

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTA' DI CHIMICA INDUSTRIALE
Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
(Ciclo XX)

Settore scientifico disciplinare di afferenza: Chimica Analitica CHIM/01

**SVILUPPO DI BIOSENSORI:
MODIFICHE DI SUPERFICI ELETTRODICHE E
SISTEMI DI IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA**

Presentata da: Dott.ssa Adriana Mignani

Coordinatore
Prof. Vincenzo Balzani

Relatore
Prof.ssa Domenica Tonelli

Esame finale anno 2008

CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE	
1.1 PREMESSA: MOTIVAZIONE E RISULTATI DELLA RICERCA	1
1.2 ARGILLE	6
1.2.1 ARGILLE CATIONICHE	8
1.2.2 ARGILLE ANIONICHE	8
1.3 IDROTALCITI	9
1.4 BIOSENSORI	15
1.5 ENZIMI	20
BIBLIOGRAFIA	24
CAPITOLO 2	
PARTE SPERIMENTALE	
2.1 STRUMENTAZIONE E REAGENTI	27
2.2 PREPARAZIONE DEGLI ELETTRODI	30
2.3 ELETTROSINTESI DELL' HT Ni/Al-NO ₃	31
2.4 PREPARAZIONE DEI BIOSENSORI	32
2.4.1 IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA	33
2.4.1.1 IMMOBILIZZAZIONE FISICA	34
2.4.1.2 IMMOBILIZZAZIONE CHIMICA	35
2.4.2 SISTEMI DI STABILIZZAZIONE UTILIZZATI	36
2.5 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO	46
BIBLIOGRAFIA	51
CAPITOLO 3	
3.1 CARATTERIZZAZIONE DELL'HT	53
3.2 ELETTROSINTESI (SOLUZIONE A)	54
3.2.1 SEM/EDS	55
3.2.2 VOLTAMMETRIA CICLICA (CV)	58
3.2.3 XRD	62
3.2.4 AFM	63
3.3 ELETTROSINTESI (SOLUZIONE B)	64
3.3.1 XRD	66
3.3.2 AFM	67
3.3.3 CV	67
3.3.4 SEM/EDS	69
3.3.5 SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC	69
BIBLIOGRAFIA	72
CAPITOLO 4	
4.1 CARATTERIZZAZIONE BIOSENSORI	73
4.1.1 SEM/EDS	74
4.1.2 SECM	76
4.1.3 AFM	79
4.1.4 SPETTROSCOPIA DI FOTOELETTRONI A RAGGI X (XPS)	80
BIBLIOGRAFIA	84

CAPITOLO 5	
STUDIO DEI PARAMETRI DI LAVORO E FABBRICAZIONE DEI BIOSENSORI	
5.1.	STUDIO PRELIMINARE 86
5.1.1	RIVELAZIONE AMPEROMETRICA DEL PEROSSIDO DI IDROGENO 86
5.1.2	RESPONSO AL GLUCOSIO DI ELETTRODI DI PT MODIFICATI SOLO CON L'ENZIMA 92
5.2	OTTIMIZZAZIONE DELLE PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE Pt-(HT-GO _x)-GA-BSA 94
5.2.1	QUANTITÀ DI ENZIMA IN SOLUZIONE 94
5.2.2	DURATA DI ELETTROSINTESI DELLA HT 95
5.2.3	EFFETTO DEL pH, DELLA TEMPERATURA E DEL POTENZIALE 97
5.2.4	TEMPO DI VITA E STOCCAGGIO 101
5.3	PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE NELLE CONDIZIONI OPERATIVE OTTIMALI 101
BIBLIOGRAFIA 104	
CAPITOLO 6	
OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI DI FABBRICAZIONE MEDIANTE EXPERIMENTAL DESIGN 105	
6.1	EXPERIMENTAL DESIGN 106
BIBLIOGRAFIA 113	
CAPITOLO 7	
PLATINATURA	
7.1	PREPARAZIONE DELL'ELETTRODO 115
7.2	DETERMINAZIONE DELL'AREA ELETTROATTIVA 115
7.3	PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE Pt platinato – HT+GO _x 118
BIBLIOGRAFIA 119	
CAPITOLO 8	
8.1	SISTEMI DI STABILIZZAZIONE ENZIMATICA 120
8.1.1	CARATTERIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC 121
8.1.2	CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRANE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC 122
8.1.3	CONFRONTO DELLE PRESTAZIONI DEI DIVERSI SISTEMI DI STABILIZZAZIONE ENZIMATICA 124
BIBLIOGRAFIA 127	
CAPITOLO 9	
9.1	STUDIO DEGLI INTERFERENTI 128
9.2	APPLICAZIONE IN CAMPIONI REALI 131
9.2.1	ANALISI DI BEVANDE 131
9.2.2	ANALISI DI SIERO BOVINO 132
9.3	MIGLIORAMENTO DELLA SELETTIVITÀ TRAMITE LA PRE-OSSIDAZIONE DEGLI INTERFERENTI: BIOSENSORE BIENZIMATICO 133

INDICE

9.4	ANALISI IN MATRICI REALI	135
	BIBLIOGRAFIA	137
CAPITOLO 10		
	OSSIDAZIONE DELL'HT Ni/Al-NO ₃	138
10.1	PREPARAZIONE DEGLI ELETTRODI MODIFICATI CON HT E HT OSSIDATA	139
10.2	CONFRONTO DEI SENSORI MODIFICATI CON HT E HT OSSIDATA	139
10.3	BIOSENSORI Pt-HT _{ox} +GO _x E Pt-HT+GO _x	143
	BIBLIOGRAFIA	145
CAPITOLO 11		
	CONCLUSIONI	146
APPENDICE		
	TECNICHE ELETTROCHIMICHE UTILIZZATE	A1
A.1	CRONOAMPEROMETRIA E CRONOCOLUMBOMETRIA	A3
A.2	VOLTAMMETRIA A SCANSIONE LINEARE DEL POTENZIALE E VOLTAMMETRIA CICLICA	A5
A.3	ELETTRODO A DISCO ROTANTE (RDE)	A7
A.4	ACCENNI DI ALTRE TECNICHE	A13
A.4.1	MICROSCOPIO A SCANSIONE ELETTROCHIMICA (SECM)	A13
A.4.2	SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA IN CORRENTE ALTERNATA (EIS)	A20
	BIBLIOGRAFIA	A26

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 PREMessa: MOTIVAZIONE E RISULTATI DELLA RICERCA

Il diabete rappresenta una delle principali patologie cliniche, è stimato che circa il 9% delle morti nel mondo sia dovuto a diabete e con il passare degli anni si sta osservando un aumento vertiginoso del numero di persone affette da tale malattia.

Secondo quanto stimato dalla “World Health Organisation” (WHO), i 177 milioni di diabetici nel 2000 raggiungeranno i 300 milioni nel 2025.

La misura rapida e accurata della glicemia e, se possibile, a prezzi contenuti, è di fondamentale importanza sia per il controllo ospedaliero, che per l’autocontrollo domiciliare dei pazienti.

Un efficace supporto a questa attività è fornito dai glucometri, dispositivi abbastanza economici, specifici e dotati di un’ottima sensibilità di risposta. È necessario, però, considerare che questi dispositivi possono andare incontro ad alcuni errori di misura, dovuti a interferenze. Tali interferenze possono alterare la correttezza dei risultati, esponendo i pazienti a conseguenze clinico-terapeutiche anche gravi, legate a un’errata valutazione dello stato glicemico [1].

Conseguentemente è sempre attuale l’interesse a sviluppare nuove metodologie per una semplice, rapida e affidabile determinazione della concentrazione di glucosio.

Molti studi sono stati rivolti alla messa a punto di metodiche analitiche basate sull’uso di reagenti selettivi e versatili di origine biologica, quali enzimi e anticorpi. I sistemi di bioriconoscimento possono inoltre includere anche acidi nucleici, batteri, organismi unicellulari, ecc.

L'area di ricerca riguardante i biosensori è in rapida espansione; dal primo biosensore per la determinazione del glucosio, quello proposto da Clark nel 1962, ad oggi si è osservata una crescita esponenziale del numero di lavori pubblicati su tale argomento, che si prevede ancora in aumento considerando lo sviluppo delle nano- e delle biotecnologie.

Il lavoro di ricerca, che ho condotto durante i tre anni di dottorato, riguarda lo sviluppo di biosensori amperometrici per la determinazione del glucosio, che incorporano come elemento di riconoscimento biologico l'enzima glucosio ossidasi (GOx).

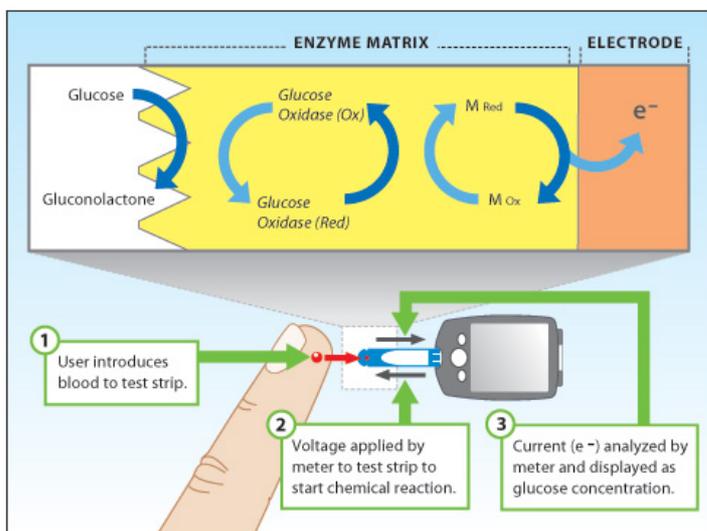


Figura 1.1 Schema esemplificativo di un glucometro [1].

Un problema che si riscontra molto comunemente con i biosensori enzimatici è la scarsa stabilità nel tempo, soprattutto in sistemi a flusso, dovuta al lento rilascio dell'enzima nella soluzione dove si esegue la determinazione. Pertanto, diventa estremamente importante realizzare una efficace immobilizzazione dell'enzima sulla superficie del trasduttore.

Un elettrodo viene definito come un conduttore elettrico in grado di accettare o cedere elettroni quando viene a contatto con specie che possono essere, rispettivamente, ossidate o ridotte ed è, pertanto, un trasduttore di segnale.



Figura 1.2 Elettrodi di Pt, Au e GC

I materiali elettrodi più comunemente impiegati sono:

- *platino*, che presenta nei solventi più frequentemente usati un'ampia finestra di potenziale sia anodica che catodica;
- *oro*, con caratteristiche abbastanza simili al platino;
- diverse forme di carbonio, quali *grafite*, *carbone vetroso* o *carbone vetroso reticolato*;
- *mercurio*, con ampia finestra di potenziale catodico, ma molto facilmente ossidabile, quindi non utilizzabile a potenziali anodici.

Oltre alle caratteristiche cinetiche (sovratensione) che caratterizzano gli elettrodi nei confronti della scarica (ossidazione o riduzione) del mezzo solvente, i diversi materiali elettrodi hanno caratteristiche specifiche per quanto riguarda:

- adsorbimenti di specie chimiche, o comunque interazioni con possibili depositi che ne ricoprono la superficie;
- cinetica di trasferimento di carica (sovratensione) nei confronti delle molecole di interesse.

Da circa 25 anni si è individuata l'importanza di poter introdurre, nel sistema elettrodo-specie elettroattiva, ulteriori variabili di carattere specifico che, modificando chimicamente la superficie dell'elettrodo, possano introdurre sostanziali variazioni al meccanismo del trasferimento di carica.

In realtà, da un punto di vista analitico, le modifiche della superficie elettrodi che rivestono maggiore interesse e che sono alla base di numerosi *sensori amperometrici*, sono quelle che portano ad una maggiore concentrazione dell'analita in prossimità della superficie

elettrodica (*preconcentrazione*), oppure quelle che consentono la riduzione o l'ossidazione dell'analita ad un potenziale rispettivamente meno catodico o meno anodico (*elettrocatalisi*). Ricordiamo a tale proposito la ben nota difficoltà (sovratensione) alla scarica (riduzione) dei protoni ad idrogeno molecolare su un elettrodo di mercurio piuttosto che di platino. E' noto che l'H atomico dà luogo a forti interazioni con una superficie di Pt, ma non di Hg: ciò favorisce la cinetica di riduzione dei protoni sulla prima superficie e può certamente essere visto come un esempio di elettrocatalisi. Non è in questo caso necessaria la modifica della superficie elettrodica.

Nel tempo sono state proposte diverse procedure per immobilizzare molecole sulla superficie di un elettrodo; possiamo sostanzialmente classificarle in tre categorie: *adsorbimento*, *formazione di legami covalenti*, *deposizione di film sottili*.

1) *Adsorbimento*: è stato il primo metodo adottato per la modificazione di superfici elettrodiche. Consiste nell'adsorbimento più o meno irreversibile della sostanza elettroattiva, ad esempio, tramite la formazione di interazioni coinvolgenti elettroni π tra la molecola e la superficie dell'elettrodo. Proprio per la natura di questa interazione, le molecole non vengono spesso fissate in modo adeguatamente stabile [2].

2) *Formazione di legami covalenti*: consiste nell'ancorare specie chimiche alla superficie dell'elettrodo tramite la formazione di veri e propri legami covalenti. I primi lavori che riportano modificazioni di questo tipo furono pubblicati nel 1975 da Walkins ed altri [3], che fissarono una specie otticamente attiva ad una superficie di carbonio, e da Murray e altri [4-7], che legarono specie elettroattive ad un elettrodo di Pt. Il legame è possibile quando la superficie è funzionalizzata con gruppi ossidrilici nel caso del platino (PtOH) o carbossilici nel caso del carbonio: ciò è possibile per anodizzazione controllata dell'elettrodo.

3) *Deposizione di film sottili*: consiste nella deposizione sulla superficie dell'elettrodo di film costituiti da più strati di specie modificante (possono essere presenti da un minimo di due ad un

massimo di circa 10^5 strati). Questo tipo di modifica della superficie elettrodica, che consente di ottenere un ricoprimento stabile e con un numero elevato di siti attivi, fu impiegato a partire dalla fine degli anni '70, quando venne proposto il ricoprimento di elettrodi con film polimerici [8-11]. Il polimero può comportarsi esso stesso da materiale conduttore (*polimeri conduttori* [11-14]), costituire un supporto per specie redox reversibili (*polimeri redox* [15,16]) o contenere siti ionici in grado di scambiare anioni o cationi con la soluzione (*polimeri a scambio ionico* [17]).

Negli anni '80 si è iniziata a studiare la possibilità di modificare la superficie elettrodica con materiali inorganici cristallini, quali zeoliti, argille o solidi microporosi [18]. Tali rivestimenti sono interessanti per le seguenti caratteristiche:

- sono più stabili e resistenti di molti polimeri: possono, infatti, essere utilizzati a temperature molto elevate ed in ambienti fortemente ossidanti;
- possono incorporare ioni al loro interno e quindi essere utilizzati come matrici di supporto, analogamente ai polimeri a scambio ionico;
- possiedono una ben definita struttura cristallina e quindi selettività sterica, cioè capacità di riconoscere con un certo grado di specificità una determinata specie in relazione alla sua forma, carica elettrica e struttura.

Le argille, in particolare, possedendo una struttura a strati legati tra loro da deboli interazioni, possono rigonfiare in ambiente acquoso e quindi 'ospitare' molecole estranee.

Il problema più evidente degli elettrodi modificati con materiali inorganici è correlato alla loro scarsa stabilità meccanica legata, soprattutto, a problemi di adesione alla superficie elettrodica. Per superare questo inconveniente, sono iniziati studi su elettrodi compositi, che contengono il materiale inorganico miscelato con sostanze organiche (generalmente di natura polimerica). Nel 1984 Baldwin [19] e

collaboratori modificarono un elettrodo con Co(II)ftalocianina (CoPC) miscelata con pasta di carbone; analogamente Wring [20,21] studiò un composito di CoPC e grafite impastato con colla epossidica.

La messa a punto di un elettrodo modificato composito costituisce un problema complesso. Vi sono infatti molte variabili da considerare, quali la scelta del supporto elettrodico, la geometria dell'elettrodo, il tipo di legante polimerico e le proporzioni tra la specie elettroattiva e il legante polimerico.

Recentemente, [22] è stato proposto l'utilizzo di argille nella fabbricazione di biosensori; esse possiedono caratteristiche interessanti come matrici per l'immobilizzazione enzimatica, infatti hanno un alto contenuto d'acqua che crea un ambiente biocompatibile per le molecole incorporate, permettono un'elevata mobilità dell'analita e del prodotto di reazione, non sono tossiche e presentano un'elevata stabilità chimica e idrolitica [23].

Nel 2004 il gruppo di ricerca, con cui ho svolto la tesi di dottorato, ha proposto un nuovo metodo di modificazione della superficie elettrodica tramite elettrosintesi diretta di un'idrotalcite (HT) Ni/Al-NO₃ [24]. Il metodo permette di realizzare una modifica degli elettrodi in tempi molto brevi (ordine dei minuti), rispetto a quelli necessari sintetizzando le HT per co-precipitazione (1 giorno) ed, inoltre, il ricoprimento della superficie elettrodica risulta riproducibile, ripetibile e molto più aderente.

1.2 ARGILLE

Le argille costituiscono una serie di composti molto diffusi in natura, ma anche sintetizzabili, spesso facilmente, in laboratorio; sono caratterizzate da una struttura a strati carichi sovrapposti e paralleli legati tra loro da deboli interazioni elettrostatiche [25]. La dimensione dell'interstrato, chiamato anche spazio basale, dipende da vari fattori, quali il grado di idratazione dell'argilla e le dimensioni dello ione interposto tra gli strati. Vari ioni possono essere inseriti negli interstrati delle argille, compresi

composti organici polari che, a causa dell'elevata dimensione, provocano un aumento della distanza d'interstrato.

Una delle caratteristiche principali delle argille è la loro capacità di scambiare gli ioni presenti al loro interno; questa proprietà ne determina un vasto impiego nell'industria come materiale adsorbente, supporto per catalizzatori, scambiatore ionico, ecc..

Le argille possono essere divise in due grandi gruppi, a seconda della carica presente tra gli strati, come schematizzato in Figura 1.3:

- *argille cationiche*; sono largamente diffuse in natura e sono costituite da strati carichi negativamente formati da idrossidi di alluminio e di silicio; l'eccesso di carica negativa viene bilanciata da cationi situati negli interstrati.



Figura 1.3 Rappresentazione schematica di argille anioniche ed cationiche.

- *argille anioniche*; sono meno diffuse in natura e sono costituite da strati idrossidici carichi positivamente, contenenti negli interstrati specie anioniche e molecole d'acqua [26].

1.2.1 ARGILLE CATIONICHE

La maggior parte delle argille cationiche è costituita da alluminosilicati, minerali costituiti da Si(O, OH) con coordinazione tetraedrica e M(O, OH), (dove M = Al³⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ o Fe²⁺), con coordinazione ottaedrica. Si possono distinguere i minerali 1:1 in cui si ha alternanza tra uno strato tetraedrico ed uno ottaedrico e 1:2 in cui uno strato ottaedrico è situato tra due strati tetraedrici.

Quando un atomo di Si o del metallo M viene sostituito da un catione di valenza inferiore, gli strati dell'argilla risultano carichi negativamente e tale eccesso di carica viene bilanciato con l'introduzione di cationi nell'interstrato; i cationi introdotti devono avere piccole dimensioni e possono essere bivalenti o monovalenti. Tra gli strati sono anche presenti molecole di acqua. Il grado di idratazione dell'argilla è il parametro fondamentale per determinare il suo stato; in condizioni di elevata umidità alcune argille cationiche, come ad esempio la montmorillonite, possono rigonfiare fino ad assumere la consistenza di gel.

Le argille cationiche vengono impiegate industrialmente come catalizzatori in numerosi processi quali quelli di isomerizzazione e alchilazione di Friedel-Crafts.

1.2.2 ARGILLE ANIONICHE

Le argille anioniche sono meno diffuse in natura rispetto a quelle cationiche. Queste argille sono conosciute con nomi diversi a seconda della composizione chimica e del tipo di struttura; le principali sono raccolte nella Tabella 1.1.

Tutte queste argille sono costituite di strati idrossidici carichi positivamente ed hanno come anione intercalante CO₃²⁻.

Tabella 1.1: Denominazione, composizione e simmetria di alcune argille anioniche.

NOME	COMPOSIZIONE	STRUTTURA
Idrotalcite	$Mg_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	O
Manasseite	$Mg_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	R
Sjogrenite	$Mg_6Fe_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4,5 H_2O$	O
Stichtite	$Mg_6Cr_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	R
Barbertonite	$Mg_6Cr_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	O
Takovite	$Ni_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	R
Reevesite	$Ni_6Fe_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	R
Desuatselite	$Mg_6Mn_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4 H_2O$	R

O: struttura ottaedrica; R: struttura romboedrica.

