. Il recupero è variato, secondo il grado di diluizione (Grafico D.2.); per 1/5 v/v il recupero è stato $191 \pm 134\%$, mentre per diluizioni di vino rosso Barbera 1/25, 1/50 e 1/100 v/v il recupero calcolato è stato $99 \pm 12\%$, $99 \pm 10\%$, e $108 \pm 6\%$, rispettivamente. Nella Tabella D.1. sono stati riassunti i dati ottenuti sullo studio dell'effetto matrice per il vino rosso (Barbera).

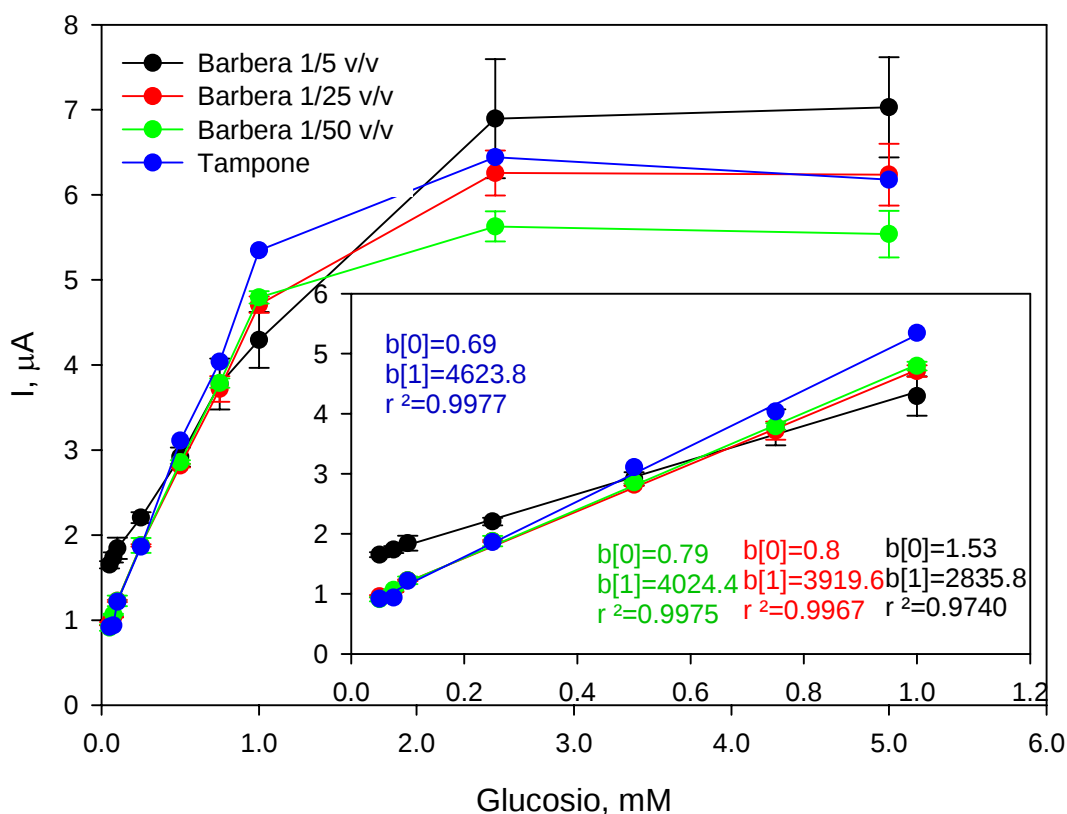


Grafico D.1. Curve di calibrazione in matrice a confronto; $n=3$, -50 mV vs. Ag/AgCl; 50 mM tampone fosfato, 50mM+0.1M KCl, pH 7.0, 0.6 mL/min, *loop*: 50 μ L.

Si osserva che il biosensore ha un buon recupero anche in una matrice diluita 1/25 e 1/50 v/v. Questa caratteristica è attribuibile ad una serie di fattori, che agiscono in modo sinergico:

- la geometria cristallina cubica conferisce selettività per le molecole di H_2O_2 , escludendo eventuali interferenti come l'acido ascorbico e l'acido urico;¹⁹⁹
- la permselettività del film polimerico è a favore dell' H_2O_2 ; l'esclusione dei vari interferenti, come l'acetaminofene e l'acido ascorbico, è stata dimostrata da Badea et al.;²⁰⁰

Per quanto riguarda la stabilità enzimatica; la glucosio ossidasi è uno degli enzimi più spesso investigati, in quanto è molto stabile ed ha un elevato numero di *turnover*.

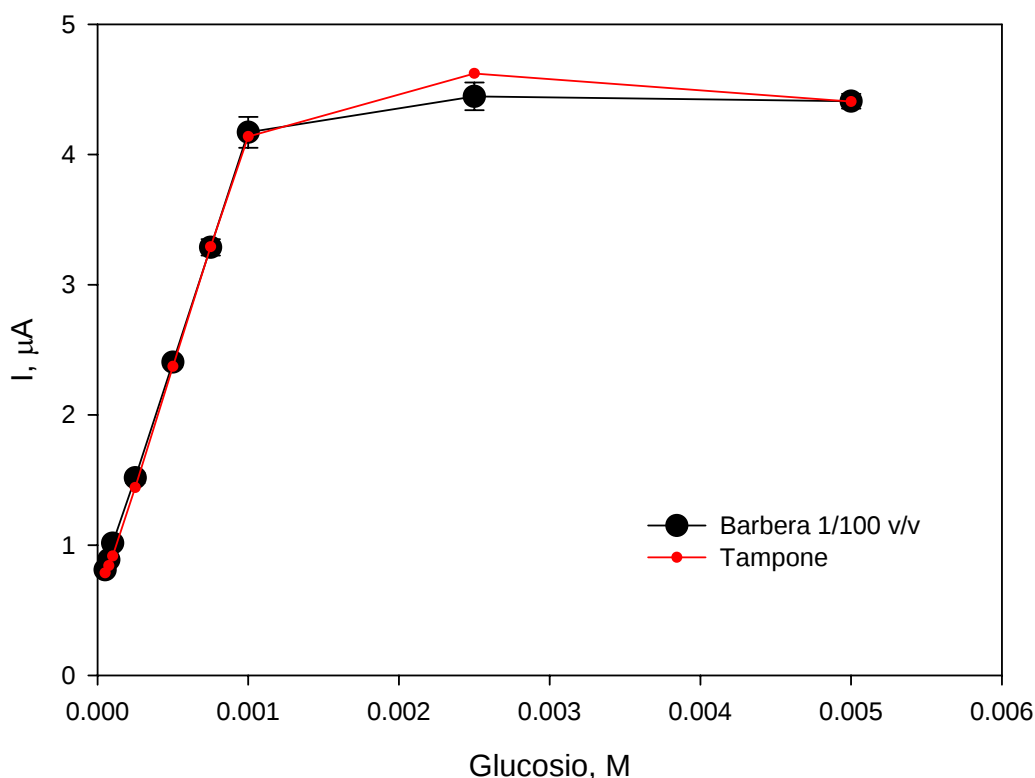


Grafico D.2. Curva di calibrazione in matrice diluita 1/100 v/v; n=3, -50 mV vs. Ag|AgCl; 50 mM tampone fosfato, 50mM+0.1M KCl, pH 7.0, 0.6 mL/min, loop: 50 µL.

Come si osserva dal Grafico D.2., la diluizione ottimale, (*i.e.* l'influenza degli eventuali interferenti presenti in matrice vicina a zero) è stata 1/100 v/v.

Il biosensore a glucosio è stato testato presso l'Università di Ruhr, (Bochum, Germania), durante una fermentazione alcolica condotta in laboratorio, con mosto proveniente da uva Tokay, Ungheria. Nel Grafico D.3. è raffigurato l'andamento del glucosio durante la fermentazione alcolica; la misura è stata effettuata *off line*, con campioni prelevati ad intervalli regolari di tempo. I primi dieci raccolti campioni vengono diluiti 1/250 v/v, mentre per i rimanenti sedici, la diluizione è di 1/100 v/v. Viste le alte concentrazioni di partenza (≈ 200 g/L) e residue (≈ 50 g/L) del glucosio nel mosto di uva Tokay, il biosensore si è dimostrato adatto per la misura del glucosio durante la fermentazione alcolica.

Tabella D.1. Studio dell'effetto matrice su di un vino rosso (Barbera); %RSD-deviazione relativa standard, %RE-errore relativo