1.3 IDROTALCITI

L' idrotalcite è un idrossicarbonato di magnesio e alluminio, presente in natura in forma lamellare distorta. La formula molecolare $Mg_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4H_2O$ è stata determinata da Manasse [27]. Nel 1942 Feitknecht sintetizzò numerosi composti con struttura idrotalcitica che chiamò 'composti a doppio strato'. Ipotizzò che tali composti fossero costituiti da strati di idrossido dei due cationi intercalati [28, 29]. Tale ipotesi fu però confutata da Allmann e Taylor che, utilizzando tecniche diffrattografiche, dimostrarono come i cationi fossero localizzati nello stesso strato e gli anioni carbonato fossero disposti negli interstrati, insieme a molecole di acqua [30, 31].

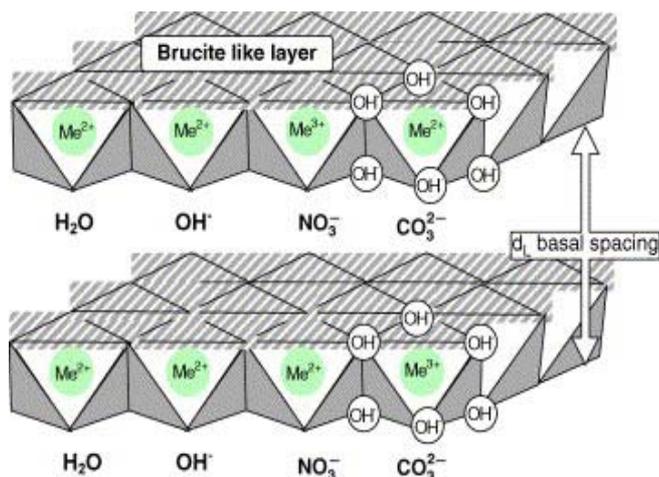


Figura 1.4 Rappresentazione schematica della struttura di un'idrotalcite.

Per meglio comprendere la struttura dell'idrotalcite, rappresentata schematicamente in Figura 1.4, può essere utile partire dalla brucite, $Mg(OH)_2$, in cui gli ioni Mg^{2+} sono legati a sei ioni OH^- con coordinazione ottaedrica. I diversi ottaedri condividono uno spigolo, formando strati che sono impilati uno sull'altro e legati tra loro da legami a idrogeno. Se una parte degli ioni Mg^{2+} viene sostituita da ioni trivalenti di dimensione adatta, come l' Al^{3+} per l'idrotalcite, gli strati diventano carichi positivamente e tale eccesso di carica deve essere bilanciato da anioni, il più comune dei quali è il carbonato, che vengono intercalati tra gli strati idrossidici; in questi interstrati sono anche presenti molecole d'acqua, che si legano agli strati idrossidici ed agli anioni tramite legami ad idrogeno.

Composti di tipo idrotalcite

E' possibile sintetizzare un grande numero di composti detti 'tipo idrotalcite' (HT), che possono essere rappresentati dalla seguente formula generale: $[M(II)_{1-x}M(III)_x(OH)_2]^{x+}(A^{n-}_{x/n})^m mH_2O$ [32].

In seguito le HT verranno indicate con M(II)/M(III)-A.

Come appare da questa formula le principali variabili compositive sono:

- ione M(II), che può anche essere di due metalli diversi $[M_1(II) e M_2(II)]$;

- ione M(III), anche in tal caso può essere di due metalli differenti;
- valore 'x', cioè rapporto stechiometrico tra i due ioni metallici;
- anione intercalato A^{n-} , che può avere dimensione, carica e proprietà variabili;
- numero di molecole d'acqua;
- morfologia e dimensioni del cristallo.

Essendo così ampio il numero di variabili, è chiaro come sia possibile sintetizzare un vastissimo numero di HT, con proprietà e caratteristiche molto differenti. Vi sono però alcuni limiti, imposti dalla struttura a strati già descritta, nella scelta del catione metallico. Tale ione, infatti, deve avere dimensione tale da potersi situare in una struttura a strati brucitici e deve poter assumere una coordinazione ottaedrica, esacoordinandosi a 6 ossidrilici. Per questo potranno essere sintetizzati composti tipo HT solamente utilizzando ioni di raggio molto simile a Mg^{2+} e ad Al^{3+} , aventi caratteristiche elettroniche compatibili con la simmetria ottaedrica. In Tabella 1.2 vengono riportati i raggi ionici degli ioni bivalenti e trivalenti di alcuni metalli:

Tabella 1.1: Raggi ionici, in Å, di alcuni ioni metallici.

M(II)	Be	Mg	Cu	Ni	Co	Zn	Fe	Mn	Cd	Ca
	0.30	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76	0.80	0.97	0.98
M(III)	Al	Ga	Ni	Co	Fe	Mn	Cr	V	Ti	In
	0.5	0.62	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69	0.74	0.76	0.81

Per quanto detto precedentemente, possono essere sintetizzati composti di tipo idrotalcite con ioni trivalenti di raggio compreso tra 0.50 e 0.80 Å e con ioni bivalenti di raggio compreso tra 0.65 e 0.80 Å, ad eccezione di Cu^{2+} , che, a causa della sua configurazione elettronica, non

assume una simmetria ottaedrica, ma forma composti caratterizzati da distorsione tetragonale, per effetto Jahn-Teller [32].

E' però possibile sintetizzare HT con 'misccele' di metalli, anche con raggio ionico elevato o con configurazione elettronica non coerente con la simmetria ottaedrica, purché in percentuali ridotte. Sono così state sintetizzate HT contenenti Cu^{2+} in basse percentuali, assieme ad un metallo bivalente con le caratteristiche richieste dalla struttura idrotalcitica.

Il rapporto M(II)/M(III), x nella formula, non è strettamente fissato ma può variare in un intervallo relativamente ampio, poiché i due ioni assumono, negli strati idrotalcitici, una distribuzione casuale. Al fine, però, di ottenere una fase idrotalcitica pura, occorre che x sia compreso tra 0.22 e 0.33, affinché non si separi, accanto alla fase idrotalcitica, una fase idrossidica dello ione in eccesso.

Per quanto riguarda la scelta dell'anione intercalato, non esistono limitazioni, visto che esso occupa gli interstrati dell'argilla, le cui dimensioni non sono rigorosamente definite, ma condizionate proprio dall'ingombro sterico dell'anione. L'anione più comune, presente nell'idrotalcite naturale, è CO_3^{2-} . Esso stabilisce forti interazioni con gli strati brucitici e quindi, nella preparazione di HT con anioni diversi, si deve prestare molta attenzione alla contaminazione del carbonato, presente nell'atmosfera o nelle soluzioni acquose di sintesi. In letteratura sono note un gran numero di idrotalciti, contenenti anioni differenti:

- anioni inorganici: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(\text{ClO}_4)^-$, $(\text{NO}_3)^-$, $(\text{ClO}_3)^-$, $(\text{IO}_3)^-$, OH^- , $(\text{CO}_3)^{2-}$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, $(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$, $(\text{WO}_4)^{2-}$, $(\text{CrO}_4)^{2-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$;
- iso o eteropolianioni, come ad esempio $(\text{PMo}_2\text{O}_{40})^{3-}$, $(\text{PW}_{12}\text{O}_{40})^{3-}$;
- anioni di acidi organici: ossalato, succinato, malonato e altri;
- composti metallorganici anionici.

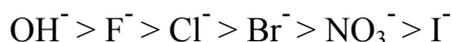
Modificando l'anione intercalato è possibile sintetizzare HT con diversa ampiezza dell'interstrato, il cui valore è fortemente dipendente dal

numero, dimensione, orientamento e forza dei legami tra l'anione stesso e gli ossidrili dello strato brucitico.

La capacità delle argille anioniche di scambiare l'anione intercalato può essere così rappresentata:



Questo equilibrio, dove per semplicità non compaiono esplicitamente le cariche, è tanto più spostato verso destra quanto maggiore è l'affinità dell'anione Y per gli strati brucitici. Tale affinità dipende principalmente dalle interazioni elettrostatiche che si stabiliscono tra l'anione ed i piani carichi positivamente; risulta quindi importante il rapporto carica/raggio dello ione interstrato [29]. Studi effettuati sulle proprietà di scambio delle idrotalciti hanno mostrato che la selettività verso gli anioni monovalenti decresce secondo l'ordine:



Gli anioni bivalenti hanno affinità maggiore per gli strati brucitici e quindi selettività maggiore. Tra gli anioni bivalenti, il carbonato è in grado di stabilire interazioni fortissime con gli strati brucitici e quindi la capacità di scambio anionico è molto ridotta in idrotalciti calcinate, in cui l'anione intercalato è, per l'appunto, CO_3^{2-} .

Tramite reazioni di scambio anionico è possibile anche ottenere argille dette 'pilastrate', in cui l'anione intercalato presenta un ingombro sterico particolarmente elevato e può essere visto come un sostegno molecolare, un pilastro che impone uno spazio basale di dimensione elevata [33].

Sono noti [32] tre metodi di sintesi di HT: *coprecipitazione*, *scambio ionico* e *ricostruzione della struttura*.

– *Coprecipitazione*

E' il metodo più utilizzato perché consente la produzione di grandi quantità di HT e una grande flessibilità nell'impostazione dei parametri sperimentali: si riescono ad ottenere HT con una composizione ben definita e dipendente dalla soluzione di partenza. Consiste

nell'ottenimento dell'HT partendo dai sali bivalenti e trivalenti dei cationi mediante la loro coprecipitazione a pH alcalino. La formazione di HT, $[M(II)_{1-x}M(III)_x(OH)_2]^{x+}(A^{n-}_{x/n})_mH_2O$, sottrae ioni OH^- alla soluzione ed il pH è perciò uno dei parametri che devono essere più accuratamente controllati nella sintesi: esso deve essere in ogni caso mantenuto ad un valore inferiore a quello di precipitazione dell'idrossido, ma non dev'essere troppo basso, poiché un pH eccessivamente acido determina la formazione di un prodotto amorfo; solitamente si utilizza un valore di pH compreso tra 8 e 10.

– *Scambio ionico*

La sintesi per scambio ionico è di solito utilizzata quando non sono applicabili metodi diretti; l'HT desiderata è ottenuta per mescolamento dell'HT scelta come precursore con una soluzione contenente l'anione che deve essere scambiato, presente in eccesso per favorire lo scambio. I fattori principali che influiscono sull'andamento della reazione sono: la natura degli anioni uscente ed entrante, in relazione alla scala di selettività riportata precedentemente, e il pH della soluzione, a cui l'HT deve essere stabile.

– *Ricostruzione della struttura*

Questo metodo si basa sull' 'effetto memoria', ovvero sulla capacità degli ossidi misti, ottenuti per calcinazione dell'HT precursore a 500-600° C, di ricostruire la struttura originaria mediante l'incorporazione di vari anioni o per semplice esposizione all'aria. La reazione viene condotta mescolando una soluzione degli ossidi misti con una soluzione del sale dell'anione, in assenza di CO_2 ; tale metodo è particolarmente utilizzato nella sintesi di HT intercalate con anioni inorganici. Il parametro fondamentale è la temperatura di calcinazione dell'idrotalcite iniziale, che deve essere tale da assicurare la completa decomposizione della stessa ad ossidi misti, ma non permettere la formazione di altre fasi.

1.4 BIOSENSORI

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. A seconda del tipo di trasduzione del segnale, è possibile differenziare i biosensori in ottici, bioluminescenti, elettrochimici, calorimetrici e piezoelettrici.

I biosensori elettrochimici sono i più adatti ad essere miniaturizzati; possono operare anche in mezzi torbidi (a differenza di quelli ottici), hanno brevi tempi di risposta (a differenza dei bioluminescenti), presentano un limite di rivelabilità solitamente inferiore e costi più bassi, rispetto agli altri tipi di biosensori.

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

Un biosensore elettrochimico produce un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione di un singolo analita o gruppo di analiti. In dipendenza del segnale elettrico misurato, i biosensori possono essere classificati in conduttimetrici, potenziometrici ed amperometrici. Questi ultimi sono più economici, rapidi, e presentano una maggior sensibilità rispetto a quelli conduttimetrici e potenziometrici [34].

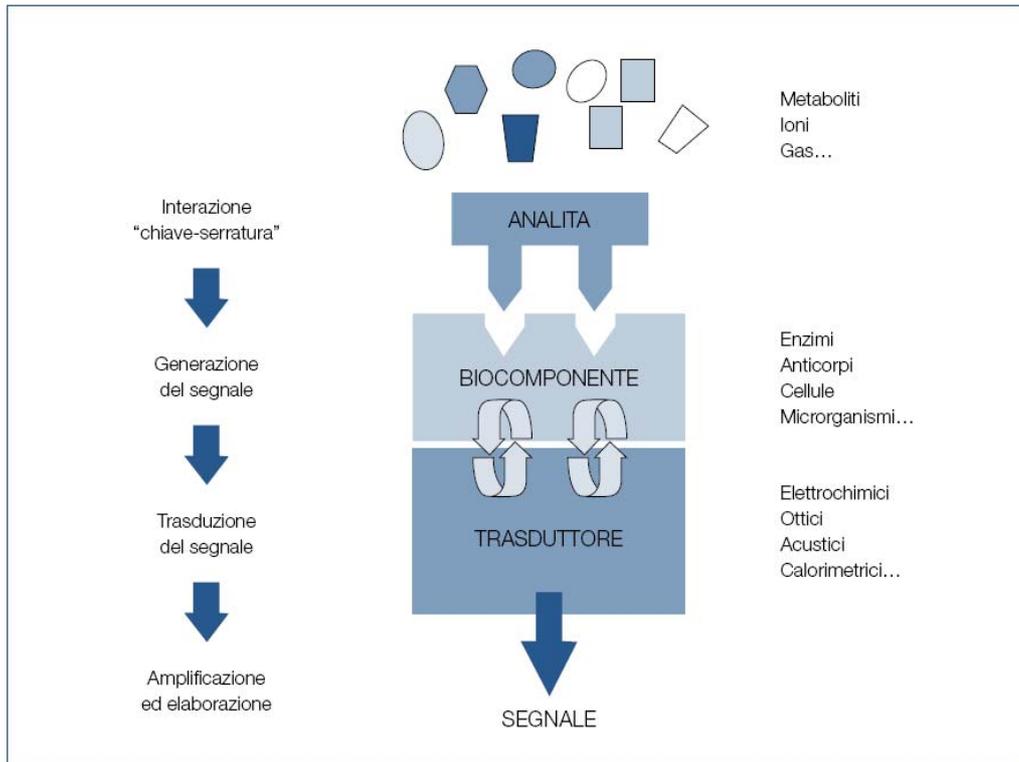


Figura 1.5 Schema di un biosensore [1].

Tra i biocomponenti più studiati ci sono gli enzimi ossidoriduttasi, in quanto sono una classe di elementi di riconoscimento biologico ben conosciuta e facilmente reperibile in commercio.

E' possibile classificare gli enzimi ossidoriduttasi a seconda dell'accettore di elettroni e in base alla natura del gruppo prostetico, come mostrato in figura 1.6.

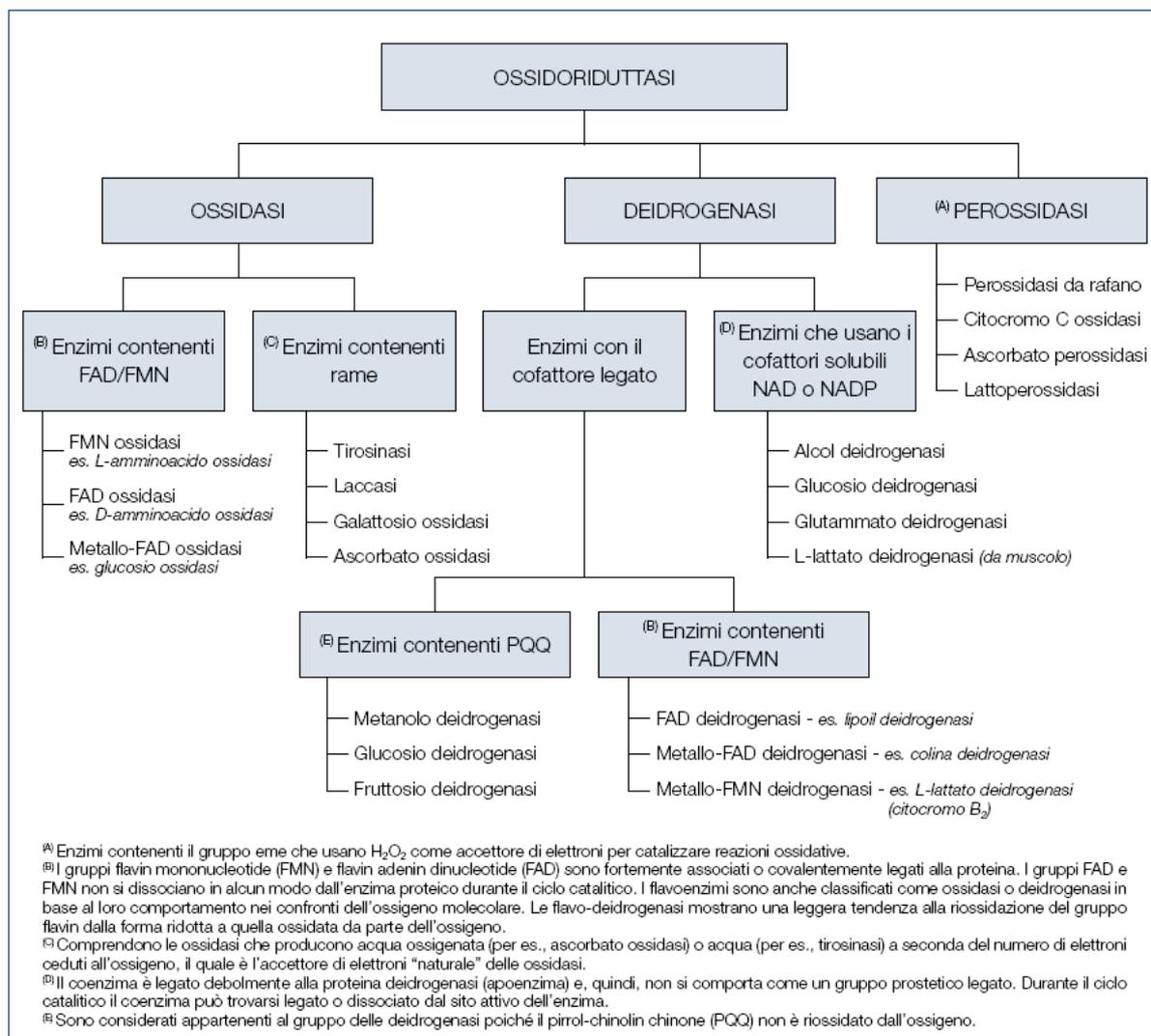


Figura 1.6 Classificazione schematica degli enzimi ossidoriduttasi impiegati nella fabbricazione di biosensori amperometrici.[1]

La maggior parte dei biosensori elettrochimici per la determinazione del glucosio si basa sull'uso della glucosio ossidasi (GOx).

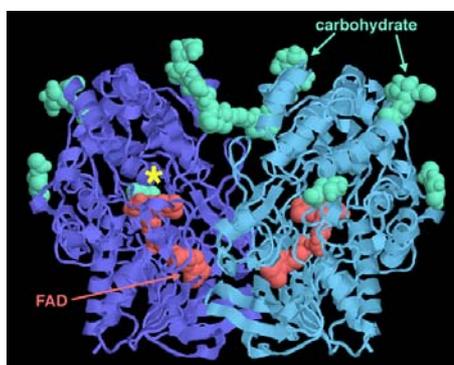


Figura 1.7 Rappresentazione spaziale dell'enzima glucosio ossidasi.