Glucosio aggiunto [M], 1\100 v\v	RSD, %	RE, %	Glucosio trovato, [M]	Glucosio aggiunto [M], 1\50 v\v	RSD, %	RE, %	Glucosio trovato, [M]
5.0e ⁻⁵	1.0	+23	6.5e ⁻⁵	5.0e ⁻⁵	2.4	-4	4.8e ⁻⁵
7.5e ⁻⁵	0.8	+16	8.7e ⁻⁵	7.5e ⁻⁵	0.5	+9	8.2e ⁻⁵
1.0e ⁻⁴	1.0	+20	1.2e ⁻⁴	1.0e ⁻⁴	3.0	+20	1.2e ⁻⁴
2.5e ⁻⁴	1.5	+4	2.6e ⁻⁴	2.5e ⁻⁴	2.7	+4	2.6e ⁻⁴
5.0e ⁻⁴	1.0	+2	5.1e ⁻⁴	5.0e ⁻⁴	0.4	-6	4.7e ⁻⁴
7.5e ⁻⁴	1.0	+1	7.6e ⁻⁴	7.5e ⁻⁴	0.8	-106	6.7e ⁻⁴
1.0e ⁻³	1.7	±0	1.0e ⁻³	1.0e ⁻³	0.9	-110	8.9e ⁻⁴
Glucosio aggiunto [M], 1\25 v\v	RSD, %	RE, %	Glucosio trovato, [M]	Glucosio aggiunto [M], 1\5 v\v	RSD, %	RE, %	Glucosio trovato, [M]
5.0e ⁻⁵	1.2	+16	5.8e ⁻⁵	5.0e ⁻⁵	1.4	+320	2.1e ⁻⁴
7.5e ⁻⁵	0.3	±0	7.5e ⁻⁵	7.5e ⁻⁵	2.0	+206	2.3e ⁻⁴
1.0e ⁻⁴	0.6	+20	1.2e ⁻⁴	1.0e ⁻⁴	4.0	+150	2.5e ⁻⁴
2.5e ⁻⁴	0.5	+4	2.6e ⁻⁴	2.5e ⁻⁴	1.6	+32	3.3e ⁻⁴
5.0e ⁻⁴	0.4	-8	4.6e ⁻⁴	5.0e ⁻⁴	2.2	-4	4.8e ⁻⁴
7.5e ⁻⁴	2.4	-12	6.6e ⁻⁴	7.5e ⁻⁴	4.6	-106	6.7e ⁻⁴
1.0e ⁻³	1.2	-13	8.7e ⁻⁴	1.0e ⁻³	4.4	-22	7.8e ⁻⁴

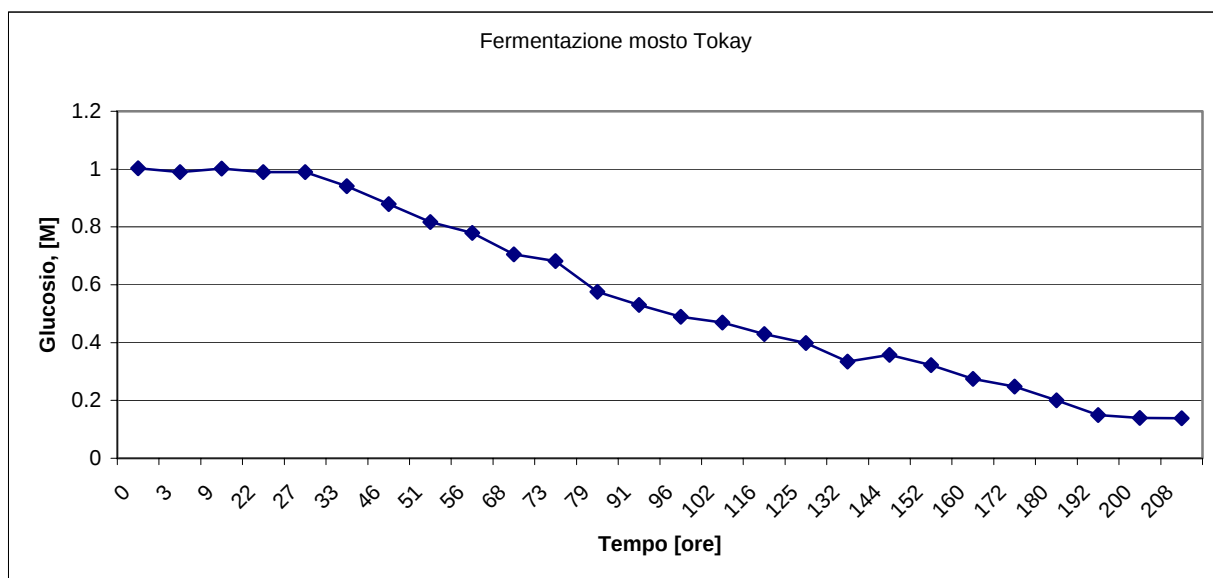


Grafico D.3. Andamento fermentativo di un mosto Tokay; n=3.

Conclusioni

Le caratteristiche degli elettrodi screen-printed modificati con il blu di Prussia sono vantaggiose in quanto sono paragonabili in termini di sensibilità con gli elettrodi classici di Pt impiegati per la misura dell'acqua ossigenata, ma sono meno sensibili alle interferenze elettrochimiche, in quanto operano ad un potenziale di lavoro basso (-50 mV vs. Ag|AgCl).

Gli elettrodi screen-printed *bulk* modificati con il blu di Prussia producono una diminuzione del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro di 700 mV, rispetto al elettrodo classico di Pt.²⁰¹

Il biosensore a glucosio qui descritto è adatto per eseguire misure in FIA su campioni di mosto/vino ricchi in glucosio, come il Tokay, in quanto presenta un intervallo dinamico di lavoro compreso tra 7.5×10^{-5} e 1×10^{-2} M (glucosio).

Il film polimerico non conduttore protegge il sensore dagli eventuali interferenti presenti nei campioni di vino, agendo da barriera fisica. Allo stesso tempo è la matrice in cui l'enzima viene intrappolato all'elettrodo. Questo metodo di immobilizzazione è rapido e facile, ed offre all'operatore la possibilità di ottenere biosensori con risposta stabile e sensibile.

Conclusioni generali

Il lavoro di questa tesi di dottorato di ricerca è stato rivolto verso lo sviluppo di nuovi sensori e biosensori elettrochimici basati su elettrodi a stampa serigrafica, per la determinazione di analiti di interesse alimentare, come il glicerolo, il glucosio e l'acido L-lattico. Sono stati costruiti sensori a NADH basati sull'impiego del Meldola blu, della Variamine blue e della NADH ossidasi.

Le caratteristiche elettroanalitiche del sensore a NADH basato sull'utilizzo del Meldola Blue, fosfato di zirconio ed il sale di Reinecke si sono dimostrate molto promettenti per lo sviluppo futuro di biosensori basati sugli enzimi NAD^+ dipendenti. L'elettrodo *bMBZrPRs* ha mantenuto la sua attività catalitica verso il NADH, ed usato in FIA, ha mostrato una buona stabilità operativa (10^{-4} M di NADH, RSD=4.2%, n=90). Inoltre, è stato dimostrato che la deposizione elettrochimica del sale di Reinecke migliora le proprietà del sensore a NADH. Il sensore a NADH è stato accoppiato alla glicerolo deidrogenasi per realizzare un biosensore a glicerolo. Le misure effettuate su campioni contenenti glicerolo, hanno dimostrato il potenziale impiego degli elettrodi *bMBZrPRs* come base per la costruzione di diversi biosensori basati su deidrogenasi NAD^+/NADH dipendenti.

La proprietà della NADH ossidasi da *Thermus thermophilus* di rigenerare il NAD^+ , in un ampio intervallo di pH, è stata una delle tante caratteristiche che l'hanno resa adatta ad essere utilizzata nella costruzione di biosensori NAD^+ -dipendenti. Anche le caratteristiche degli elettrodi *screen-printed* modificati con il blu di Prussia presentano dei vantaggi, in quanto sono paragonabili in termini di sensibilità agli elettrodi classici di Pt impiegati per la misura dell'acqua ossigenata, ma sono più selettivi nei confronti di potenziali interferenti elettrochimici, in quanto operano ad un potenziale di lavoro basso (-50 mV vs. Ag|AgCl). Inoltre, la possibilità di co-immobilizzare la glicerolo deidrogenasi e la NADH ossidasi, è molto promettente per eventuali biosensori di questo tipo.

L'immobilizzazione del mediatore Variamine blue su nanotubi di carbonio ha permesso di ottenere degli elettrodi modificati per la misura del NADH. I differenti sensori sono tutti in grado di catalizzare l'ossidazione del NADH a basso potenziale applicato, con caratteristiche analitiche adatte per la realizzazione di biosensori. Tra le diverse configurazioni adottate, è certamente da preferire l'immobilizzazione chimica del mediatore rispetto all'adsorbimento sui nanotubi, poiché ciò consente un tempo di vita maggiore del sensore. Questo approccio potrebbe consentire la realizzazione di sensori modificati con enzimi e mediatori direttamente su nanotubi. L'accoppiamento tra un sensore per NADH con

Variamine blue immobilizzata covalentemente e l'enzima L-lattato deidrogenasi è risultato in un biosensore ad acido lattico che deve essere ulteriormente caratterizzato.

Gli elettrodi screen-printed *bulk* modificati con il blu di Prussia producono una diminuzione del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro di 700 mV, rispetto al elettrodo classico di Pt. Il biosensore a glucosio qui descritto è stato adatto per eseguire misure in FIA su campioni di mosto/vino ricchi in glucosio, come il Tokay, in quanto presenta un intervallo dinamico di lavoro compreso tra 7.5×10^{-5} e 1×10^{-2} M (glucosio). Il film polimerico non conduttore protegge il sensore dagli eventuali interferenti presenti nei campioni di vino, agendo da barriera fisica. Allo stesso tempo è la matrice in cui l'enzima viene intrappolato all'elettrodo. Questo metodo di immobilizzazione è rapido e facile, ed offre all'operatore la possibilità di ottenere biosensori con risposta stabile e sensibile.