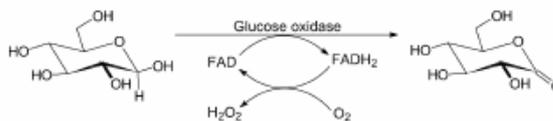
La GOx e' un'ossidasi flavinica (FAD) costituita da 2 sub-unità identiche di circa 80.000 Dalton ognuna (583 residui amminoacidici), avente la seguente sequenza amminoacidica:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Met	Gln	Thr	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Ala
16	Ala	Leu	Pro	His	Tyr	Ile	Arg	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu
31	Leu	Thr	Asp	Pro	Lys	Asp	Val	Ser	Gly	Arg	Thr	Val	Asp	Tyr	Ile
46	Ile	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Thr	Ala	Ala	Arg	Leu
61	Thr	Glu	Asn	Pro	Asn	Ile	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Glu	Ser	Gly	Ser
76	Tyr	Glu	Ser	Asp	Arg	Gly	Pro	Ile	Ile	Glu	Asp	Leu	Asn	Ala	Tyr
91	Gly	Asp	Ile	Phe	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	His	Ala	Tyr	Glu	Thr	Val
106	Glu	Leu	Ala	Thr	Asn	Asn	Gln	Thr	Ala	Leu	Ile	Arg	Ser	Gly	Asn
121	Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Thr	Trp	Thr	Arg
136	Pro	His	Lys	Ala	Gln	Val	Asp	Ser	Trp	Glu	Thr	Val	Phe	Gly	Asn
151	Glu	Gly	Trp	Asn	Trp	Asp	Asn	Val	Ala	Ala	Tyr	Ser	Leu	Gln	Ala
166	Glu	Arg	Ala	Arg	Ala	Pro	Asn	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Ala	Gly	His
181	Tyr	Phe	Asn	Ala	Ser	Cys	His	Gly	Val	Asn	Gly	Thr	Val	His	Ala
196	Gly	Pro	Arg	Asp	Thr	Gly	Asp	Asp	Tyr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ala
211	Leu	Met	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Arg	Gly	Val	Pro	Thr	Lys	Lys	Asp
226	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Val	Ser	Met	Phe	Pro	Asn	Thr
241	Leu	His	Glu	Asp	Gln	Val	Arg	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Glu	Trp	Leu
256	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gln	Arg	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Leu	Thr	Gly	Gln
271	Tyr	Val	Gly	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Asn	Gly	Thr	Thr	Pro	Arg
286	Ala	Val	Gly	Val	Glu	Phe	Gly	Thr	His	Lys	Gly	Asn	Thr	His	Asn
301	Val	Tyr	Ala	Lys	His	Glu	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Val
316	Ser	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	Tyr	Ser	Gly	Ile	Gly	Met	Lys	Ser	Ile
331	Leu	Glu	Pro	Leu	Gly	Ile	Asp	Thr	Val	Val	Asp	Leu	Pro	Val	Gly
346	Leu	Asn	Leu	Gln	Asp	Gln	Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Arg	Ser	Arg	Ile
361	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Gln	Ala	Ala	Trp	Phe	Ala	Thr
376	Phe	Asn	Glu	Thr	Phe	Gly	Asp	Tyr	Ser	Glu	Lys	Ala	His	Glu	Leu
391	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Glu	Gln	Trp	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Arg
406	Gly	Gly	Phe	His	Asn	Thr	Thr	Ala	Leu	Leu	Ile	Gln	Tyr	Glu	Asn
421	Tyr	Arg	Asp	Trp	Ile	Val	Asn	His	Asn	Val	Ala	Tyr	Ser	Glu	Leu
436	Phe	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Phe	Asp	Val	Trp	Asp	Leu
451	Leu	Pro	Phe	Thr	Arg	Gly	Tyr	Val	His	Ile	Leu	Asp	Lys	Asp	Pro
466	Tyr	Leu	His	His	Phe	Ala	Tyr	Asp	Pro	Gln	Tyr	Phe	Leu	Asn	Glu
481	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Ala	Arg	Asn
496	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Ala	Met	Gln	Thr	Tyr	Phe	Ala	Gly	Glu	Thr
511	Ile	Pro	Gly	Asp	Asn	Leu	Ala	Tyr	Asp	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Trp
526	Thr	Glu	Tyr	Ile	Pro	Tyr	His	Phe	Arg	Pro	Asn	Tyr	His	Gly	Val
541	Gly	Thr	Cys	Ser	Met	Met	Pro	Lys	Glu	Met	Gly	Gly	Val	Val	Asp
556	Asn	Ala	Ala	Arg	Val	Tyr	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Ile	Asp
571	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	Thr	Gln	Met	Ser	Ser	His	Val	Met		

La GOx è una glicoproteina che contiene dal 10 al 16% di carboidrati e in ogni subunità è presente un gruppo prostetico FAD [35]; con agenti denaturanti le subunità possono essere dissociate con conseguente perdita del FAD.

Le dimensioni del dimero sono 60 Å x 52 Å x 77 Å. [36]

La GOx, in presenza di ossigeno, catalizza la reazione di ossidazione del β -D-glucosio a D-glucono-1,5-lattone, che successivamente idrolizza spontaneamente ad acido gluconico:



Il perossido d'idrogeno, prodotto dalla riossidazione del sito attivo dell'enzima, viene solitamente rivelato per ossidazione elettrochimica.

Tale rivelazione comporta problemi di instabilità del segnale, soprattutto se si lavora con metalli nobili, dovuti all'adesione delle bollicine di ossigeno sulla superficie dell'elettrodo e passivazione dello stesso se si opera, invece, a potenziali catodici. Per ovviare al problema dell'instabilità del segnale dovuto all'ossigeno liberato, si può incrementare l'idrofilia superficiale aumentando la rugosità del materiale elettrodico, per esempio, per deposizione di un materiale inorganico poroso. E' per questo motivo che la prima matrice da noi studiata per immobilizzare la GOx è stata un'argilla anionica, appartenente alla famiglia delle idrotalciti sintetiche.

In campo analitico esistono tre tipi diversi di biosensori: di prima, seconda e terza generazione.

Nei biosensori di prima generazione, l'enzima ossida il substrato in presenza di ossigeno, e il perossido di idrogeno, prodotto dalla riossidazione del sito attivo dell'enzima, viene direttamente rivelato all'elettrodo.

Quelli di seconda generazione prevedono la presenza di un mediatore redox direttamente a contatto con l'elettrodo. Questo mediatore, in un sistema che opera in presenza di ossigeno, va a reagire chimicamente con il prodotto della catalisi enzimatica che presenta il migliore

comportamento elettroattivo, fornendo così una risposta direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato che si vuole determinare. I biosensori di terza generazione vedono, invece, l'ossidazione o la riduzione diretta del sito attivo dell'enzima. In questo caso è la stessa specie biologica che entra nel processo redox elettrochimico, secondo quanto viene definito schema a spira molecolare. Il tutto può avvenire anche in assenza di ossigeno [37].

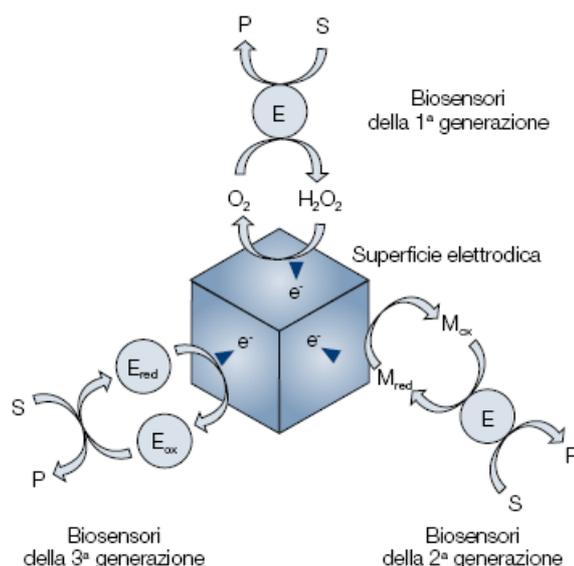


Figura 1.8 Schema generale di reazione dei biosensori amperometrici di prima, seconda e terza generazione. [1]

1.5 ENZIMI

Un enzima è una proteina (sequenza di amminoacidi organizzati in una struttura terziaria e quaternaria ben definita) in grado di accelerare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità. Chimicamente si parla di catalizzatore biologico.

L'enzima partecipa attivamente alla reazione: il substrato (la molecola su cui agisce l'enzima) va a legarsi al sito attivo (la zona dell'enzima in cui avvengono le reazioni), formando un complesso attivato. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per agire nuovamente. Una singola molecola enzimatica è in grado di catalizzare in un secondo le reazioni di decine di migliaia di

molecole identiche, rendendo gli enzimi efficaci anche in quantità minime.

Il meccanismo enzimatico più semplice è stato discusso da Michaelis e Menten nel 1913, secondo il seguente schema:



Il modello proposto si basa su due assunzioni:

- la velocità di reazione viene valutata per un periodo di tempo durante il quale la reazione inversa è fisicamente trascurabile, cioè si considera la “velocità iniziale”, v_0 ;
- si presuppone che il complesso enzima-substrato sia in equilibrio con l’enzima libero e il substrato e che tale situazione non sia alterata dalla formazione del prodotto ($k_2 \ll k_{-1}$).

La velocità iniziale viene definita come: $v_0 = k_2[ES]$.

Per poter derivare un'equazione utile che descriva la catalisi enzimatica si assume che la reazione proceda in condizioni di stato stazionario, per cui $d[ES]/dt=0$, cioè $k_1[E][S]=(k_{-1}+k_2)[ES]$, da cui ricavando $[ES]$:

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

L'equazione così ottenuta può essere semplificata introducendo una nuova costante:

$$k_M = (k_{-1}+k_2)/k_1 \quad \text{costante di Michaelis-Menten}$$

Sostituendo tale costante nell'equazione (1), si ottiene:

$[ES]=[E][S]/k_M$ e considerando che $[E]=[E_{tot}]-[ES]$, l'espressione iniziale $v_0 = k_2[ES]$ può essere scritta come:

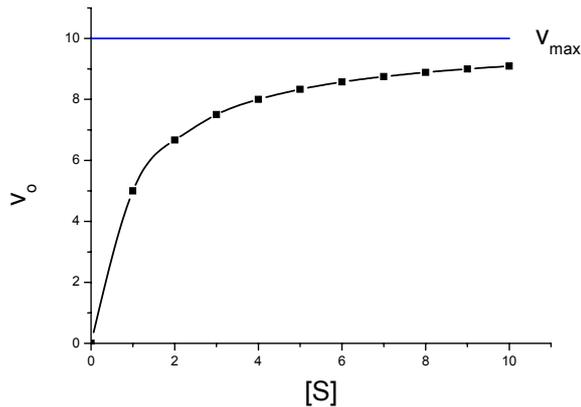
$$v_0 = k_2 [E_{tot}][S]/([S] + k_M)$$

Quando tutti i siti attivi dell'enzima sono saturati dal substrato si raggiunge la velocità massima (detta anche velocità di saturazione):

$$v_{max} = k_2 [E_{tot}]$$

La risultante equazione di Michaelis - Menten, che però non è sempre valida per descrivere tutte le cinetiche enzimatiche, è:

$$v_0 = v_{max} [S]/([S]+k_M)$$



Questa equazione caratterizza un'iperbole equilatera e l'enzima viene definito da due costanti:

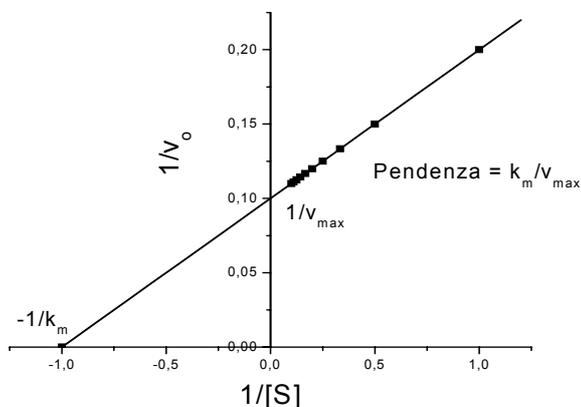
k_M , cioè la concentrazione di substrato quando v_0 è la metà della v_{max} ;

v_{max} , la velocità massima di reazione quando $[S] \gg k_M$.

La costante di Michaelis - Menten è una grandezza tipica di ogni enzima e indica l'affinità di un enzima verso il substrato: più basso è il valore di k_M , minore è la concentrazione di substrato necessaria per raggiungere una velocità di reazione pari alla metà della v_{max} e, di conseguenza, maggiore è l'affinità dell'enzima per il substrato.

Esistono vari metodi matematici per determinare i valori di k_M e v_{max} , il più semplice è quello che si serve del grafico dei doppi reciproci o linearizzazione di Lineweaver Burk.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{[S]} \frac{k_M}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}}$$



Per un enzima viene anche definito il numero di turnover, ovvero il numero di moli di substrato convertite in prodotto nell'unità di tempo da una mole di enzima, quando è completamente saturato dal substrato.

A differenza dei catalizzatori inorganici, gli enzimi presentano un'elevatissima specificità, catalizzando solo una reazione o pochissime reazioni simili poiché il sito attivo interagisce con i reagenti in modo stereospecifico (è sensibile anche a piccolissime differenze della struttura tridimensionale del substrato).

Molti enzimi contengono molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Queste molecole, che si legano spesso all'enzima nelle vicinanze del sito attivo, vengono chiamate cofattori e sono divise in due categorie, sulla base del loro legame con l'enzima: i gruppi prostetici e i coenzimi. I gruppi prostetici sono strettamente legati agli enzimi, generalmente in modo permanente. I coenzimi sono legati piuttosto debolmente agli enzimi, permettendo così ad una singola molecola di coenzima di associarsi con enzimi diversi e di operare da ponte per piccole molecole da un enzima ad un altro.

Gli enzimi vengono classificati in base alla reazione che catalizzano e per questo sono stati divisi in classi:

1. *Ossidoreduttasi*: catalizzano reazioni di ossido-riduzione.
2. *Trasferasi*: catalizzano il trasferimento di un gruppo ben preciso (metile, acile, ammino, fosfato) da una sostanza ad un'altra.
3. *Idrolasi*: catalizzano reazioni di idrolisi.
4. *Liasi*: accelerano le addizioni ai doppi legami.
5. *Isomerasi*: catalizzano reazioni di riarrangiamento di struttura.
6. *Ligasi*: accelerano la formazioni di alcuni legami con acquisto di energia per rottura di un legame fosfato dell'ATP.

Ogni classe di appartenenza è poi suddivisa in sottoclassi in base al substrato che prende parte alla reazione e al prodotto formato.

UNITÀ DI MISURA DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

La commissione per lo studio degli enzimi nominata dall'Unione Internazionale di Biochimica ha definito l'Unità Internazionale di attività enzimatica (UI) come la quantità di enzima che nelle condizioni sperimentali ottimali trasforma in un minuto una micromole di substrato o produce una micromole di prodotto, a 25°C.

$$1 \text{ UI} = \frac{1 \mu\text{mol}}{\text{min}} \text{ di substrato trasformato}$$

L'enzima glucosio ossidasi, utilizzato in questo lavoro di dottorato, ha un'attività specifica di 179 unità mg^{-1} .

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Centonze, M. Quinto, D. Carelli, S. Di Paolo, E. Montemurno, L. Gesualdo, *G It Diabetol Metab*, **26** (2006) 160
- [2] R.F. Lane e A.T. Hubbard, *J. Phys. Chem.*, **77** (1973) 1401
- [3] B.F. Watkins, J.R. Behling, E. Kariv, L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **97** (1975) 3549
- [4] P.R. Moses, L. Wier, R.W. Murray, *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1882
- [5] P. R. Moses, R.W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **77** (1977) 393
- [6] J. C. Lennox, R.W. Murray, *J. Electroanal. Chem.*, **78** (1977) 395
- [7] J. R. Lehnard, R.W. Murray, *J. Electroanal. Chem.*, **78** (1977) 195
- [8] A. Merz, J. Bard, *J. Am. Chem Soc.*, **100** (1978) 3222
- [9] L.L. Miller, M.R. Van De Mark, *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1978) 639
- [10] M.S. Wringon, R.G. Austin, A.B. Bocarsly, J.M. Bolts, O. Haas, K.D. Legg, L. Nadjo, M.C. Palazzotto, *J. Electroanal. Chem.*, **94** (1978) 219
- [11] A.F. Diaz, W.Y. Lee, J.A. Logan, D.C. Green, *J. Electroanal. Chem.*, **108** (1980) 377

- [12] A. J. Heeger, H. Shirakawa, A. G. MacDiarmid, *Phys. Rev. Lett.*, **39** (1977) 1098
- [13] A. F. Diaz, K.K. Kanazawa, G.P. Gardini, *J. Chem. Soc. Commun.*, **365** (1979) 123
- [14] A. F. Diaz, J.I Castillo, J. A. Logan, W.Lee, *J. Electroanal. Chem.*, **129** (1981) 115
- [15] N. Oyama, H. Matsuda, HD. Kagaku, *J. Electroanal. Chem.*, **49** (1981) 396
- [16] R. Murray, *Phil. Trans. R. Soc. London*, **A302** (1981) 253
- [17] N. Oyama, F.C. Anson, *J. Electrochem. Soc.*, **127** (1980) 247
- [18] S. Therias, C. Mousty, *Appl. Clay Sci.*, **10** (1995) 147
- [19] K.M. Korfhage, K. Ravichandran, R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 1514
- [20] S.A. Wring, J. P. Hart, B.J. Birch, *The Analyst*, **114** (1989) 1563
- [21] S.A. Wring, J. P. Hart, B.J. Birch, *Anal. Chim. Acta*, **229** (1990) 63
- [22] C. Mousty, *Appl. Clay Sci.*, **27** (2004) 159
- [23] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Anal. Chem.*, **75** (2003) 3872
- [24] E. Scavetta, B. Ballarin, M. Giorgetti, I. Carpani, F. Cogo, D. Tonelli, *J. New Mat. Electrochem. Syst.*, **7** (2004) 43
- [25] A. J. Bard, T. Mallouk, *Tecn. Chem.*, **271** (1992) 312
- [26] W. T. Reichle, *Solid State Ionics*, **221** (1986) 35
- [27] E. Manasse, *Atti Soc. Toscana Sc. Nat., Proc. Verb.*, **24** (1915) 92
- [28] W. Feitknecht, *Helv. Chim. Acta*, **25** (1942) 131
- [29] W. Feitknecht, *Helv. Chim. Acta*, **25** (1942) 555
- [30] R. Allmann, *Acta Crystallogr.*, **B24** (1968) 972
- [31] H.F.W. Taylor, *Miner. Mag.*, **37** (1969) 338
- [32] F. Trifiró, A. Vaccari, Hydrotalcite-like anionic Clays (Layered Double Hydroxides) in: J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vgtle, (Eds), “Comprehensive Supramolecular Chemistry”, Vol. 7, Pergamon, Oxford, 1996
- [33] R.M. Barrer, D.M. MacLeod, *Trans. Faraday Soc.*, **51** (1955) 1290
- [34] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, *Anal.Chim.Acta*, **33** (2002) 459

[35] J. H. Pazur, *Methods Enzymol.*, **9** (1966) 82-87

[36] H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg, J. Mol.Biol., **229** (1993) 153

[37] C. Mousty, *App. Clay Science*, **27** (2004) 159 – 177

CAPITOLO 2

PARTE SPERIMENTALE

2.1 STRUMENTAZIONE E REAGENTI

Reagenti utilizzati:

- Nitrato di magnesio esaidratato > 99.995 %
Mg(NO₃)₂ · 6H₂O PM = 256.41 ALDRICH
- Nitrato di nichel esaidratato > 98.0 %
Ni(NO₃)₂ · 6H₂O PM = 290.81 FLUKA
- Nitrato di alluminio nonaidratato > 98 %
Al(NO₃)₃ · 9H₂O PM = 375.14 ALDRICH
- Idrossido di sodio 1 M da fiala NORMEX
- Fosfato monobasico di potassio
KH₂PO₄ PM = 136.09 MERCK
- Soluzione tampone fosfato
PBS 0.1 M, a diversi pH (5.5, 6.5, 7.0)
- Glucosio ossidasi da *Aspergillus Niger*
GOx Tipo VII SIGMA
- Albumina di siero bovino
BSA SIGMA
- Glutaraldeide (GA) 25 % m/m in acqua

HOC(CH ₂) ₃ CHO	PM = 100.12; d = 1.062	SIGMA
• D (+) Glucosio anidro	> 99 %	
C ₆ H ₁₂ O ₆	PM = 180.16	FLUKA
• Perossido d'idrogeno		
H ₂ O ₂	PM = 34.01; d = 1.1 kg L ⁻¹	MERCK
• Cloruro di potassio	> 99.5 %	
KCl	PM = 74.555	CARLO ERBA
• Nitrato di potassio	> 99.0 %	
KNO ₃	PM = 101.11	FLUKA
• Acido ascorbico		
C ₆ H ₈ O ₆	PM = 176.13	SIGMA ALDRICH
• Acido urico	> 98 %	
C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	PM = 168.11	FLUKA
• Acetaminofene	> 98 %	
C ₈ H ₉ NO ₂	PM = 151.17	FLUKA
• Tetraisopropilossido di titanio		
Ti[OCH(CH ₃) ₂] ₄	P.M. = 284.22	ALDRICH
• Acido acetico glaciale		
CH ₃ COOH	P.M. = 60.05	SIGMA-ALDRICH
• Acido cloridrico		
HCl	P.M. = 36.46	SIGMA
• 2-propanolo		
(CH ₃) ₂ CHOH	P.M. = 60.10	FLUKA

• Cloruro di palladio	99.99%
PdCl ₂ P.M. = 177.31	SIGMA-ALDRICH
• Esacianoferrato di potassio (III)	99.99%
K ₃ [Fe(CN) ₆] P.M. = 329.24	RIEDEL-DE HAËN

- Perossidasi da *rafano* E.C. 1.11.1.7
SIGMA-ALDRICH
- o-dianisidina dicloroidrato
C₁₄H₁₆N₂O₂ · 2HCl P.M. = 317.21 SIGMA-ALDRICH
- Siero bovino
SIGMA-ALDRICH

con certificato di analisi dell'Analytical Services, St. Louis, Missouri (USA) .

Strumentazione utilizzata:

- Bilancia analitica (HPS)
- pH-metro 338 AMEL Instruments
- Elettrodo a vetro combinato AMEL
- Electrochemical workstation 660 A – CH Instruments
Elettrodo di riferimento: elettrodo a calomelano saturo (SCE) AMEL, a cui saranno riferiti tutti i valori sperimentali di potenziale
Controelettrodo di Pt
Elettrodo di lavoro Pt
- Sistema a flusso FIA
Pompa peristaltica HPLC Merck-Hitachi L6000A
Sistema di iniezione a sei vie Rheodyne 7125 con loop tarato da 10µl
Electrochemical cell 656 (wall-jet)
Detector VA 641 METROHM

Elettrodo di riferimento Ag/AgCl (3M KCl) e contro elettrodo di Au

Elettrodo di lavoro Pt per flusso

- Modulated Speed Rotator (MSR) PINE Research Instrumentation con elettrodo rotante Pt (E3 Series) (RDE) come elettrodo di lavoro
- Diffrattometro Philips PW 1050/81-1710 con sorgente di radiazione $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$)
- Microscopio a scansione elettronica (SEM) EVO 50 Series Instrument (LEO ZEISS) equipaggiato con un sistema di microanalisi INCAEnergy 350 EDS e INCASmartMap (Oxford Instruments Analytical) per visualizzare la distribuzione spaziale degli elementi nel campione analizzato
- Microscopio a forza atomica (AFM) Probe Microscope Vista 100 (Burleigh Instruments), equipaggiato con microscopio ottico Reichert-Jung MeF3A, munito di videocamera a colori JVC-TK-C1381
- Termostato HAAKE D8

Materiale utilizzato:

- Siringa per iniezioni LS (10-500 μl)
- Micropipetta tarata (10-100 μl) – Lab Mate HTL
- Micropipetta tarata (100-1000 μl) – Lab Mate HTL
- Vetreria di uso comune

2.2 PREPARAZIONE DEGLI ELETTRODI

L'elettrodo lavorante di Pt viene prima accuratamente pulito, in quanto non devono essere presenti specie estranee sull'elettrodo. Se l'elettrodo non dovesse essere perfettamente pulito, effettuando una semplice voltammetria ciclica, si noterebbe la presenza di picchi di ossidazione e di riduzione, rappresentativi della specie inquinante, se elettroattiva.

Prima di realizzare la modifica dell'elettrodo, il Pt lavorante viene pulito prima su carta abrasiva a granulometria decrescente e, poi, su un panno da lucidatura con allumina bagnata a diversa granulometria (0.3 e 0.05 μm), in seguito lavato con abbondante acqua bidistillata e posto in bagno ad ultrasuoni per circa 5 minuti, per eliminare eventuale allumina adsorbita sulla superficie. Alla fine di queste operazioni l'elettrodo viene nuovamente lavato con acqua bidistillata e sottoposto a trattamento elettrochimico mediante voltammetria ciclica fra -0.25V e +1.15V a 500 mV s^{-1} in H_2SO_4 0.5M. Infine viene polarizzato per 10 minuti a -0.3V [1].

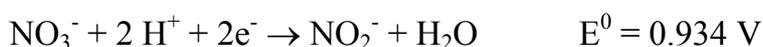
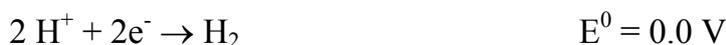
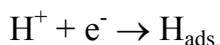
Un sottile film di HT Ni/Al- NO_3 viene depositato sulla superficie dell'elettrodo tramite riduzione di una soluzione di nitrati contenente 0.0225M $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, 0.0075M $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ in 0.3M KNO_3 (soluzione A). La reazione viene effettuata in una cella elettrochimica, a potenziale costante di -0.9 V per 30 secondi.

Il meccanismo responsabile dell'elettrodeposizione dell'idrotalcite [2], descritto nel paragrafo successivo, prevede la sua precipitazione per l'aumento locale di pH in prossimità della superficie elettrodica. Questo fenomeno è dovuto principalmente alla riduzione catodica dei nitrati.

2.3 ELETTROSINTESI DELL' HT Ni/Al- NO_3

In funzione del potenziale di deposizione, del tipo di anione presente nella soluzione elettrolitica, del pH della soluzione, si verificano al catodo molte reazioni, quali:

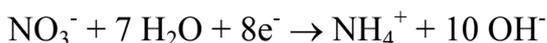
➤ reazioni che portano al consumo di ioni H^+



➤ elettrolisi dell'acqua

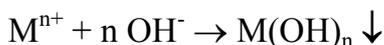


➤ reazioni di riduzione di anioni (nel nostro caso nitrati)



L'aumento di pH sopra descritto è dovuto, quindi, ad un consumo di ioni H^+ e produzione di ioni OH^- .

Le reazioni di riduzione dei nitrati sono caratterizzate da valori di potenziale di riduzione inferiori a quelle della maggior parte delle riduzioni degli ioni metallici (eccetto Cu^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+}), pertanto la deposizione del metallo ($\text{M}^{n+} + n \text{e}^- \rightarrow \text{M}^0 \downarrow$) non si verifica. Lo ione metallico si deposita, invece, sotto forma di idrossido, secondo la reazione:



La coprecipitazione di idrossidi di ioni trivalenti e bivalenti di metalli porta, quindi, alla formazione dell'idrotalcite.

L'elettrodo così modificato viene accuratamente lavato con acqua bidistillata e lasciato asciugare.

2.4 PREPARAZIONE DEI BIOSENSORI

Per adsorbire l'enzima glucosio ossidasi sull'HT è stata utilizzata la seguente procedura:

0.5 mL di una soluzione contenente 20 mg/mL di enzima in PBS (pH 7.0) sono stati aggiunti a 3 mL della soluzione A, descritta nel paragrafo 2.2. L'elettrosintesi è stata effettuata nelle condizioni operative descritte precedentemente.

2.4.1 IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA

Un problema che si riscontra molto comunemente con i biosensori enzimatici è la scarsa stabilità nel tempo, soprattutto in sistemi a flusso, dovuta al lento rilascio dell'enzima nella soluzione dove si esegue la determinazione. Pertanto, diventa estremamente importante realizzare una efficace immobilizzazione dell'enzima sulla superficie del trasduttore.

Visto che non si può escludere una diminuzione dell'attività enzimatica in seguito ad immobilizzazione della biomolecola, si cerca di minimizzarla, utilizzando sistemi che soddisfino tre requisiti essenziali:

- l'immobilizzazione enzimatica deve avvenire in modo che il sito attivo sia accessibile al substrato e, se possibile, con la minima modifica delle strutture terziaria e quaternaria;
- deve essere garantito un rilascio trascurabile della biomolecola;
- la diffusione dell'analita deve essere efficiente.

Infatti dall'immobilizzazione dipendono le prestazioni del sensore, quali sensibilità, stabilità, etc.

I principali problemi legati all'immobilizzazione enzimatica sono la perdita di attività delle biomolecole dovuta a vincoli sulla conformazione (vedi figura 2.1) e la scarsa riproducibilità.

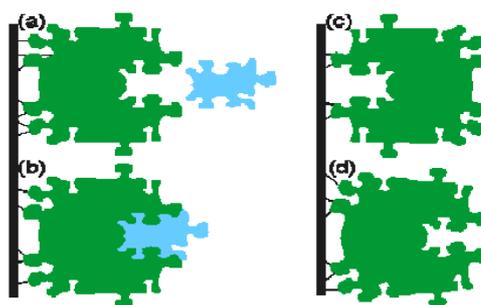


Figura 2.1 Vincoli sulla conformazione: (a) enzima immobilizzato con il suo sito attivo intatto e pronto ad accettare la molecola substrato, come mostrato in (b); (c) enzima legato in modo non produttivo a causa dell'inaccessibilità del sito attivo; (d) la distorsione del sito attivo produce un enzima immobilizzato inattivo.

Da un punto di vista generale le procedure di immobilizzazione degli enzimi possono essere raggruppate in due categorie:

- immobilizzazioni fisiche, in cui l'enzima è semplicemente trattenuto dal supporto, come l'adsorbimento, l'intrappolamento in una matrice polimerica, o all'interno di una membrana che funge da sistema di incapsulamento;
- immobilizzazioni chimiche, in cui l'enzima è legato covalentemente al supporto.

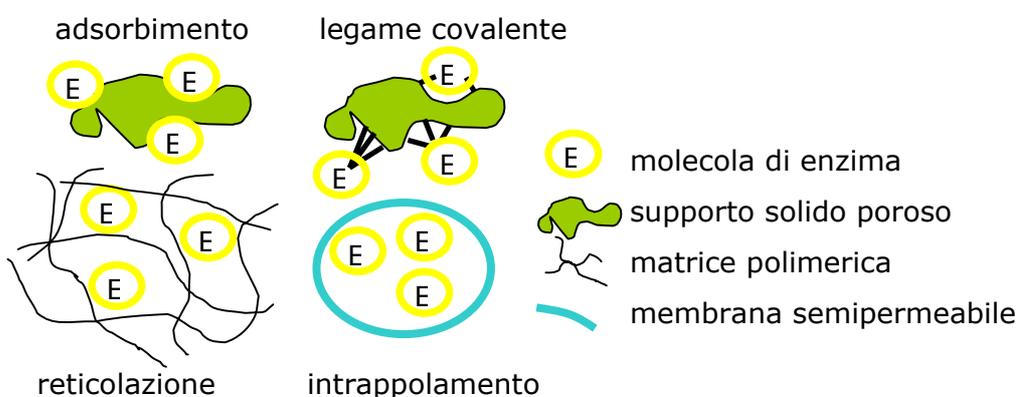


Figura 2.2 Schema riassuntivo delle tecniche per l'immobilizzazione di enzimi.

2.4.1.1 IMMOBILIZZAZIONE FISICA

L'immobilizzazione fisica è operativamente più semplice e più facile da eseguire; preserva con maggiore efficienza le caratteristiche dell'enzima, che però risulta più esposto agli agenti denaturanti (pH, forza ionica, tipo di substrato, temperatura).

Una differenza sostanziale è che l'enzima immobilizzato fisicamente è, generalmente, isolato dal contatto con grandi molecole, che non possono diffondere nella matrice, mentre quello immobilizzato chimicamente può reagire con substrati di tutte le dimensioni.

I materiali più comuni per l'immobilizzazione fisica sono gel di amido, polisaccaridi, alginati, carraginati, chitina per quanto concerne le sostanze naturali; poliacrilammide, polivinili, poliuretani per le sostanze sintetiche.

Immobilizzazione fisica per intrappolamento su gel: le molecole di enzima vengono a trovarsi all'interno di un gel o di una membrana polimerica. Il polimero deve essere impermeabile all'enzima in modo da impedirne la fuoriuscita, ma allo stesso tempo deve permettere la diffusione del substrato e dei prodotti.

Immobilizzazione fisica per adsorbimento: l'enzima è trattenuto sul supporto da legami elettrostatici (ionici, dipolari) e da legami idrogeno.

L'attività della matrice è legata alla sua area superficiale.

L'ancoraggio non è molto stabile e l'enzima può staccarsi facilmente.

Microincapsulamento: l'enzima si trova libero in soluzione, ma confinato in uno spazio dal quale non può uscire. Gli enzimi vengono intrappolati in piccole capsule di diametro variabile fino a 300 μ m. La membrana porosa lascia passare il substrato e il prodotto della reazione e presenta una certa selettività anche nei confronti delle sostanze che entrano in contatto con l'enzima.

2.4.1.2 IMMOBILIZZAZIONE CHIMICA

Con l'immobilizzazione chimica gli enzimi hanno spesso una maggiore stabilità temporale e nei confronti degli agenti denaturanti (pH, forza ionica, inibitori irreversibili, temperatura).

In generale la reazione di immobilizzazione consiste di due fasi: l'attivazione del supporto mediante molecole polifunzionali e la successiva reazione di tali molecole con i gruppi funzionali dell'enzima.

Immobilizzazione chimica mediante reticolazione: l'enzima crea legami covalenti tramite reagenti bifunzionali con macromolecole naturali o sintetiche.

Immobilizzazione chimica mediante legame covalente: l'enzima e il supporto insolubile si legano direttamente o tramite una molecola spaziatrice.

2.4.2 SISTEMI DI STABILIZZAZIONE UTILIZZATI

In questo lavoro di dottorato si è studiato anche l'aspetto riguardante il sistema di stabilizzazione della biomolecola. In particolare sono state prese in considerazione membrane di stabilizzazione innovative, a base di gel di esacianoferrato di palladio (PdHCF) o idrogel di TiO₂, confrontando le prestazioni del biosensore, studiate in cronoamperometria, con quelle ottenute quando si utilizzano sistemi di immobilizzazione più classici come Nafion, vapori di glutaraldeide (GA), o mediante reticolazione con albumina di siero bovino (BSA) e GA.

L'uso di idrogels nella fabbricazione dei biosensori ha ricevuto grande attenzione, poiché essi possiedono caratteristiche molto interessanti per l'immobilizzazione enzimatica, quali l'elevato contenuto d'acqua, che crea un ambiente biocompatibile, l'alta mobilità dell'analita e dei prodotti di reazione, la non tossicità e l'elevata stabilità chimica ed idrolitica.

Si ritiene che tali proprietà favoriscano la biocompatibilità e, conseguentemente, la stabilità enzimatica funzionale.

Reticolazione con glutaraldeide e albumina di siero bovino (GA-BSA):

Per impedire il rilascio dell'enzima nella soluzione da analizzare una membrana di GA-BSA è stata applicata sul film di HT-GOx secondo la seguente procedura:

10 μL di GA (2.5% w/w) e 30 μL di una soluzione di BSA (40 mg mL⁻¹ in PBS, pH 7.0) sono stati mescolati insieme e 10 μL della soluzione risultante sono stati depositati sul film asciutto di HT-GOx [3]. Il biosensore, chiamato Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, è stato tenuto a

temperatura ambiente per circa 2 ore, per permettere la completa evaporazione dell'acqua.

Il reagente bifunzionale, GA, è responsabile della reticolazione tra l'enzima e la BSA che costituisce il materiale di supporto dell'immobilizzazione. La GA presenta due gruppi aldeidici che reagiscono con i gruppi amminici della BSA e dell'enzima, come schematizzato in figura 2.3, formando, in questo modo, un ponte tra la BSA e l'enzima.

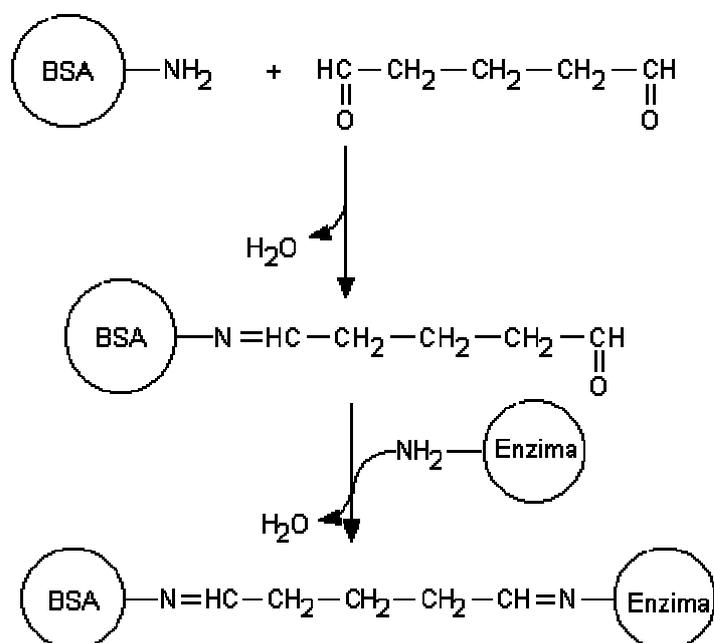


Figura 2.3 Schema di reticolazione con GA-BSA.

Idrogels

Gli idrogels sono polimeri reticolati, tridimensionali, idrofilici, capaci di incorporare grandi quantità di acqua o di fluidi biologici [4]. Mostrano una compatibilità termodinamica con l'acqua, che permette loro di rigonfiarsi nei mezzi acquosi [5]. La letteratura riporta numerose applicazioni di questi idrogel, in particolare nei settori medico e farmaceutico [6].

Gli idrogels assomigliano ai tessuti viventi naturali più di ogni altra classe di biomateriali sintetici. Ciò è dovuto al loro alto contenuto in acqua, che ne determina la biocompatibilità, ed alla consistenza soffice che è simile a quella dei tessuti naturali [7]. Quindi, gli idrogel trovano applicazione per lenti a contatto, membrane per biosensori, rivestimenti per cuori artificiali e dispositivi per il rilascio di farmaci [8].

Gli idrogel possono essere classificati come neutri o ionici, in base al tipo di gruppi laterali. La natura chimica ed il numero di questi gruppi può essere ben controllato dalla scelta dei parametri usati nella sintesi polimerica. Un elenco dei monomeri più comunemente usati nella preparazione dei materiali polimerici in campo farmaceutico è indicato in Tabella 2.1.

Monomero	Abbreviazione
Idrossietil metacrilato	HEMA
Idrossietossietil metacrilato	HEEMA
Metossietil metacrilato	MEMA
Metossietossietil metacrilato	MEEMA
N-isopropil acrilammide	NIPAAm
Acido acrilico	AA
Glicole etilenico	EG
Acetato di vinile	VAc

Tabella 2.1: Alcuni dei monomeri comunemente usati nella sintesi di idrogel per applicazioni farmaceutiche.

Lo studio di nuovi materiali polimerici è iniziato dalla prima applicazione biomedica del poli(idrossietilmetacrilato), conosciuto come PHEMA, da parte di Wichterle e Lim nel 1961 [9].

Invece di utilizzare i classici materiali polimerici già destinati all'uso quotidiano e adattarli alle applicazioni mediche, i ricercatori hanno cercato di progettare materiali che risolvano specifici problemi nel rilascio dei farmaci. Quindi, nuovi materiali basati su polimeri come PHEMA, poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm), e poli(vinil alcol) (PVA), sono sintetizzati principalmente attraverso tecniche di preparazione moderne ed innovative e nuovi monomeri sono stati preparati per la produzione di polimeri con le proprietà desiderate.

L'adeguatezza degli idrogels come dispositivi per il rilascio di farmaci e le loro prestazioni per una particolare applicazione dipendono in larga parte dalla struttura macroscopica (bulk-structure) [10].

Uno dei fattori più importanti che influenzano il rigonfiamento degli idrogels è l'entità della reticolazione, che dipende dal rapporto tra le moli dell'agente reticolante e le moli delle unità ripetitive del polimero. Più tale valore è alto, più agente reticolante è incorporato nella struttura dell'idrogel. Gli idrogels altamente reticolati hanno una struttura più compatta, e si rigonfiano meno, in confronto agli stessi idrogels con un rapporto di reticolazione più basso. La reticolazione ostacola la mobilità della catena polimerica, quindi diminuisce l'entità del rigonfiamento.

Anche la struttura chimica del polimero può influenzare l'entità del rigonfiamento degli idrogels. Quelli contenenti gruppi idrofilici si rigonfiano maggiormente, rispetto a quelli contenenti gruppi idrofobici, poiché i gruppi idrofobici collassano in presenza di acqua.

Per ottenere le proprietà meccaniche desiderate dell'idrogel si varia il grado di reticolazione; aumentandolo, si ottiene un gel più compatto, ma nello stesso tempo più fragile e meno elastico. Pertanto si opererà in modo da ottenere un grado ottimale di reticolazione che garantisca un idrogel relativamente compatto, ma ancora elastico.

Idrogel a base di esacianoferrato di palladio

Quando $K_3Fe(CN)_6$ e K_2PdCl_4 vengono mescolati in soluzione acquosa si osserva un immediato cambiamento di colore a rosso scuro e la viscosità della soluzione aumenta, indurendo gradualmente fino a formare un idrogel polimerico.

Visivamente il prodotto si presenta come un materiale gelatinoso. L'analisi termogravimetrica rivela che gli idrogels contengono una quantità d'acqua pari al 99%, subito dopo la loro formazione; in seguito, solitamente, il contenuto di acqua si stabilizza intorno al 96%.

Quando il rapporto molare Pd:Fe è alto (3:1), si ottiene un gel stabile; mentre quando è presente più Fe che Pd, il gel si frattura, in quanto l'esacianoferrato contribuisce maggiormente alla rigidità del network del gel [11].

L'isomero cis dovrebbe essere il principale prodotto di reazione (fig. 2.4), poiché la sostituzione di due gruppi cloruro per centro di palladio da parte di un ponte N-terminale di cianuro avviene secondo un attacco in trans.

In figura 2.4 è mostrata una possibile struttura della catena polimerica. Le misure IR hanno indicato la presenza di legami a ponte mediante gruppi cianuro, che porta alla formazione delle catene polimeriche.

Tre possibili tipi di reticolazione intercatena sono plausibili:

1. un terzo ponte Pd-NC-Fe;
2. un ponte CN-HOH-Pd, dovuto alla formazione di un legame idrogeno;
3. un ponte Pd-Cl-Pd.