Bibliografia

- ¹ L.C. Clark, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 2 (1956) 41
- ² L.C. Clark e C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29
- ³ G.G. Guilbault e J. Montalvo, *JACS* 91 (1969) 2164
- ⁴ K. Mosbach e B. Danielsson, *Biochim. Biophys. Acta* 364 (1974) 140
- ⁵ C. Divis, *Annals of Microbiology* 126A (1975) 175
- ⁶ B. Liedberg, C. Nylander, I. e Lundstrm, *Sens. Actuators* 4 (1983) 299
- ⁷ T. Vo-Dinh, et al., *J. of Nanoparticle Research* 2 (2000) 17
- ⁸ D.R. Thévenot, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121
- ⁹ F. Wu, Y. Huang, e C. Huang, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 518
- ¹⁰ F.S. Felix, M. Yamashita, e L. Angnes, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2283
- ¹¹ R. Burlage e C.T. Kuo, *Annu. Rev. Microbiol.* 48 (1994) 291
- ¹² S.F. D'Souza, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 337
- ¹³ D.P. Barondeau et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3522
- ¹⁴ K.B. Wu et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 205
- ¹⁵ A.J. Baeumner et al., *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 405
- ¹⁶ T.M.A. Gronewold et al., *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2044
- ¹⁷ V. Carunchio editore, *Biotechnologie e Chimica Analitica*, 2001, Aracne editrice
- ¹⁸ B. Henrissat, T.T. Teeri, e R.A.J. Warren, *FEBS Lett.* 425-2 (1998) 352
- ¹⁹ D.C. Cullen, R.S. Sethi, e C.R. Lowe, *Anal. Chim. Acta* 231 (1990) 33
- ²⁰ L.D. Watson et al., *Biosensors* 3 (1988) 101
- ²¹ A.E.G. Cass, *Biosensors: A Practical Approach*, 1990, IRL Press, Oxford
- ²² P. Wald e S. Ichikawa, *Biomolecular Engineering* 18 (2001) 143
- ²³ B.R. Eggins, *Biosensors: An introduction*, 1996, John Wiley&Sons Ltd
- ²⁴ R. Rajagopalan, A. Aoki, e A. Heller, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 3719
- ²⁵ P.C. Paney e A.P. Mishra, *Sens. Actuators B* 99 (2004) 230
- ²⁶ M. Badea, A. Curuli, e G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* 5-6 (2003) 689
- ²⁷ N.K. Chaki e K. Vijayamohanan, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1
- ²⁸ W. Boireau et al., *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1631
- ²⁹ B.R. Ekins, *Chem. Sens. and Biosens.*, (2002) John Wiley and Sons, Ltd.
- ³⁰ C.K. Matthews, K.E. van Holde, e K.G. Ahern, *Biochimica* (2004) 3^a ed., Ambrosiana, Milano
- ³¹ http://venus.unive.it/miche/cicli_ecosis/0057.htm
- ³² E. Akyilmaz e E. Dinckaya, *Talanta* 61 (2003) 113

-
- ³³ http://it.wikipedia.org/wiki/Flavin_adenina_dinucleotide
- ³⁴ A.E.G. Cass et al., *Anal. Chem.* 56 (1984) 667
- ³⁵ A.E.G. Cass et al., *J. Eletroanal. Chem.* 190 (1985) 117
- ³⁶ B.R. Eggins, *Biosensors: An introduction*, 1996, John Wiley&Sons Ltd
- ³⁷ B. Grundig, *J. Eletroanal. Chem.* 395 (1995) 143
- ³⁸ B. Prieto-Simon e E. Fabregas, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1131
- ³⁹ M.J. Eddowesand e H.O.A. Hill, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1977) 771
- ⁴⁰ P.Yeh e T. Kuwana, *Chem. Lett.* (1977) 1145
- ⁴¹ M.R. Tarasevich et al., *Bioelectrochem. Bioeng.* 6 (1979) 393
- ⁴² A.I. Yaropolov et al., *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 249 (1979) 1399
- ⁴³ W. Zhang e G. Li, *Anal. Sciences* 20 (2004) 603
- ⁴⁴ W.J. Albery, D.H. Cranston, Turner APF, Karube I, Wilson GS (Ed.). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford: Oxford University Press; 1987. p. 180-210
- ⁴⁵ P.N. Bartlett et al., (1987) *J. Chem Soc. Chem Commun.* 4 (1987) 1605
- ⁴⁶ S. Reiter, K. Habermuller, e W. Schuhmann, *Sens. Actuators B* 79 (2001) 150
- ⁴⁷ D.R. Thevenot et al., *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121
- ⁴⁸ J. Inczedy, T. Lengyel, e A.M. Ure, *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature* 3rd edition (1998) Blackwell Science, Oxford
- ⁴⁹ K. Toth et al., *Pure Appl. Chem.* 76-6 (2004) 1119
- ⁵⁰ D.R. Thevenot et al., *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121
- ⁵¹ J. Inczed, T. Lengyel, e A.M. Ure, *Compendium of Analytical Nomenclature (definitive rules 1998) (the "Orange Book")*, 3rd ed., (1998) Blackwell Science, Oxford
- ⁵² D.R. Thevenot et al., *Anal. Chem.* 51 (1979) 96
- ⁵³ D.R. Thévenot, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121
- ⁵⁴ K. Toth et al., *Pure Appl. Chem.* 76-6 (2004) 1119
- ⁵⁵ M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, S. Alegret, *Sens. Actuators B* 69 (2000) 153
- ⁵⁶ <http://www.asis-onlus.it/archivi/archivio/storia.htm>
- ⁵⁷ H.J. Liu et al., *Sens. Actuators B* 13-14 (1993) 610
- ⁵⁸ P. Umadevi et al., *Sens. Actuators A* 39 (1993) 59
- ⁵⁹ M.F. Cardosi, S.W. Birch, *Anal.Chim. Acta* 276 (1993) 69
- ⁶⁰ S.A. Wring, J.P. Hart, *Analyst* 117 (1992) 1281
- ⁶¹ H.B. White III, *Evolution of Doenzymes and the origin of Pyridine Nucleotides*, (1982) Academic Press N.Y.
- ⁶² M.J. Lobo, A.J. Mirando, P. Tunon, *Electroanalysis* 9 (1997) 191