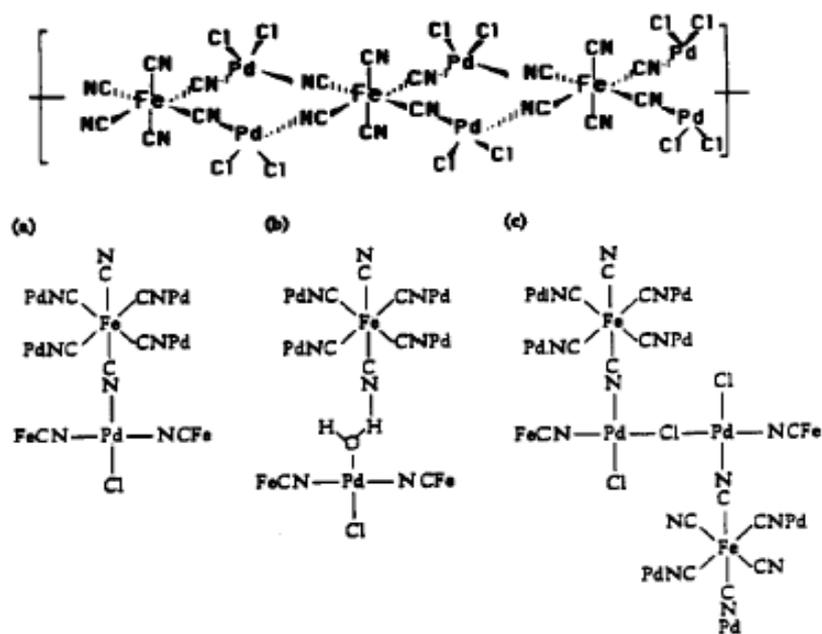


Figura 2.4 Catena polimerica; (a), (b), (c) possibili ponti intercatena [11].

Con l'utilizzo del Pd idrogel si riducono al minimo le possibili alterazioni della conformazione nativa e quindi della funzionalità dell'enzima.

Procedura utilizzata per la preparazione del gel di esacianoferrato di palladio (PdHCF):

25 μL di una soluzione di $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (33 mM) in PBS (pH 6.0) vengono aggiunti a 50 μL di acqua deionizzata, successivamente, alla soluzione si aggiungono 25 μL di PdCl_2 (66 mM) in KCl (0.15M) [procedura riportata da D.Ivekovic et al. su *Biosensor & Bioelectronics* **20** (2004) 9872 con concentrazioni diverse].

10 μL della miscela risultante vengono depositati sul film asciutto di HT-GOx e lasciati in aria a temperatura ambiente per 15 minuti. I biosensori, così ottenuti, sono conservati in atmosfera satura di vapori di PBS a 4°C , per 24 h.

Idrogel a base di ossido di titanio

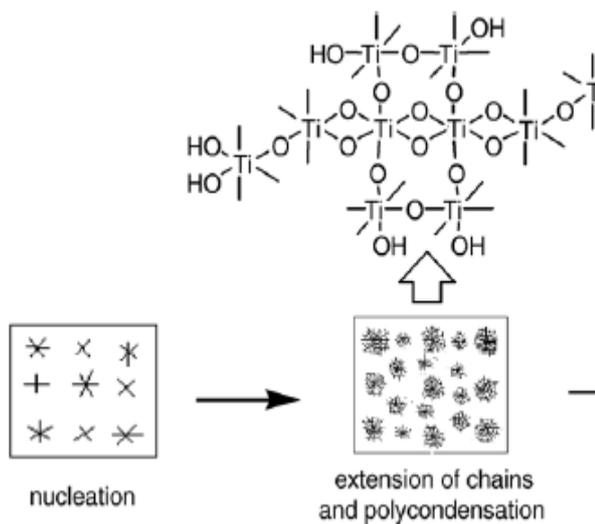


Figura 2.5

L'idrogel si ottiene come prodotto di una serie di processi simultanei come idrolisi e policondensazione. Il processo generale per la formazione di questi idrogel comprende:

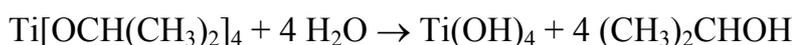
1. Idrolisi controllata del precursore di titanio così preparato:

Soluzione del precursore:

- 5 mL 2-propanolo
- 40 mL CH₃COOH concentrato
- 20 mL HCl in 2-propanolo, per diluizione di HCl conc. in rapporto volumetrico 1:9.
- 0.5 mL Ti[OCH(CH₃)₂]₄

Il precursore viene poi aggiunto lentamente a 6 mL di acqua distillata, mantenendo la soluzione sotto agitazione per 10 minuti[12].

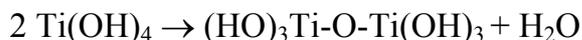
Reazione di idrolisi:



Generalmente si utilizzano alcossidi di titanio, molto reattivi per la presenza dei gruppi -OR, che stabilizzano il metallo nel suo stato di ossidazione più elevato, agendo da donatori di elettroni, ed, inoltre,

essendo molto elettronegativi lo rendono disponibile ad un attacco nucleofilo;

2. Condensazione di molecole idrolizzate:



Sia la condensazione che l'idrolisi possono essere catalizzate da sostanze acide o basiche.

La catalisi acida permette la protonazione dei gruppi -OH terminali, conferendo loro una carica positiva che li trasforma in buoni gruppi uscenti; questo tipo di catalisi porta a catene polimeriche più lunghe e meno ramificate. La catalisi basica, invece, favorisce la deprotonazione del gruppo idrossilico con la formazione di gruppi Ti-O⁻ fortemente nucleofili.

3. Policondensazione con formazione di particelle colloidali di grosse dimensioni, che producono un polimero che presenta il ripetersi di legami Ti-O-Ti.

Le dimensioni delle particelle dipendono sia dal pH che dal rapporto tra acqua e isopropossido di titanio.

4. Gelificazione con formazione di una struttura tridimensionale, con legami e proprietà determinate dalle dimensioni delle particelle.

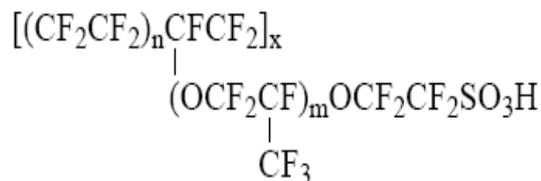
Un volume di 10 µl della sospensione ottenuta aggiungendo il precursore all'acqua viene depositato sulla superficie elettrodica.

La gelificazione avviene in atmosfera satura di vapori acquosi, mantenendo gli elettrodi a contatto con i vapori saturi di una soluzione di tampone fosfato (pH 7.0) ad una temperatura di 4°C, per 24 h.

Nafion

Il Nafion fu sviluppato e prodotto dalla E. I. DuPont Company per copolimerizzazione di tetrafluoroetilene e perfluoro-2-(fluorosolfonil-etossi)propil vinil etere.

La struttura generale è riportata di seguito:



I pori permettono il movimento dei cationi, ma non quello di anioni ed elettroni. La massa molecolare del Nafion è stimata 10^5 - 10^6 Da.

Il primo modello proposto per il Nafion, chiamato Cluster-Channel o Cluster – Network, consiste in una distribuzione di cluster ionici solfonati con un diametro di circa 4 nm; stretti canali di circa 1 nm collegano i clusters e permettono il movimento dei cationi. In seguito all'idratazione si è osservato un aumento del diametro dei clusters.

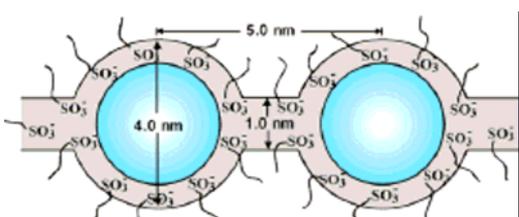


Figura 2.6 Morfologia del Nafion idratato

Il Nafion è stato ampiamente utilizzato per lo sviluppo di membrane contenenti enzimi.

Il metodo di preparazione della membrana è molto semplice: un piccolo volume di soluzione viene depositato sulla superficie elettrodica e si lascia evaporare il solvente. La membrana che si ottiene presenta una elevata adesione alla superficie e un basso swelling in soluzioni acquose.

Il Nafion è stato diluito con acqua al fine di prevenire la denaturazione delle proteine in solvente organico [13]. Da uno studio preliminare effettuato diluendo il Nafion con etanolo e metanolo, e non con acqua, si è potuto osservare come la sensibilità del biosensore subisca una drastica diminuzione, se si utilizzano tali solventi organici.

Preparazione di elettrodi con membrana a base di Nafion:

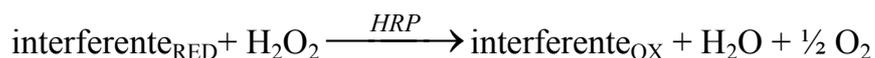
10 μL di una soluzione, ottenuta diluendo con acqua il Nafion commerciale fino ad una concentrazione di 0.5%, vengono depositati sulla superficie elettrodica. Si attende che l'acqua evapori completamente, mantenendo il sensore in aria a 25°C.

Tutti gli elettrodi sono stati conservati a 4°C, in PBS. Prima dell'uso, i biosensori vengono mantenuti a temperatura costante di 25°C per 30 minuti nella soluzione di misura, per ristabilire l'attività enzimatica [14].

Biosensori bienzimatici:

Gli elettrodi modificati con la membrana di stabilizzazione a base di PdHCF hanno mostrato una selettività sufficiente solamente per analisi in campo alimentare, come nel caso di succhi di frutta, dove l'interferente principale è l'acido ascorbico (AA).

Al fine di migliorare la selettività del biosensore, si è applicato uno strato pre-ossidante contenente perossidasi da rafano (HRP). In tal modo gli interferenti, eventualmente presenti nella matrice da analizzare, vengono ossidati prima che arrivino alla superficie elettrodica e, quindi, rivelati dal trasduttore, secondo la reazione:



Questo approccio è stato anche testato con i biosensori che utilizzano come sistema di stabilizzazione la membrana ottenuta per reticolazione di GA-BSA.

Preparazione del gel a base di PdHCF contenente HRP:

Si prepara una sospensione contenente 2 mg di HRP in 50 μL di una soluzione di $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (33 mM) in PBS (pH 6.0); a tale sospensione si aggiungono 100 μL di acqua bidistillata. Dopo un'attesa di circa 30 minuti a temperatura ambiente, si aggiungono 50 μL di una soluzione di PdCl_2 (66 mM) in KCl 0.15 M.

10 μL della miscela risultante vengono depositati sul film asciutto di HT-GOx e lasciati in aria a temperatura ambiente per 15 minuti. I biosensori, così ottenuti, sono conservati in atmosfera satura di vapori di PBS a 4°C, per 24 h.

2.5 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO

La maggior parte dei biosensori a base di GOx sfruttano l'ossidazione elettrochimica a potenziali anodici dell'acqua ossigenata, che è un prodotto della reazione enzimatica quando si opera in ossigeno, come, comunemente, avviene.

Le prestazioni del biosensore sono state valutate misurando la corrente di stato stazionario a +0.45V all'aumentare della concentrazione di glucosio nelle soluzioni di PBS (pH 7.0).

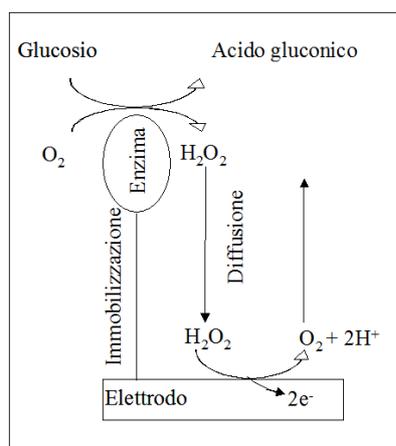


Figura 2.7 Schema esemplificativo del funzionamento del biosensore.

Il potenziale anodico costante è stato applicato all'elettrodo Pt-(HT-GOx)-GA-BSA per misurare la risposta amperometrica dovuta all'elettro-ossidazione del perossido di idrogeno (vedi schema sopra-riportato).

Aliquote di glucosio sono state aggiunte alla soluzione di PBS, utilizzando condizioni idrodinamiche ($\omega = 200 \text{ rpm}$) e si è registrato il corrispondente aumento in corrente. I valori di corrente di stato stazionario (in A), da cui è stato sottratto il “background” (registrato in

PBS), sono stati usati per costruire la curva di calibrazione in funzione della concentrazione di glucosio (mM). La pendenza (S) della curva di calibrazione rappresenta la sensibilità del biosensore (vedi inserto di Figura 2.8).

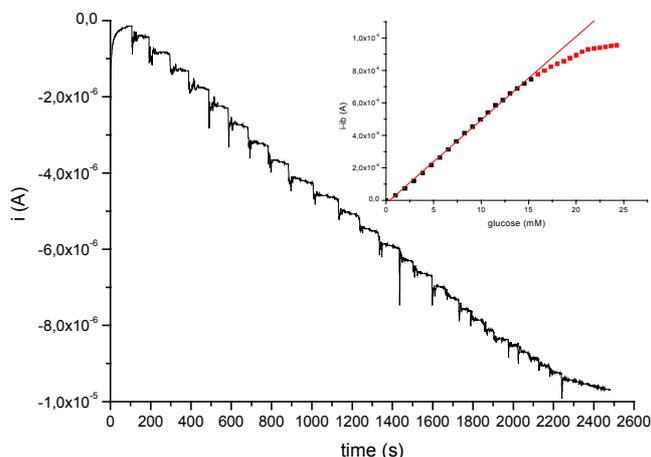
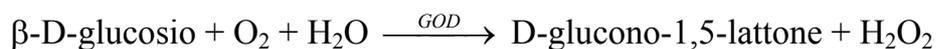


Figura 2.8 Tipico responso amperometrico del biosensore per la determinazione di glucosio (aggiunte successive di aliquote di glucosio 1 mM); nell'inserto è mostrata la corrispondente curva di calibrazione.

In matrici reali la determinazione quantitativa di glucosio è stata effettuata sia usando direttamente la curva di calibrazione sia con il metodo delle aggiunte standard. Un'analisi indipendente della concentrazione di glucosio è stata effettuata usando il metodo spettrofotometrico basato sulla misura di assorbanza a 460 nm, che risulta dall'ossidazione della o-dianisidina attraverso l'accoppiamento della GOx con HRP [15], secondo:



TECNICHE DI ANALISI

Le misure con i biosensori sono state condotte in batch e in flusso.

Analisi in batch

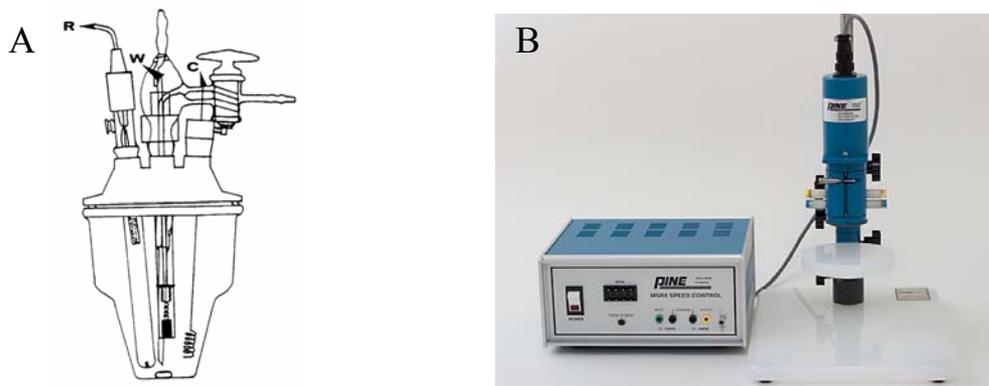


Figura 2.9 A) Cella elettrochimica; B) Speed rotator

Nelle misure in batch il biosensore, utilizzando condizioni idrodinamiche ($\omega = 200$ rpm), è immerso in una soluzione tampone. Dopo la stabilizzazione del segnale di corrente, vengono aggiunte quantità note di campione alla soluzione tampone. L'intensità di corrente che si ottiene è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita. Al termine di ogni serie di misure il biosensore viene immerso in una nuova soluzione tampone, in modo da effettuare un lavaggio della superficie e il ripristino del valore iniziale di corrente.

Gli esperimenti elettrochimici in batch sono stati effettuati utilizzando una cella elettrochimica a singolo compartimento di una stazione elettrochimica CHInstruments Model 660 A, controllata attraverso un personal computer mediante il software fornito dalla CHInstruments. I potenziali elettrodi sono stati misurati rispetto ad un elettrodo a calomelano saturo (SCE). Un filo di Pt è stato utilizzato come contro-elettrodo e la temperatura è stata controllata mediante un termostato Julabo MB-5.

Flow Injection Analysis (FIA)

La FIA è una metodica analitica che utilizza il flusso continuo di un carrier (tampone o miscela di reattivi) nel quale vengono immessi volumi precisi e altamente riproducibili del campione in esame.

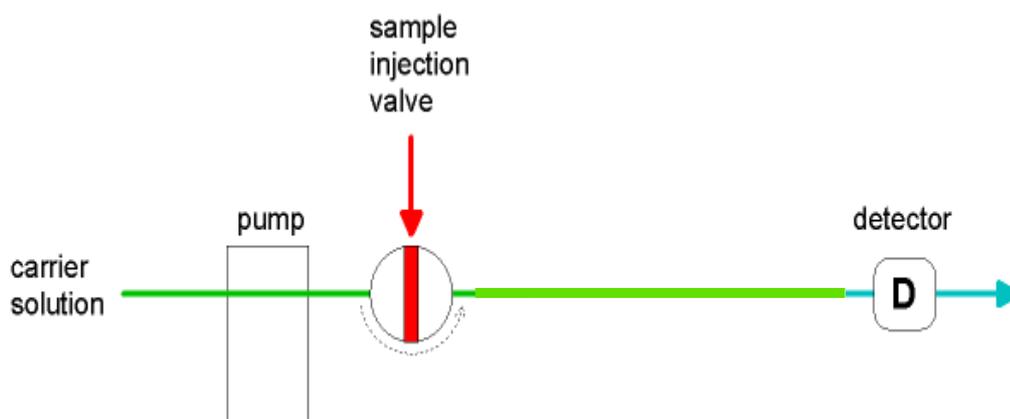


Figura 2.10 Schema di un sistema a flusso.

Il carrier, che può essere semplicemente un tampone o una miscela di reattivi, viene introdotto nel sistema attraverso una pompa, mentre il campione, prelevato su un altro circuito, viene iniettato attraverso un sistema di iniezione, analogo a quello utilizzato nella cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC). Nel punto di raccordo dei tubi la corrente analitica di carrier e il segmento di campione si incontrano e si mescolano e successivamente vengono inviati alla camera di reazione. Qui il campione può reagire con il carrier (se è costituito da una miscela di reattivi) oppure essere semplicemente diluito. Il prodotto della reazione viene inviato ad un apposito detector collegato ad un sistema di registrazione.

I vantaggi di un sistema FIA sono:

- possibilità di utilizzare piccoli volumi di campione;
- tempi di analisi brevi, in quanto non è necessario attendere il raggiungimento dello stato stazionario (la curva di risposta è quindi a forma di picco (figura 2.11));
- possibilità di operare più analisi consecutive sullo stesso campione;
- condizioni fisiche riproducibili;

- diluizione del campione per effetto del fenomeno della dispersione.

Questo ultimo aspetto può essere un vantaggio sia per quanto riguarda gli effetti di interferenza, fouling di membrana, sporcamento dell'elettrodo dovuti alla matrice del campione, sia per ottenere, nel caso già citato di campioni a concentrazione di analita molto elevata, una sua riduzione e, quindi, la scomparsa dell'effetto di saturazione da substrato.

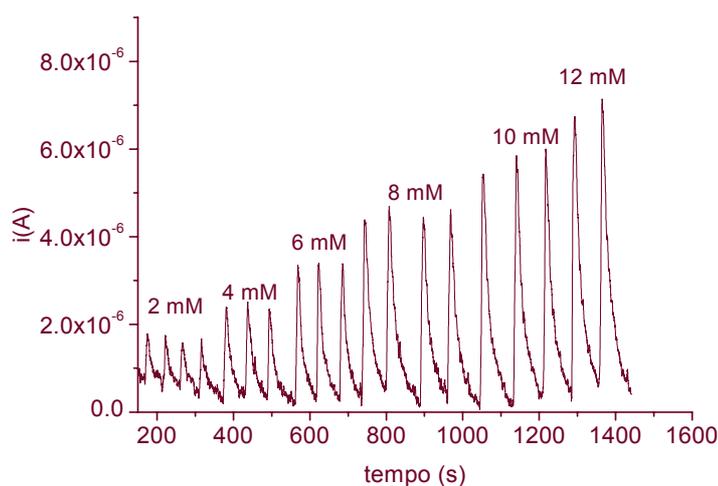


Figura 2.11 Risposta amperometrica tipica di un sistema a flusso. Le corrispondenti concentrazioni di glucosio sono riportate in figura.

Come mostrato in figura 2.10, le parti essenziali di un sistema FIA sono: un mezzo di propulsione del carrier (pompa), un sistema di iniezione del campione, un rivelatore, un registratore grafico del segnale o un sistema di acquisizione digitale dei dati e i tubi di connessione.

Questo apparato può essere facilmente assemblato a partire da apparecchiature di laboratorio utilizzate per altri scopi con risultati soddisfacenti. Nel nostro caso abbiamo utilizzato un apparecchio costituito da una valvola d'iniezione a sei vie Rheodyne 7125 con un loop da 10 μ l, una pompa HPLC Merck-Hitachi L6000 A, un rivelatore elettrochimico Metrohm, detector VA 641. Il rivelatore consiste in una cella elettrochimica wall-jet da 1 μ l (Metrohm, model 656) nella configurazione a tre elettrodi (elettrodo di riferimento: Ag/ AgCl/ 3.0 M

KCl, contro elettrodo: Au, 2 mm di diametro ed elettrodo di lavoro) e in un potenziostato per le misure amperometriche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C.S. Kim, M. Oh, *Electrochim. Acta*, **41** (1996) 2433
- [2] E. Scavetta, B. Ballarin, M. Giorgetti, I. Carpani, F. Cogo, D. Tonelli, *J. New Mat. Electrochem. Syst.*, **7** (2004) 43
- [3] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Analytica Chimica Acta*, **532** (2005) 145 – 151
- [4] N.A. Peppas, A.G. Mikos, Preparation methods and structure of hydrogels, in: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986, pp. 1-27
- [5] P.J. Flory, J. Rehner, Statistical mechanics of cross-linked polymer networks. II. Swelling, *J. Chem. Phys.* **11** (1943) 521-526; P.J. Flory, Statistical mechanics of swelling of network structures, *J. Chem. Phys.* **18** (1950) 108-111
- [6] N.A. Peppas, R. Langer, New challenges in biomaterials, *Science* **263** (1994) 1715-1720
- [7] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, Synthetic hydrogels for biomedical applications, in: J.D. Andrade (ed.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series, No. 3, American Chemical Society, Washington, DC, 1976, pp. 1-36
- [8] N.A. Peppas, Hydrogels and drug delivery, *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.* **2** (1997) 531-537
- [9] O. Wichterle, D. Lim, Hydrophilic gels for biological use, *Nature* **185** (1960) 117-118
- [10] M.T. am Ende, A.G. Mikos, Diffusion-controlled delivery of proteins from hydrogels and other hidrophilic systems, in: L.M. Sanders, R.W. Hendren (Eds.), *Protein Delivery: Physical Systems*, Plenum Press, Tokyo, 1997, pp. 139-165;
- [11] B.W.Pfennig, A.B.Bocarsly, R. K. Prud'homme *J.Am.Chem.Soc.* **115** (1993) 2661-2665

[12] A. Madej, M. Góral, P. Nowak, J. Rodakiewicz-Nowak, A.J. Wilkolazka, M. Dziurka, “Transition metal doped titania gels immobilized laccase electrodes for determination of phenolic compounds” (PS2-143), 5-10 September 2004, Euroanalysis XIII, Salamanca, Spain.

[13] G. Fortier, M. Vaillancourt, D. Belanger, *Electroanalysis* **4** (1992) 275-283

[14] A. Mignani, G. Luciano, S. Lanteri, R. Leardi, E. Scavetta, D. Tonelli, *Analytica Chimica Acta*, **599** (2007) 36-40

[15] J. Duley, R. Holmes, *Anal. Biochem.* **69** (1975) 164

CAPITOLO 3

3.1 CARATTERIZZAZIONE DELL'HT

E' stato effettuato un ampio studio al fine di trovare le migliori condizioni per modificare elettrodi di platino mediante un solo step di elettrosintesi dell'HT Ni/Al-NO₃. I film, ottenuti in differenti condizioni sperimentali, sono stati caratterizzati mediante tecniche differenti, quali SEM, AFM, XRD. Si è dedicata particolare attenzione al meccanismo di crescita dei film e, in particolare, ai cambiamenti della natura chimica del materiale depositato sulla superficie elettrodica in funzione del tempo di elettrosintesi e della concentrazione dei nitrati di nichel e di alluminio. Tali film sono stati caratterizzati anche mediante tecniche elettrochimiche, quali voltammetria ciclica e spettroscopia di impedenza AC. Gli elettrodi sono stati puliti secondo la procedura riportata nel paragrafo 2.2.

Un film di idrotalcite Ni/Al-NO₃ è stato depositato mediante riduzione di una soluzione contenente nitrati di nichel ed alluminio in nitrato di potassio come elettrolita di supporto.

Sono state studiate due soluzioni a differente concentrazione, che definiremo come:

Soluzione A: Ni(NO₃)₂ 0.225 M; Al(NO₃)₃ 0.075 M in KNO₃ 0.3 M

Soluzione B: Ni(NO₃)₂ 0.0225 M; Al(NO₃)₃ 0.0075 M in KNO₃ 0.3 M

La reazione elettrochimica è stata effettuata in una cella a tre elettrodi, applicando un potenziale di -0.9V vs. SCE, come già descritto nel paragrafo 2.2. Sono stati presi in considerazione sei tempi di deposizione: 10, 30, 50, 60, 90, 120 s.

3.2 ELETTROSINTESI (SOLUZIONE A)

La modifica degli elettrodi tramite elettrodeposizione di HT è cominciata utilizzando la soluzione di sali di nichel e alluminio più concentrata (sol. A). Il pH spontaneo di tale soluzione è 2.8.

Le superfici elettrodiche ottenute a diversi tempi di deposizione sono state caratterizzate mediante microscopia ottica e a scansione elettronica (SEM).

Non sono stati studiati tempi di elettrosintesi superiori a 120 s, poiché in tali condizioni il film elettrosintetizzato inizia a creparsi e a staccarsi dall'elettrodo. (Vedi figura 3.1.)

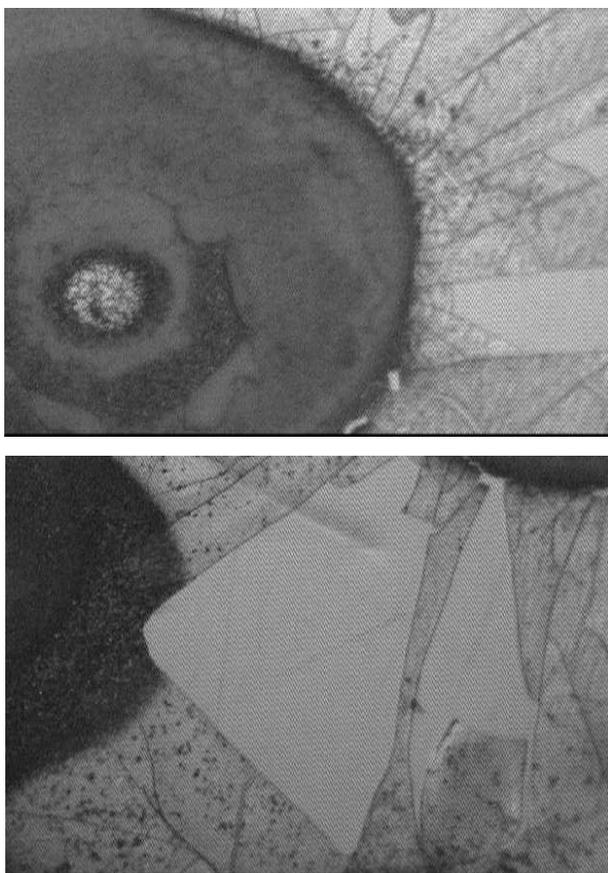


Figura 3.1. Fotografie al microscopio ottico di film ottenuti su Pt dopo 150 s di elettrodeposizione, in cui sono evidenti zone scoperte (MAG = 20X).

Per i tempi di deposizione presi in considerazione (≤ 120 s) tutti gli elettrodi risultano ben ricoperti e i film sono caratterizzati da zone circolari di dimensioni crescenti all'aumentare del tempo di deposizione

(vedi fig. 3.2), ad eccezione del tempo più breve, 10 s, per il quale il film risulta perfettamente omogeneo.

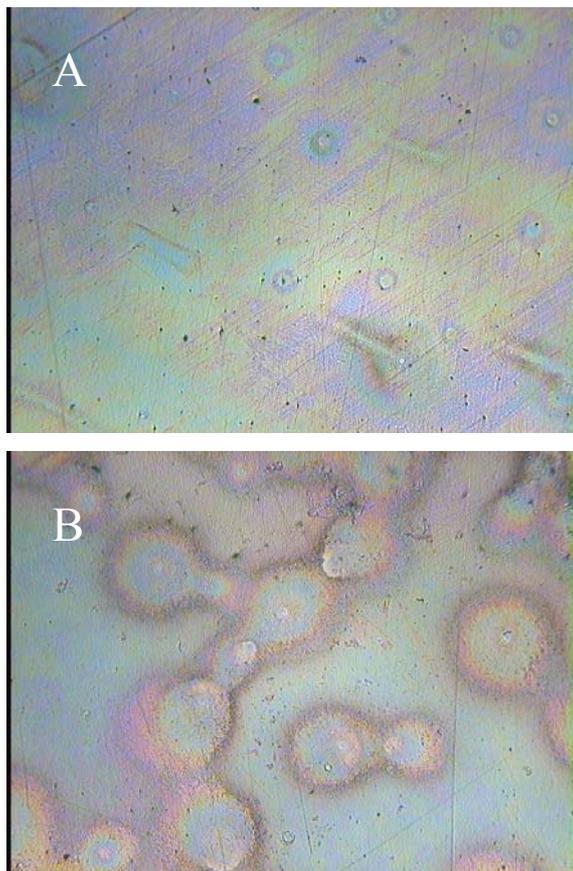


Figura 3.2. Fotografie al microscopio ottico di film ottenuti su Pt a: (A) $t = 30$ s e (B) $t = 90$ s (MAG = 10X).

3.2.1 SEM/EDS

Mediante microanalisi EDS effettuata all'interno e all'esterno delle zone circolari è stato possibile caratterizzare la composizione dei film in tali zone. Particolare attenzione è stata rivolta al rapporto Ni/Al in quanto per ottenere una vera fase idrotalcitica è necessario che tale valore sia compreso tra 1.3 e 4.9.

In tabella 3.1 sono mostrati i valori dei rapporti Ni/Al ottenuti per i tempi di deposizione studiati sia all'interno che all'esterno delle zone circolari osservate (vedi figura 3.3). Tutti i risultati riportati sono la media di tre misure in differenti zone dello stesso campione.

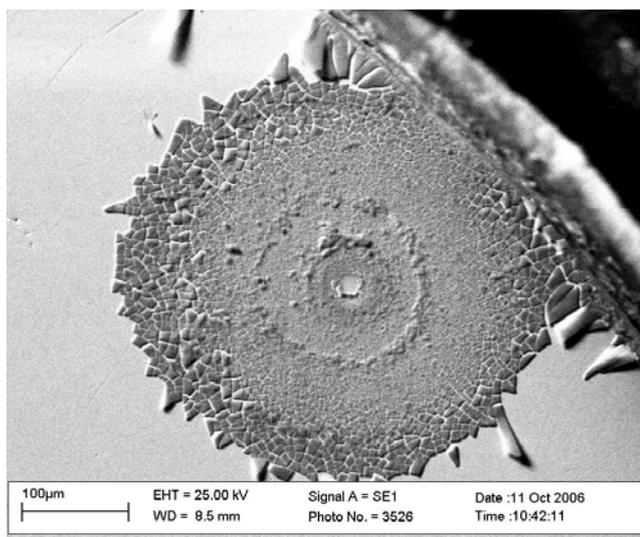


Figura 3.3 Immagine SEM di una zona circolare. Magnification: 1000×.

Tempo di deposizione	Punti di interesse (interno ed esterno delle zone circolari)	Rapporto molare Ni/Al
10 s	Film omogeneo	0.06/1
30 s	Interno	0.39/1
	Esterno	0.05/1
50 s	Interno	0.92/1
	Esterno	0.08/1
60 s	Interno	0.98/1
	Esterno	0.08/1
90 s	Interno	1.3/1
	Esterno	0.09/1
120 s	Interno	1.9/1
	Esterno	0.1/1

Tabella 3.1 Rapporti molari Ni/Al ottenuti dalle microanalisi EDS

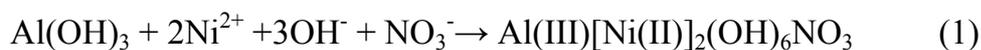
Come si può notare dai risultati ottenuti per il tempo di deposizione più breve, i film sono caratterizzati da un'alta percentuale di alluminio e, come già detto, non presentano zone circolari.

Il contenuto di nichel aumenta con il tempo di deposizione, specialmente all'interno delle zone circolari, mentre all'esterno il rapporto Ni/Al cresce molto lentamente ed è quasi costante per i campioni ottenuti a tempi più prolungati di 90 s di elettrosintesi.

All'interno delle zone circolari ($t \geq 90$ s) il rapporto molare è compatibile con quello atteso per una struttura tipo idrotalcitica.

Sebbene la tecnica di caratterizzazione SEM/EDS sia un'analisi di superficie e, quindi, adatta a film sottili, le osservazioni sopra riportate ci permettono di trarre importanti informazioni sul meccanismo di crescita del film sulla superficie elettrodica di Pt.

Il composto che precipita per primo è costituito principalmente da $\text{Al}(\text{OH})_3$, a causa della sua solubilità molto bassa, e questo idrossido copre completamente la superficie elettrodica. La precipitazione del $\text{Al}(\text{OH})_3$ avviene molto rapidamente poichè la concentrazione iniziale del Al^{3+} è alta e il pH di precipitazione si stabilisce immediatamente a seguito della riduzione catodica dei nitrati. Il materiale depositato sul Pt è amorfo [1] e non porta ad un film uniforme, ma mostra delle zone circolari, la cui forma è probabilmente dovuta all'evoluzione delle bolle di H_2 che si sviluppano durante la riduzione di nitrati. Mentre la reazione di riduzione procede, il valore locale di pH nella soluzione in prossimità dell'elettrodo aumenta fino a favorire la ridissoluzione di $\text{Al}(\text{OH})_3$ ad alluminato, AlO_2^- . La presenza del Ni^{2+} e degli ioni nitrato nella medesima soluzione porta progressivamente alla conversione dell'idrossido di alluminio nell' HT Ni/Al- NO_3 [2], secondo la seguente reazione, che ha luogo con maggior efficacia nelle zone circolari, grazie probabilmente ad un pH locale più alcalino:



Tutti i film elettrosintetizzati sono stati caratterizzati mediante CV in una soluzione acquosa di NaOH (0.1 M, pH 12.8) in un intervallo di potenziale compreso tra 0 e 0.75 V (vs SCE).

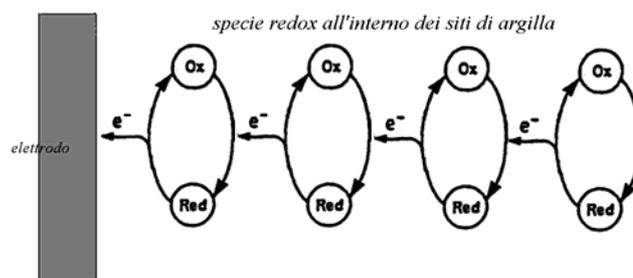
Il processo redox in cui è coinvolta l'HT in un elettrolita basico può essere rappresentato dalla seguente reazione [3]:



Il trasporto di carica all'interno del materiale avviene grazie ad un meccanismo misto che comprende:

- “electron hopping” a livello degli strati di HT;
- migrazione di anioni dalla soluzione agli spazi interstrato dell'HT, per compensare la carica positiva che acquistano gli strati tipo brucitici quando si applica un potenziale anodico.

Il meccanismo di electron hopping consiste nel trasferimento di carica da un sito di HT ad un altro attraverso cicli ossido riduttivi di specie redox adiacenti (reazione redox interna). Il meccanismo di electron hopping può essere rappresentato schematicamente:



3.2.2 VOLTAMMETRIA CICLICA (CV)

È stata effettuata la caratterizzazione elettrochimica degli elettrodi di Pt modificati con HT Ni/Al-NO₃ sintetizzata sia col metodo di coprecipitazione, che mediante elettrosintesi, registrando voltammetrie cicliche in ambiente basico.

Il responso voltammetrico, registrato ad un elettrodo modificato con una HT, ottenuta per coprecipitazione mostra già dai primi cicli, due picchi

redox a $E_{pa} = 0.59$ V e $E_{pc} = 0.40$ V. La posizione di tali picchi risulta dipendente dalla velocità di scansione del potenziale e dalla concentrazione dell'elettrolita [3].

Invece, quando si effettua una CV ad un elettrodo modificato con un film di HT elettrosintetizzato non si osserva, inizialmente, alcuna coppia di picchi redox. Solamente ciclando a potenziali anodici compresi tra 0.0 e 0.75 V si inizia ad osservare un sistema di picchi redox caratterizzato da correnti crescenti nel tempo. Dopo circa 100 cicli la corrente raggiunge un valore stabile.

La figura 3.4 mostra il primo e il centesimo ciclo ottenuto per un elettrodo modificato con HT elettrosintetizzata per 30 secondi.

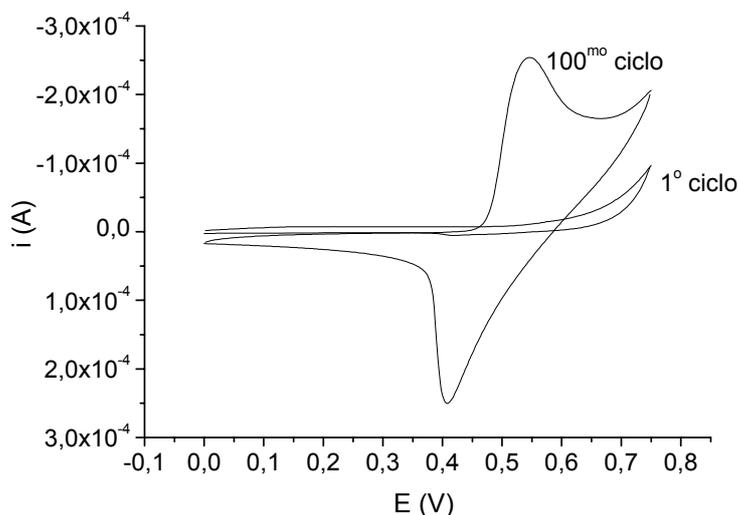


Figura 3.4 CV (1° and 100^{mo} ciclo) registrato in una soluzione di NaOH 0.1 M, per un elettrodo di Pt modificato con HT elettrosintetizzata a $E = -0.9$ V per 30 s; velocità di scansione del potenziale = 0.05 V s⁻¹.

Il potenziale del picco anodico è centrato a 0.55 V, quindi ad un valore inferiore a quello atteso per un' HT Ni/Al-NO₃, mentre il valore del potenziale del picco catodico è 0.40 V, cioè lo stesso valore osservato per l'HT ottenuta per coprecipitazione. L'osservazione dell'elettrodo al microscopio ottico rivela, dopo 100 cicli, una parziale rottura del film e un cambiamento del colore delle zone circolari che diventano scure.

La variazione di colore da verde chiaro a nero è indicativa di un fenomeno ampiamente conosciuto che avviene sia agli elettrodi modificati con $\text{Ni}(\text{OH})_2$ che con HT a base di nichel [4,5], se questi vengono sottoposti a cicli di potenziale. La persistenza del colore nero è dovuta alla parziale irreversibilità della reazione redox del nichel che lascia il Ni in uno stato parzialmente ossidato; infatti, la riduzione del Ni(III) è molto più lenta dell'ossidazione, così non si verifica la completa riduzione dei centri di nichel [1].

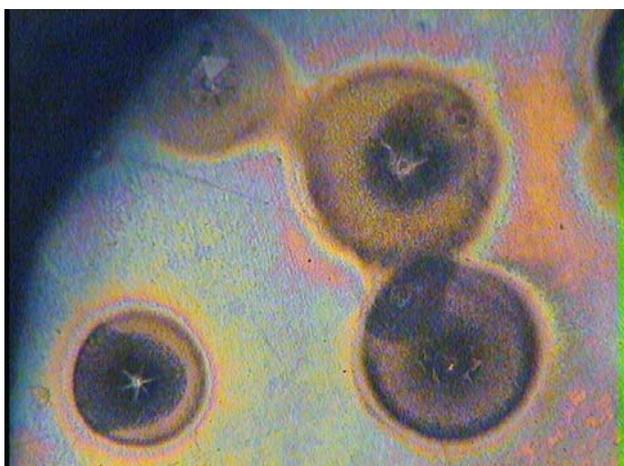


Figura 3.5 Fotografia al microscopio ottico del film depositato su Pt per $t = 120$ s, dopo aver ciclato l'elettrodo in una soluzione di NaOH 0.1 M per 1 h. (MAG = 10X).

La microanalisi EDS è stata effettuata dopo aver sottoposto a cicli di potenziale (tra 0.0 V e 0.8 V) l'elettrodo modificato con HT per 1 h in una soluzione di NaOH 0.1 M: nella tabella 3.2 vengono riportate le percentuali in massa relative al Ni, Al e Pt del film elettrosintetizzato per 120 s.

La percentuale in massa del Pt è stata inserita poichè fornisce informazioni relativamente allo spessore locale del film, infatti più il valore percentuale è alto, più sottile sarà lo spessore del materiale depositato.

Il rapporto Ni/Al è stato valutato sia all'interno che all'esterno delle zone circolari.