-
- ⁶³ W.Blaedel, R. Jenkins, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1331
- ⁶⁴ L. Bartalits, G. Nagy, E. Pungor, *Clin. Chem.* 30 (1984) 1780
- ⁶⁵ H.K. Chenault and G.M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14 (1987) 147
- ⁶⁶ L. Gorton and E. Dominguez, *Rev. in Molec. Biotech.* 82 (2002) 371
- ⁶⁷ D. Dicu et al., *Anal. Lett.* 36-9 (2003) 1755
- ⁶⁸ W.J. Albery and A.R. Hillman, *J. Electroanal. Chem.* 170 (1984) 27
- ⁶⁹ W.J. Albery and A.R. Hillman, *J. Electroanal. Chem.* 170 (1984) 27
- ⁷⁰ B.W. Carlson and L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 479
- ⁷¹ A. Kitani and L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3595
- ⁷² A. Kitani, Y.-H. So, L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 7636
- ⁷³ A. Vasilescu et al., *Talanta* 59 (2003) 751
- ⁷⁴ A. Torstensson and L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 130 (1981) 199
- ⁷⁵ N. Murthy, A. Surya, A. Anita, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33 (1994) 71
- ⁷⁶ P.C. Pandey et al., *Anal. Biochem.* 260 (1998) 195
- ⁷⁷ E. Katz et al., *J. Electroanal. Chem.* 373 (1994) 189
- ⁷⁸ F. Pariente et al., *Anal. Chem.* 68 (1996) 3135
- ⁷⁹ M.I. Alvarez-Gonzalez et al., *Anal. Chem.* 72 (2000) 520
- ⁸⁰ N. de los Santos Alvarez et al., *J. Electroanal. Chem.* 502 (2001) 109
- ⁸¹ N. Mano and A. Kuhn, *Eletochem. Commun.* 1 (1999) 497
- ⁸² N. Mano and A. Kuhn, *J. Eletroanal. Chem.* 477 (1999) 79
- ⁸³ N. Mano and A. Kuhn, *J. Eletroanal. Chem.* 498 (2001) 58
- ⁸⁴ M.M. Baizer and H. Lund, *Organic Electrochemistry* (1983) Marcel Dekker New York
- ⁸⁵ N. Mano and A. Kuhn, *J. Eletroanal. Chem.* 498 (2001) 58
- ⁸⁶ L. Campanella et al., *J. Mol. Catal.* 43 (1987) 153
- ⁸⁷ P.N. Bratlett, P.R. Birkin, E.N.K. Wallace, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 93 (1997) 1951
- ⁸⁸ N.F. Atta, A. Galal, E. Karagozler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 19 (1990) 1347
- ⁸⁹ M. Somasundrum, J. Hall, J.V. Bannister, 295 (1994) 47
- ⁹⁰ F. Tobalina et al., *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 15
- ⁹¹ F.L.Rodkey, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 188
- ⁹² L.T. Kubota and L. Gorton, *Electroanalysis* 11 (1999) 719
- ⁹³ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ⁹⁴ L. Gorton et al., *J. Electroanal. Chem.* 161 (1984) 103
- ⁹⁵ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ⁹⁶ A. Avramescu et al., *Talanta* 59 (2003) 751