I risultati ottenuti mostrano che, dopo aver ciclato l'elettrodo in soluzione basica, il rapporto Ni/Al rimane praticamente costante all'interno delle zone circolari, mentre esternamente vi è un significativo aumento di tale rapporto, in conseguenza ad una notevole diminuzione nella percentuale in massa dell'alluminio.

	prima di ciclare il potenziale		dopo aver ciclato	
	all'interno di una zona circolare	all'esterno di una zona circolare	all'interno di una zona circolare	all'esterno di una zona circolare
Al massa%	2.0	5.0	1.2	1.0
Ni massa %	8.3	1.8	5.3	1.9
Pt massa %	43.6	54.5	44.1	57.3
rapporto molare Ni/Al	1.9/1	0.1/1	2.0/1	0.87/1

Tabella 3.2 Percentuali in massa di Ni, Al, Pt e rapporti molari di Ni/Al ottenuti mediante microanalisi EDS.

Dai risultati ottenuti per il Pt, si può osservare che il film risulta essere più sottile all'esterno delle zone circolari rispetto al resto del deposito e che, dopo l'ossidazione, il film diventa ancora più sottile probabilmente a causa della parziale disgregazione dello strato di idrossido di alluminio, ipotesi confermata dalla diminuzione del valore di percentuale in massa di alluminio. Il fatto che il rapporto Ni/Al rimanga costante all'interno delle zone circolari è in accordo con l'ipotesi che queste zone siano prevalentemente costituite da una fase idrotalcitica, che è noto essere stabile durante CV in ambiente basico. R. Roto et al. hanno dimostrato, recentemente, che alcuni cambiamenti strutturali avvengono ciclando un'HT Ni/Al-Cl in soluzione basica (NaOH 0.1 M), ma sono quasi trascurabili nel caso di un'HT Ni/Al-CO₃ [6].

3.2.3 XRD

Abbiamo tentato di caratterizzare la natura del materiale ossidato sulla superficie elettrodica mediante XRD, ma tale analisi, effettuata sul film, elettrosintetizzato per 120 s, non ha mostrato alcuna evidenza dei riflessi tipici di un'HT Ni/Al-NO₃. Tale risultato può essere dovuto alla scarsa quantità di materiale depositato, si tratta infatti di un film sottile, oppure dalla sua scarsa cristallinità. Per ottenere un diffrattogramma a raggi X tipico di un'HT è stato necessario prolungare il tempo di deposizione e rimuovere meccanicamente il deposito dalla superficie elettrodica per effettuare l'analisi. In figura 3.6 è riportato il diffrattogramma ottenuto analizzando il prodotto ottenuto dopo 1000 s di deposizione elettrochimica.

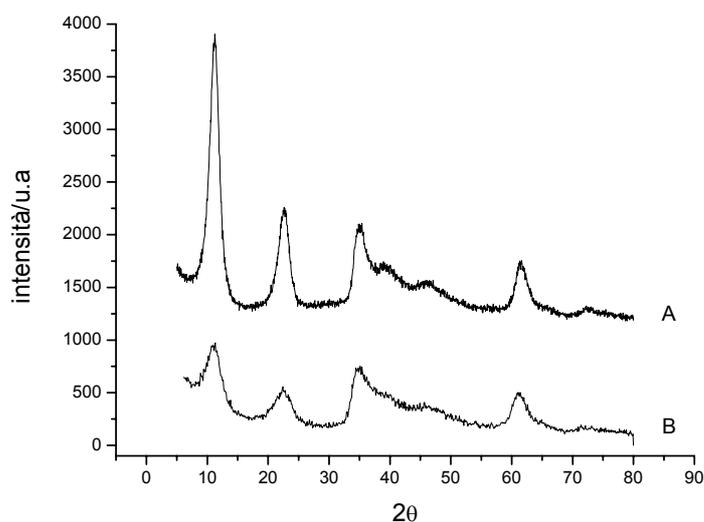


Figura 3.6 Diffrattogrammi XRD delle polveri di A) HT Ni/Al-NO₃ sintetizzata per via chimica; B) HT Ni/Al-NO₃ elettrochimicamente depositata su un elettrodo di Pt.

Sebbene i riflessi di diffrazione siano più larghi per il materiale elettrosintetizzato rispetto all'HT Ni/Al-NO₃ sintetizzata chimicamente, essi sono localizzati ai medesimi angoli 2θ.

In particolare i riflessi a 7.83, 3.90 e 2.61 Å sono tipici di composti idrotalcitici puri contenenti nichel [7] e corrispondono, rispettivamente, alla diffrazione dei piani basali (003), (006) e (009).

3.2.4 AFM

Per determinare il valore della rugosità e lo spessore dei film ottenuti si è utilizzato il microscopio a forza atomica (AFM).

La Figura 3.7 mostra le immagini di una zona $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ di un film elettrosintetizzato per 30 s, ottenute con AFM; il film appare omogeneo e la sua rugosità è bassa, circa 8 nm.

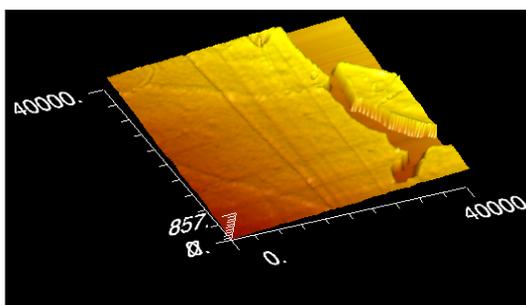
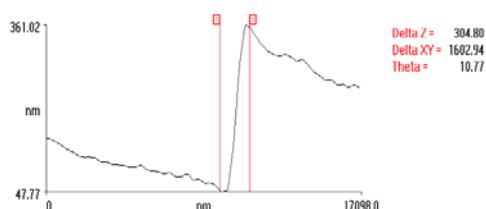


Figura 3.7 Immagine 3D AFM del film di HT film elettrosintetizzato su Pt per 30 s, dopo “etching” con una soluzione di HCl 0.1 M; acquisizione: modalità a contatto.

La rugosità aumenta con tempi di deposizione più prolungati. La rugosità più elevata è stata osservata per una deposizione di 120 s, risultando pari a 100 nm.

La tecnica AFM è stata anche utilizzata per determinare lo spessore dei film elettrodepositati, dopo la rimozione chimica (“etching”) di una parte di film di HT con una soluzione di HCl 0.1 M.

Il valore medio è risultato essere di circa 160 nm per il tempo di deposizione più breve e di circa 845 nm per quello più prolungato; come prevedibile, lo spessore aumenta con il tempo di deposizione.

In Tabella 3.3 sono riportati i valori relativi ai diversi tempi di deposizione.

Tempo di deposizione/s	Spessore/nm
10	160
30	300
60	460
90	630
120	845

Tabella 3.3

3.3 ELETTROSINTESI (SOLUZIONE B)

Dai risultati ottenuti utilizzando la soluzione A per la modifica dell'elettrodo, si può concludere che è possibile ottenere una HT Ni/Al per tempi di elettrodeposizione elevati, ma tale soluzione non permette di ottenere film sottili ed omogenei, di spessore controllato.

Per tale motivo si è deciso di effettuare l'elettrosintesi partendo da una soluzione di sali di Ni e Al più diluita di circa un ordine di grandezza, ma con la medesima concentrazione di elettrolita di supporto (KNO_3). Il pH spontaneo di tale soluzione (definita soluzione B) è 3.8, cioè circa un'unità di pH in più rispetto alla soluzione A. In questo caso sono stati presi in considerazione i tempi di deposizione: 10, 30, 60, 120 s.

Le morfologie dei film ottenuti in queste condizioni sono molto diverse da quelle descritte precedentemente. I depositi sono uniformi e non presentano alcuna zona circolare, inoltre sono molto più stabili dal punto di vista meccanico e non presentano zone scoperte o di frattura, anche a tempi di deposizione elevati.

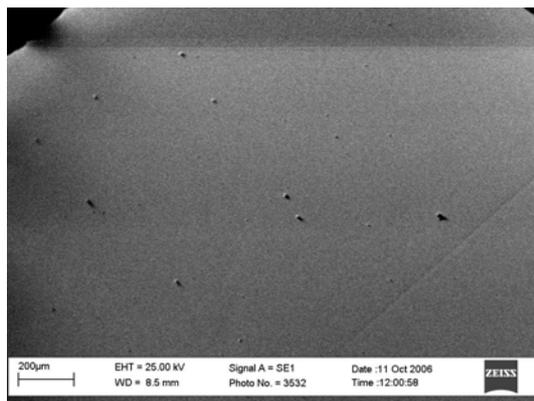


Figura 3.8 Immagine SEM del film ottenuto prolungando l'elettrosintesi per 30 s. Magnification: 400×.

Nella figura sopra riportata si può osservare una tipica immagine, ottenuta al microscopio elettronico, di un film elettrosintetizzato a partire dalla soluzione B.

Nel caso della figura 3.8 si tratta di un film ottenuto con un'elettrosintesi di 30 s, ma immagini simili si sono osservate per tutti i tempi di deposizione studiati.

La microanalisi EDS è stata utilizzata per caratterizzare la natura chimica dei film, prendendo in considerazione soprattutto il rapporto Ni/Al. Dai risultati, riportati nella tabella 3.4, si può osservare che per tutti i tempi di deposizione il rapporto Ni/Al è in accordo con quello atteso per strutture di tipo idrotalcitico (1.3 - 4.9).

Il diverso comportamento, osservato usando la soluzione di sali di nichel e alluminio meno concentrata, può essere spiegato ipotizzando un differente meccanismo di formazione dell'HT.

La concentrazione di nitrati derivante da KNO_3 è invariata rispetto alla soluzione A, pertanto non appena il potenziale catodico viene applicato, l'aumento della concentrazione di OH^- vicino alla superficie elettrodica sarà circa lo stesso per entrambe le soluzioni, ma nel caso della soluzione B il pH spontaneo della soluzione è 3.8 e, quindi, possiamo ipotizzare che il ripido aumento di pH locale, in tal caso, porterà direttamente alla precipitazione dell'idrossido doppio a strati, senza il coinvolgimento dell'idrossido del metallo trivalente.

	10 s	30 s	60 s	120 s
Al massa %	0.5	0.6	0.7	0.8
Ni massa %	1.6	2.2	2.9	3.2
Pt massa %	76.3	71.4	55.6	43.5
Rapporto Ni/Al	1.5/1	1.7/1	1.9/1	2.9/1

Tabella 3.4 Valori delle percentuali in massa di Ni, Al, Pt e dei rapporti molari Ni/Al, ottenuti mediante microanalisi EDS

3.3.1 XRD

Si è ottenuto il diffrattogramma a raggi X di un film depositato prolungando l'elettrosintesi per 120 s, cioè di una quantità di materiale sufficiente per acquisire un segnale interpretabile. I riflessi di diffrazione sono abbastanza larghi, in quanto il materiale depositato è caratterizzato da scarsa cristallinità, ma sono localizzati agli angoli 2θ caratteristici di una fase idrotalcitica. Il riflesso stretto centrato a $2\theta = 35.5^\circ$ è attribuibile all'elettrodo di Pt, in quanto la registrazione è stata effettuata direttamente sulla superficie dell'elettrodo, modificato con il film di HT.

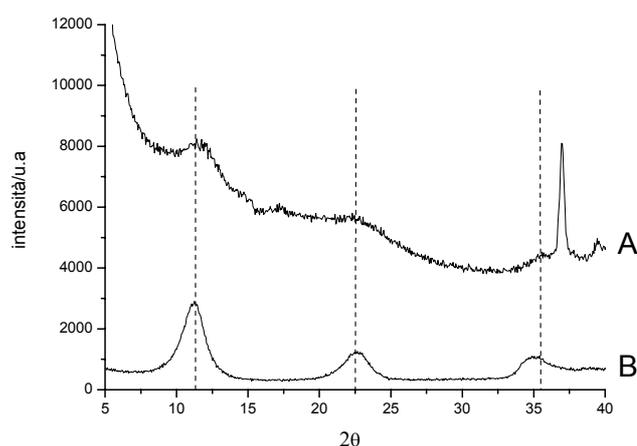


Figura 3.9 Diffrattogrammi a raggi X di: A) HT Ni/Al-NO₃ elettrosintetizzata sull'elettrodo di Pt; B) HT Ni/Al-NO₃ sintetizzata chimicamente.

3.3.2 AFM

Come per l'HT ottenuta dalla soluzione A, anche nel caso della soluzione B il microscopio a forza atomica è stato utilizzato per ottenere informazioni riguardo alla rugosità e allo spessore dei film.

L'area scansionata è pari a $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$; spostandosi in più zone della superficie elettrodica è stato possibile osservare un deposito omogeneo e caratterizzato da bassa rugosità, pari a circa 5 nm, quando il tempo di deposizione è breve, e circa 25 nm, quando si utilizza un tempo di elettrosintesi di 120 s. Lo spessore dei film aumenta con il tempo di elettrodeposizione; il valore medio varia da circa 100 nm, per un tempo di 10 s, a circa 750 nm per 120 s.

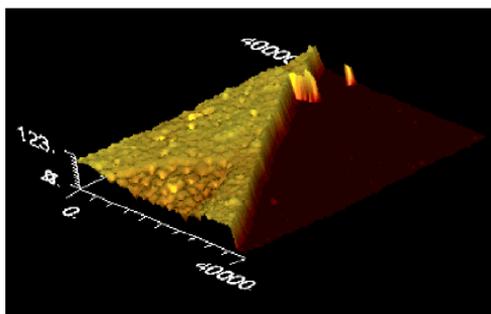


Figura 3.10 Immagine 3D ottenuta con AFM del film di HT, dopo etching con HCl 0.1 M, relativa ad una elettrosintesi di 10 s, eseguita con soluzione di nitrati di nichel e alluminio 0.03 M; acquisizione: modalità a contatto.

3.3.3 CV

Tutti i film sono stati caratterizzati tramite voltammetria ciclica in ambiente basico.

In figura 3.11 sono riportati i CV ottenuti in una soluzione di NaOH 0.1 M. Anche in tal caso si osservano due picchi redox, la cui posizione dipende dal tempo di deposizione del film: i potenziali di picco anodico variano dal valore di 0.52 V per film molto sottili (10 s) al valore di 0.55 V per quelli più spessi (120 s). La differenza principale dei film ottenuti partendo dalla soluzione B, rispetto a quelli depositati con la soluzione A, è che i voltammogrammi mostrano picchi redox di intensità apprezzabile fin dal primo ciclo e il segnale è stabile già dal terzo ciclo.

Dai voltammogrammi ciclici, riportati in figura 3.11, si può osservare che la corrente aumenta con il tempo di deposizione fino a 60 s, poi si nota una diminuzione quando il tempo di elettrosintesi è 120 s.

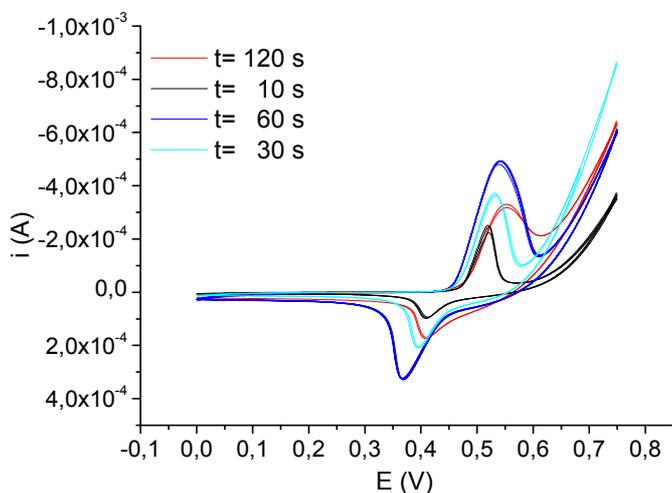


Figura 3.11 CV registrati in soluzione di NaOH 0.1 M per un elettrodo di Pt modificato con i film elettrosintetizzati potenziostaticamente per: 10, 30, 60, 120 s; velocità di scansione del potenziale = 0.02 V s^{-1} .

Questo comportamento può essere spiegato facilmente prendendo in considerazione il numero dei centri di nichel, che risulta essere dipendente dallo spessore del film, e le proprietà di trasporto di carica dell'HT. L'incremento di corrente registrato per tempi di deposizione da 10 a 60 s è dovuto all'aumento dei centri di nichel coinvolti nella reazione (2); quando il film diventa troppo spesso da manifestare una diminuita capacità di trasporto di carica, questo effetto sulla corrente diventa prevalente rispetto al contributo di corrente dovuto all'aumento di centri di nichel.

I CV relativi agli elettrodi modificati in tutte le condizioni sono abbastanza stabili: la corrente registrata resta praticamente invariata durante i primi 100 cicli.

Dopo 100 cicli di scansione del potenziale, nessuna variazione della morfologia è stata osservata nel film, sintetizzato per 60 s, analizzato mediante SEM.

3.3.4 SEM/EDS

Dall'analisi EDS è possibile osservare solo piccole variazioni della composizione chimica in seguito alla scansione di potenziale.

Nella tabella sottostante vengono riportati i risultati ottenuti.

Si può osservare una diminuzione nel contenuto di alluminio con conseguente aumento del rapporto Ni/Al. Tale risultato è in accordo con l'ipotesi di una parziale dissoluzione di alluminio quando il materiale viene ciclato in soluzione basica [6].

	Nessun ciclo	100 cicli di potenziale
Al massa %	0.7	0.6
Ni massa %	2.9	2.9
Pt massa %	55.6	55.6
Rapporto molare Ni/Al	1.9/1	2.2/1

Tabella 3.5 Percentuali in massa di Ni, Al, Pt e rapporti molari Ni/Al ottenuti dalla microanalisi EDS.

3.3.5 SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC

La spettroscopia di impedenza AC è stata utilizzata per quantificare i trasferimenti elettronici e le resistenze al trasferimento di carica dei film.

In figura 3.12 sono riportati i grafici di Nyquist, ottenuti in soluzione di NaOH 0.1 M al valore di potenziale di +0.58 V, per tutti i film elettrosintetizzati.

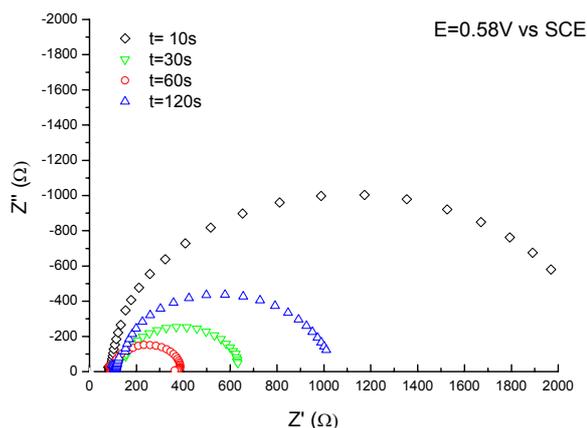


Figura 3.12 Grafici di Nyquist ottenuti in NaOH 0.1 M ($T = 22\text{ C}$) per i film ottenuti ai tempi di deposizione indicati nella legenda del grafico. (E applicato = +0.58 V).

Mediante i grafici di Nyquist è possibile descrivere il comportamento redox dei film di HT Ni/Al utilizzando un circuito elettrico equivalente (EC).

Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il dottorato ha proposto [8] il seguente circuito equivalente per simulare il comportamento dei film di HT Ni/Al, quando il deposito venga ottenuto con il metodo della coprecipitazione in bulk.

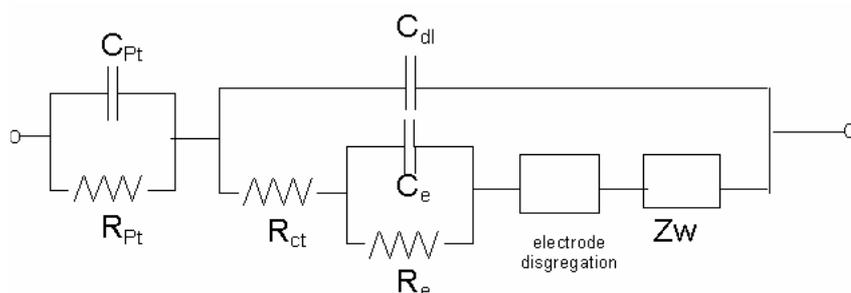


Figura 3.13 Schema del circuito equivalente che descrive gli spettri di impedenza.

Lo schema del circuito, riportato nella figura 3.13, contiene i seguenti elementi: C_{Pt} e R_{Pt} descrivono la passivazione del platino; R_{ct} e C_{dl} descrivono la resistenza al trasferimento di carica e la capacità associata all'interfaccia elettrodo/soluzione; R_e e C_e rappresentano la resistenza al trasferimento elettronico all'interno del materiale e la relativa capacità,

dovuta probabilmente all'accumulo di cariche all'interno del materiale [9] e alla rugosità dell'elettrodo modificato [10]. L'elemento relativo alla disgregazione dell'elettrodo è stato rappresentato con una capacità ed una resistenza entrambe negative, mentre Z_w descrive l'impedenza di Warburg, associata alla diffusione.

Tutti i dati sperimentali sono stati interpolati con il programma EC di Boukamp [11], utilizzando il circuito equivalente descritto sopra.

Il parametro più significativo è il valore di R_e , che risulta essere dipendente dal tempo di elettrodeposizione del film; mentre R_{ct} and R_{Pt} rimangono quasi costanti per tutti i film testati.