-
- ⁹⁷ A. Avramescu et al., *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 203
- ⁹⁸ T. Larsson, A. Lindgren, T. Ruzgas, *Bioelectrochemistry* 53 (2001) 243
- ⁹⁹ H.-Z. Bu, S.R. Mikkelsen, A.M. English, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4320
- ¹⁰⁰ C. Ramirez-Molina, M. Boujita, N. El Murr, *Electroanalysis* 13 (2003) 1095
- ¹⁰¹ Y. Saeki, M. Nozaki, K. Matsumoto, *J. Biochem.* 98 (1985) 1433
- ¹⁰² H.L. Schmidt et al., *Eur J. Biochem.* 156 (1986) 149
- ¹⁰³ H.J. Park et al., *Eur. J. Biochem.* 205 (1992) 875
- ¹⁰⁴ C.J. McNeil et al., *Anal. Chem.* 61 (1989) 25
- ¹⁰⁵ D. Compagnone et al., *Enz. and Microb. Tech.* 17 (1995) 472
- ¹⁰⁶ M. Montagne and J.L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 297
- ¹⁰⁷ S. Cosnier et al., *Anal. Chem.* 69 (1997) 3095
- ¹⁰⁸ H. Gunther et al., *J. Biotech.* 83 (2000) 253
- ¹⁰⁹ I. Katakis and E. Dominguez, *Microchim. Acta* 126 (1997) 11
- ¹¹⁰ L. Gorton and E. Dominguez, *Rev. in Molec. Biotech.* 82 (2002) 371
- ¹¹¹ P.A. Henschke e V. Jiranek (eds) (1992) *Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology*. Camberwell, Harwood Academic Publishers
- ¹¹² F.D. Munteanu, L.T. Kubota, e L. Gorton *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ¹¹³ C.V. Kumar e A. Chaudgari, *Micropor. Mesopor. Mat.* 41 (2000) 307
- ¹¹⁴ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, e L. Gorton *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ¹¹⁵ A. Dyer, T. Shaheen, M. Zamin, *J. Mater. Chem.* 7 (1997) 1895
- ¹¹⁶ E.M. Larssen e D.L. Vissers, *J. Phys. Chem.* 64 (1960) 1732
- ¹¹⁷ L. Gorton et al., *J. Electroanal. Chem.* 161 (1984) 103
- ¹¹⁸ J. Zhang et al, *Anal. Chim. Acta* 388 (1999) 71
- ¹¹⁹ G. Bremle, B. Persson, e L. Gorton, *Electroanalysis* 3 (1991) 77
- ¹²⁰ B. Persson e L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 292 (1990) 115
- ¹²¹ A. Avramescu et al., *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 81
- ¹²² L.T. Kubota e L. Gorton, *Electroanalysis* 11 (1999) 719
- ¹²³ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, e L. Gorton *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ¹²⁴ G. Nagy et al., *Sens. Actuat. B* 24-25 (1995) 323
- ¹²⁵ W. Schuhmann et al., *J. Biotech.* 27 (1993) 129
- ¹²⁶ A. Vasilescu et al., *Talanta* 59 (2003) 751
- ¹²⁷ A. Vasilescu et al., *Talanta* 59 (2003) 751
- ¹²⁸ Z. Galus, (1976) *Fundamentals of Electrochemical analysis*, Ellis Horwood Press: New York

-
- ¹²⁹ B. Grundig et al., *J. Electroanal. Chem.* 395 (1995) 143
- ¹³⁰ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, e L. Gorton *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ¹³¹ L. Gorton et al., *J. Electroanal. Chem.* 161 (1984) 103
- ¹³² B. Persson e L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 292 (1990) 115
- ¹³³ M.E. Ghica e C. Brett, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1527
- ¹³⁴ J. Katrlík et al., *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 11
- ¹³⁵ A. Eftekhari, *Sens. Actuators. B* 80 (2001) 283
- ¹³⁶ I. Lapenaite et al., *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 140
- ¹³⁷ M. Niculescu, S. Sigina e E. Csoregi, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1721
- ¹³⁸ K. Itaya, N. Shoji, e I. Uchida, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3423
- ¹³⁹ S. Ijima, *Nature* 354 (1991) 56
- ¹⁴⁰ S. Ijima e T. Ichihashi, *Nature* 363 (1993) 603
- ¹⁴¹ H. J. Dai et al., *Chem. Phys. Lett.* 260 (1996) 471
- ¹⁴² E. Tamburri et al., *Carbon* 43 (2005) 1213
- ¹⁴³ *Pure&Appl. Chem.*, 50 (1978) 463, Pergamon Press Ltd., Oxford
- ¹⁴⁴ E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979) 19
- ¹⁴⁵ F.D. Munteanu, L.T. Kubota, e L. Gorton *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2
- ¹⁴⁶ L.T. Kubota et al., *Langmuir* 11 (1995) 1009
- ¹⁴⁷ L.T. Kubota et al., *Langmuir* 11 (1995) 1009
- ¹⁴⁸ P. Cabras e A. Martelli, *Chimica degli alimenti* 2004 Piccin
- ¹⁴⁹ S. Yabuki et al., *Sens. Actuators B* 65 (2000) 49
- ¹⁵⁰ A. Malinauskas et al., *Mat. Sc. and Eng.* 24 (2004) 513
- ¹⁵¹ L. Fernández et al., *Anal. Chim. Acta* 327 (1996) 253
- ¹⁵² M. Gerlache et al., *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3467
- ¹⁵³ K. Matsumoto e K. Waki, *Anal. Chim. Acta* 380 (1999) 1
- ¹⁵⁴ X. Liu e J. Zweier, *Free Rad. Biol. and Med.* 31 (2001) 894
- ¹⁵⁵ L. Haiying et al., *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 187
- ¹⁵⁶ R. Matos et al., *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 73
- ¹⁵⁷ F. Yin et al., *Talanta* 67 (2005) 221
- ¹⁵⁸ C. Xingpin, L. Hong e L. Xiangqin, *J. of Electroanal. Chem.* 526 (2002) 115
- ¹⁵⁹ L. Zhang et al., *Biosen. and Bioel.* 21 (2005) 337
- ¹⁶⁰ T. Ivandini et al, *Diamond & Related Mat.* 14 (2005) 2133
- ¹⁶¹ P.J. O'Connell, C.K. O'Sullivan e G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* 373 (1998) 261
- ¹⁶² A. Karyakin e E. Karyakina, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 268

-
- ¹⁶³ A. Karyakin, E. Karyakina e L. Gorton, *Talanta* 43 (1996) 1597
- ¹⁶⁴ L. Gorton et al., *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 91
- ¹⁶⁵ B.R. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors 2002* J. Wiley & Sons Ltd.
- ¹⁶⁶ A. Cagnini et al., *Sens. Actuators B* 24-25 (1995) 85
- ¹⁶⁷ V.D. Neff, *J. Electrochem. Soc.* 886 (1978) 128
- ¹⁶⁸ J.F. Duncan e P.W.R. Wrigley, *J. Chem. Soc.* (1963) 1120
- ¹⁶⁹ A.A. Karyakin e E.E. Karyakina, *Russ. Chem. Bull.* 50 (2001) 1811
- ¹⁷⁰ J.F. Keggin e F.D. Miles, *Nature* 137 (1936) 577
- ¹⁷¹ F. Herren et al., *Inorg. Chem.* 19 (1980) 956
- ¹⁷² A.A. Karyakin e E.E. Karyakina, *Russ. Chem. Bull.* 50 (2001) 1811
- ¹⁷³ A.A. Karyakin e E.E. Karyakina, *Russ. Chem. Bull.* 50 (2001) 1811
- ¹⁷⁴ A.A. Karyakin e E.E. Karyakina, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 268
- ¹⁷⁵ A.A. Karyakin, E.E. Karyakina e L. Gorton, *Electrochem. Comm.* 1 (1999) 78
- ¹⁷⁶ A.A. Karyakin, O.V. Gitermacher e E.E. Karyakina, *Anal. Lett.* 27 (1994) 2861
- ¹⁷⁷ A.A. Karyakin e E.E. Karyakina, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 268
- ¹⁷⁸ A.A. Karyakin, E.E. Karyakina e L. Gorton, *Talanta* 43 (1996) 1597
- ¹⁷⁹ R. Garjonyte et al., *Sens. and Act. B* 79 (2001) 33
- ¹⁸⁰ M. Yuqing, C. Jianrong e W. Xiaohua, *Trends in Biotech.* 22 (2004) 227
- ¹⁸¹ J.C. Vidal et al, *Microchim. Acta* 143 (2003) 93
- ¹⁸² M. Gerard et al., *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 345
- ¹⁸³ V. Saxena e B.D. Malhotra, *Curr. Appl. Phys.* 3 (2003) 293
- ¹⁸⁴ S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 443
- ¹⁸⁵ F. Palmisano et al., *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 586
- ¹⁸⁶ I. Carelli et al., *Anal. Sci.* 41 (1996) 1793
- ¹⁸⁷ D.H. Jang et al., *Bull. Korean Chem. Soc.* 16 (1995) 392
- ¹⁸⁸ A. Guerrieri et al., *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 103
- ¹⁸⁹ T.D. Chung et al., *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 1079
- ¹⁹⁰ F. Ricci et al., *Anal. Chim. Acta*, 485 (2003), 111
- ¹⁹¹ M. Badea, A. Curulli e G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 689
- ¹⁹² M. Badea, A. Curulli e G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 689
- ¹⁹³ F. Ricci et al., *Anal. Chim. Acta* 485 (2003), 111
- ¹⁹⁴ F. Ricci et al., *Anal. Chim. Acta* 485 (2003), 111
- ¹⁹⁵ F. Ricci et al., *Anal. Chim. Acta* 485 (2003), 111
- ¹⁹⁶ P. Cabras e A. Martelli, *Chimica degli alimenti 2004* Piccin

-
- ¹⁹⁷ A. Avramescu et al, Anal.Chim. Acta 458 (2002) 203
- ¹⁹⁸ M. Arif et al., The Analyst 127 (2002) 104
- ¹⁹⁹ K. Itaya, T. Ataka e S. Toshima, J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 2767
- ²⁰⁰ M. Badea, A. Curulli e G. Palleschi, Biosens. Bioelettron. 18 (2003) 689
- ²⁰¹ M. Badea, A. Curulli e G. Palleschi, Biosens. Bioelettron. 18 (2003) 689