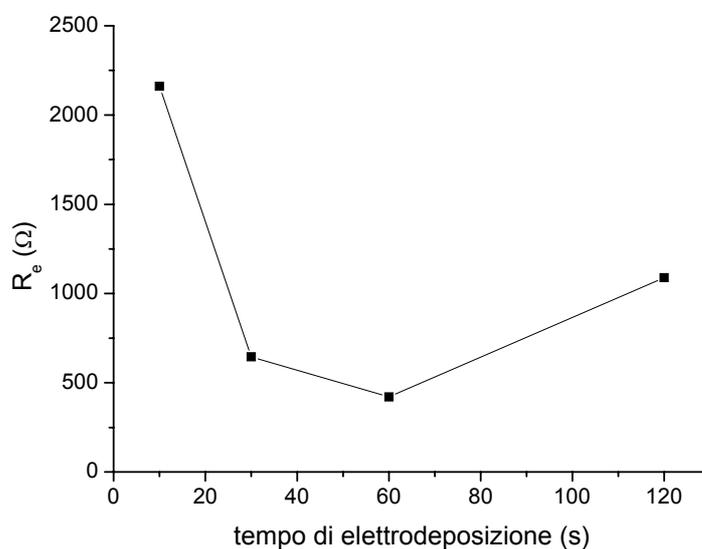


Figura 3.14 Grafico dei valori di R_e ottenuti dalle prove di spettroscopia di impedenza registrate a +0.58 V, in funzione del tempo di elettrodeposizione del film.

Il film più conduttivo di HT è quello ottenuto con un tempo di deposizione di 60 secondi, per cui si ottiene un buon compromesso tra il numero dei centri elettroattivi di Nichel e lo spessore del film.

Film più spessi generano una maggior resistenza al trasporto elettronico, mentre per tempi di elettrosintesi inferiori pochi centri di nichel sono coinvolti nel meccanismo di elettron hopping e pertanto i film sono caratterizzati da peggior conduttività.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A.V. Radha, P.V. Kamath, *Bull. Mater. Sci.* **26** (2003) 661.
- [2] J. W. Boclair, P.S. Breterman, *Chem. Mater.* **11** (1999) 298.
- [3] E. Scavetta, M. Berrettoni, M. Giorgetti e D. Tonelli, *Electrochim. Acta* **47** (2002) 2451.
- [4] J.Qiu, G.Villemure, *J. Electroanal. Chem.* **395** (1995) 159.
- [5] C. Natarajan, S.Ohkubo, G. Nogami, *Solid State Ionics* **86** (1996) 949.
- [6] R. Roto, L. Yu, G. Villemure, *J. Electroanal. Chem.* **587** (2006) 263.
- [7] S. Miyata, *Clays Clay Min.* **23** (1975) 369.
- [8] E. Scavetta, D. Tonelli M. Giorgetti, F. Nobili, R. Marassi, M. Berrettoni, *Electrochimica Acta* **48** (2003) 1347.
- [9] C.G. Granqvist, *Appl. Phys. A* **57** (1993) 3.
- [10] P.G. Bruce, M.Y. Saidi, *J. Electroanal. Chem.* **322** (1992) 93.
- [11] B.A. Boukamp, *Solid State Ionics* **20** (1986) 159.

CAPITOLO 4

4.1 CARATTERIZZAZIONE DEI BIOSENSORI

In base ai risultati ottenuti dallo studio di caratterizzazione dell'HT, descritto nel precedente capitolo, si è deciso di utilizzare come supporto di immobilizzazione enzimatica l'idrotalcite elettrodepositata a partire dalla soluzione più diluita, cioè con composizione $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 0.0225 M; $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.0075 M in KNO_3 0.3 M. Infatti, con tale soluzione si riescono ad ottenere film omogenei, il pH spontaneo è circa 4 e, pertanto, non denatura l'enzima glucosio ossidasi (GOx), la cui attività non subisce variazioni significative nell'intervallo di pH compreso tra 4 e 7.

I biosensori sono stati preparati elettrodepositando l'HT insieme all'enzima; in particolare, la riduzione potenziostatica della soluzione di nitrati contenente la GOx è stata eseguita a -0.9 V per 30 s.

Le superfici dei biosensori sono state caratterizzate mediante tecniche di superficie (SEM, AFM, SECM), per definirne la morfologia e cercare di comprendere se l'immobilizzazione della GOx sull'idrotalcite porta ad un biofilm uniformemente distribuito. Inoltre, in collaborazione con l'Università di Cagliari, le superfici sono state analizzate con spettroscopia di fotoelettroni a raggi X (XPS).

4.1.1 SEM/EDS

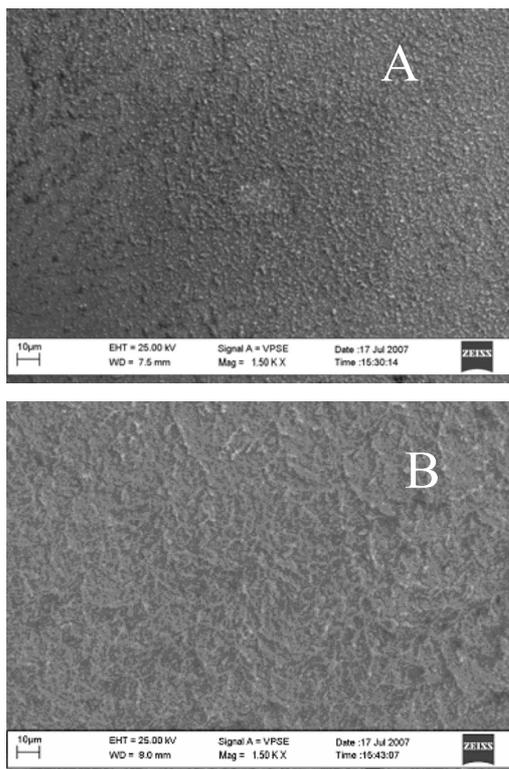


Figura 4.1. Immagini ottenute mediante SEM (25 kV, 1.5 nA) dell'elettrodo Pt-HT (A) e del biosensore Pt-HT-GOx (B).

Il confronto delle immagini, ottenute mediante SEM, di un elettrodo di Pt modificato con HT (Pt-HT) e di un biosensore realizzato per elettrodeposizione di HT insieme all'enzima GOx (Pt-HT-GOx) permette di osservare il deposito di enzima adsorbito sulla superficie elettrodica.

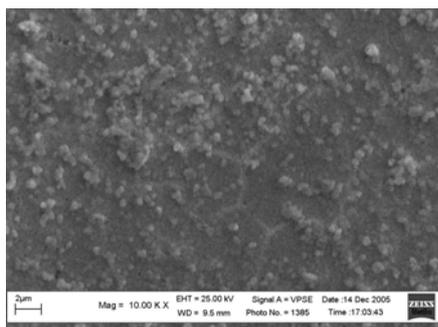


Figura 4.2 Immagini ottenute mediante SEM (25 kV, 1.5 nA) del biosensore PT-HT-GOx .

Gli elettrodi risultano ben ricoperti e il deposito appare caratterizzato da aggregati, come si può vedere in figura 4.2.

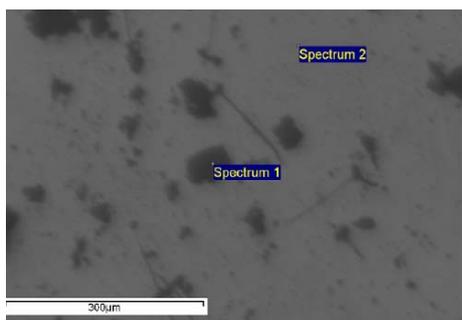


Figura 4.3.

	Elementi (% in massa)								totale
	C	N	O	Na	Al	K	Ni	Pt	
Spectrum 1	4.7	12.5	41.0	1.4	0.4	4.3	10.5	25.2	100.0
Spectrum 2	2.9	7.4	24.8	0.5	0.2	0.8	2.4	61.0	100.0

Tabella 4.1 Microanalisi EDS puntuale della zona interna (spectrum 1) ed esterna (spectrum 2) mostrate in figura 4.3

Mediante una microanalisi EDS puntuale della zona interna (spectrum 1 in fig. 4.3) ed esterna (spectrum 2) agli aggregati è stato possibile ipotizzare che tale morfologia sia dovuta ad una distribuzione non omogenea di enzima sulla superficie elettrodica. Infatti la zona interna degli aggregati è caratterizzata da una composizione percentuale in carbonio, azoto e ossigeno superiore a quella ottenuta per la zona esterna; ciò è probabilmente attribuibile alla presenza di GOx adsorbita in tali zone. Una conferma a tale ipotesi deriva anche dal fatto che la zona esterna agli aggregati corrisponde ad un deposito più sottile, come si evince dalla percentuale più alta in massa di Pt.

4.1.2 SECM

I biosensori sono stati caratterizzati anche con la microscopia a scansione elettrochimica. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto osservato tramite SEM/EDS.

Le immagini di una porzione della superficie elettrodica sono state registrate con lo scopo di studiarne le caratteristiche topografiche.

Tutte le immagini sono state acquisite in modalità “feedback amperometrico”, rappresentate come scansioni in due dimensioni (x, y), dove x e y sono distanze espresse in unità micrometriche, mentre le correnti registrate sono espresse in Ampere e indicate con colori differenti, secondo la scala cromatica riportata a lato della figura 4.4.

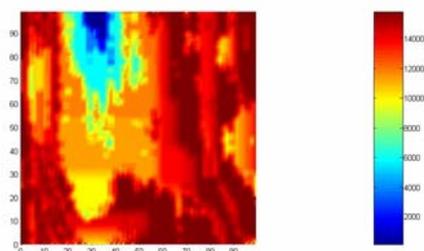


Figura 4.4 Immagine SECM di GOx + HT su Pt; $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in 0.1 M PBS (pH 7.0); $E = +0.5$ V vs Ag/AgCl, $v = 10$ $\mu\text{m/s}$.

In tale figura è riportata un'immagine, ottenuta con il SECM, del deposito di HT e GOx sull'elettrodo di Pt. Come mediatore redox è stata utilizzata una soluzione di $K_4[Fe(CN)_6]$ (1 mM) in PBS (pH 7.0); l'analisi è stata effettuata applicando un potenziale di +0.5 V vs Ag/AgCl, a $v = 10 \mu\text{m/s}$, al fine di ossidare il mediatore utilizzato.

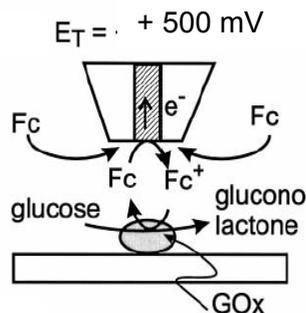


Figura 4.5 Esempio di rigenerazione del mediatore (Fc) per catalisi enzimatica dovuta alla GOx presente sull'elettrodo.

Per misurare l'attività enzimatica è stata adottata la procedura di Wang [1], campionando 10 punti in maniera casuale su tutta la superficie elettrodica. La cella è stata riempita con una soluzione contenente solamente il mediatore redox e si è registrata una curva d'approccio, la tip è stata poi ritratta di $100 \mu\text{m}$ lungo la direzione z. La soluzione è stata in seguito rimossa e la cella è stata riempita con una soluzione di mediatore "fresca" contenente una concentrazione di glucosio pari a 50 mM. A questo punto, si è registrata una seconda curva di approccio. La presenza o l'assenza di attività enzimatica locale in uno specifico punto del substrato è stata osservata dal confronto tra le due curve registrate consecutivamente per ogni punto considerato. Si sono registrate consecutivamente tre curve d'approccio, per ogni singolo punto di superficie depositata in presenza e in assenza di glucosio, ritraendo la tip di $100 \mu\text{m}$ lungo la direzione z prima di ogni esperimento, senza variare alcun'altra condizione sperimentale e senza pulire la tip. Le curve

d'approccio sono state considerate ripetibili quando i tre grafici sono risultati praticamente sovrapposti.

Nell'area scansionata in figura 4.4 è visibile una zona più "spessa" di deposito, cioè un aggregato, e le curve di approccio normalizzate, registrate in vari punti dell'area scansionata, dimostrano che l'attività enzimatica è localizzata solamente in alcuni punti. In figura 4.6 sono riportate le curve d'approccio relative ad un punto in cui si osserva presenza di attività enzimatica: la curva nera è stata registrata in presenza di glucosio, la grigia è il segnale del bianco: $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in PBS (pH 7.0)

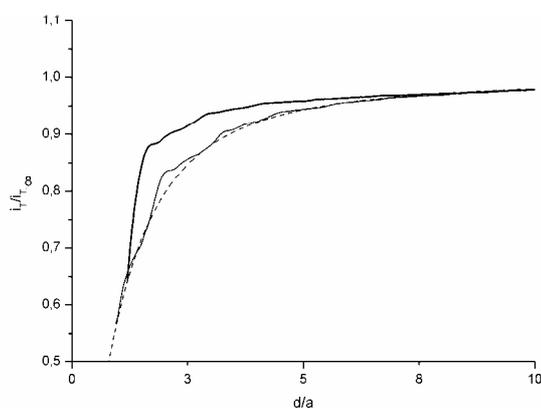


Figura 4.6 Curva d'approccio normalizzata = grafico di $i_T/i_{T,\infty}$ in funzione di $L = d/a$ (distanza fra tip e substrato in unità di raggio di tip), in cui si osserva la presenza di attività enzimatica per GOx + HT su Pt. Curva grigia: $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM in PBS (pH 7,0); curva nera: $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM con glucosio 50 mM in PBS (pH 7,0); $E = +0,5 V$, $v = 1 \mu m/s$.

Un responso positivo, come quello mostrato in figura, è stato osservato solo per circa il 20% dei punti campionati; questo risultato conferma che l'enzima è distribuito solo in alcune zone della superficie elettrodica, ed è per questo che risulta la scarsa probabilità per la tip di essere puntata esattamente su un punto dove l'enzima è presente e attivo. Quando si è utilizzata una quantità inferiore di GOx, elettrodepositata da una soluzione di nitrati contenente 0.9 mg mL^{-1} di enzima, si è osservato un responso positivo solo per il 10 % dei punti considerati. Anche questo risultato conferma la distribuzione a "spot" dell'enzima sulla superficie

dell'elettrodo Pt-HT. Le curve di approccio registrate su tutta la superficie elettrodica hanno confermato un ricoprimento soddisfacente del Pt.

Le immagini topografiche, ottenute con il SECM, sono in perfetto accordo con quanto osservato all'AFM, come riportato più avanti, sebbene con peggior risoluzione.

4.1.3 AFM

La figura 4.7 rappresenta l'immagine tridimensionale ottenuta in modalità contatto con una forza di 32 nN per un elettrodo di Pt modificato con HT e GOx. L'elettrodo risulta ben ricoperto e si osserva

un aumento della rugosità quadratica media ($Sq = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_1^N (z_i - z_{medio})^2}$) e

dello spessore rispetto a quanto osservato per gli elettrodi modificati solamente con film di HT.

Infatti si è calcolato un valore di Sq di circa 50 nm per i biosensori realizzati con il ricoprimento di HT e GOx, mentre la rugosità calcolata in termini di Sq per il Pt modificato solamente con HT è circa di 32 nm.

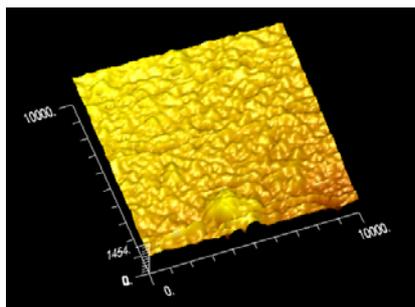


Figura 4.7 Immagine AFM (modalità contatto, forza 32 nN) di GOx + HT su Pt.

I nostri risultati confermano quanto riportato da Maciejewska et al. [2], che notarono una distribuzione disomogenea della attività di GOx all'interno di spots "enzima-polimero". La disomogeneità della GOx sui

film di HT non è un risultato imprevisto se si pensa che le interazioni tra l'HT e l'enzima sono essenzialmente di tipo elettrostatico e che l'adsorbimento sul deposito di HT avviene durante una reazione di precipitazione che decorre velocemente. Considerando le dimensioni delle molecole di enzima non è sorprendente che il loro intrappolamento avvenga secondo riarrangiamenti a "spot".

4.1.4 Spettroscopia di fotoelettroni a raggi X (XPS) [3]

In collaborazione con il Dipartimento di Chimica Inorganica ed Analitica dell'Università di Cagliari, si è effettuata la caratterizzazione XPS delle superfici elettrodeiche modificate con HT e con HT+GOx per valutare la distribuzione delle specie presenti e l'interazione tra l'enzima e la matrice ospitante.

Lo spettrometro utilizzato è il Theta Probe della Thermo-Fisher, ubicato nel Centro Grandi Strumenti (CGS) dell'Università degli Studi di Cagliari. Esso è dotato di una sorgente di raggi X di alluminio e di un cristallo monocromatore (energia 1486.6 eV). La pressione residua nella camera d'analisi è sempre risultata inferiore a 10^{-6} Pa. Quando la superficie del campione non era omogenea, allo scopo di accertare se le disomogeneità fossero solo morfologiche e non chimiche si è eseguita l'analisi con un fascio di raggi X di dimensioni pari a 100 μm (19 W). In condizioni standard gli spettri sono stati acquisiti con un fascio avente 300 μm di diametro e potenza 70 W. La pass-energy è stata impostata a 200 eV per acquisire gli spettri d'insieme o "survey" e a 50 eV per gli spettri ad alta risoluzione e l'analizzatore ha funzionato in modalità FAT (fixed analyser transmission). Le posizioni di tutti i segnali sono state riferite a quella del C1s alifatico posto a 285 eV per la correzione del caricamento. Esperimenti in risoluzione angolare sono stati condotti sui biofilm HT-GOx acquisendo gli spettri fotoelettronici fino ad un massimo di 16 angoli di emissione. L'elaborazione degli spettri XPS è

stata eseguita con il programma CasaXPS (V2.3.12, Casa Software Ltd., UK).

I risultati di tale studio sono ancora in fase di elaborazione, ma preliminarmente si possono fare alcune osservazioni.

Per quanto riguarda la distribuzione dell'enzima immobilizzato sull'HT è stata individuata la presenza di due zone diverse, a conferma della distribuzione a "spot" dell'enzima sulla superficie dell'elettrodo Pt-HT, già osservata con le tecniche SECM e AFM. L'analisi, condotta sulle due differenti zone del deposito, ha rivelato che le due aree hanno differente composizione. Una zona è qualitativamente simile all'idrotalcite, ma fortemente impoverita in nichel e dai valori delle energie di legame dei due segnali principali del Ni e Al si deduce che essi si trovano sotto forma di idrossidi (Al2p si trova a 74.0 eV e Al2s a 119.0 eV e il segnale di Ni2p a 855.6 eV; valori in accordo con i segnali degli idrossidi di riferimento).

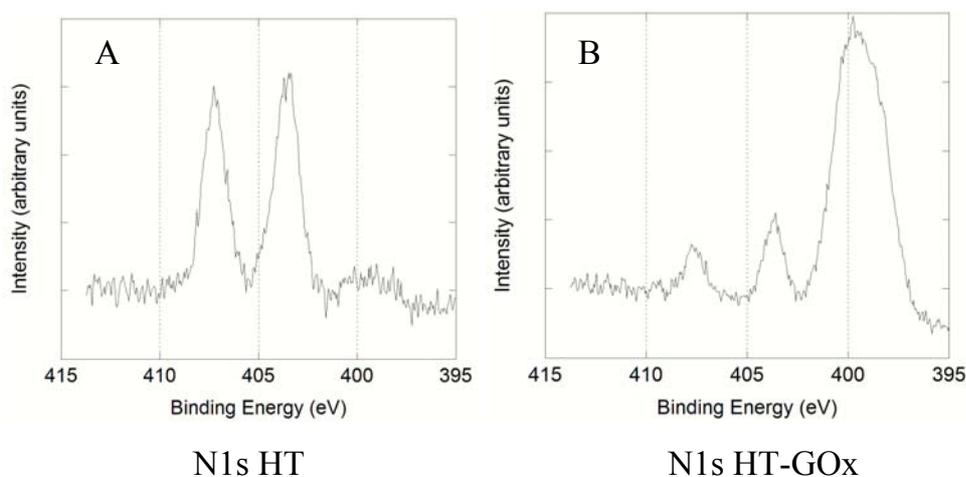


Figura 4.8 Spettri XPS relativi ai segnali del N1s dell'elettrodo Pt-HT (A) e del biosensore Pt-HT-GOx (B) nella zona 1.

Facendo riferimento alla figura 4.8 B, il segnale del N1s presenta le due componenti a più bassa energia di legame (398.6 e 400.2 eV), osservate anche per l'idrotalcite, ma più intense. La componente principale dell'azoto dell'enzima GOx, misurato come standard, si trova a 400.3 eV; tale risultato potrebbe indicare la presenza di enzima fisicamente adsorbito, in quanto, a parte l'aumento di intensità della componente a

400.2 eV, non si riscontra variazione di energia di legame in nessun altro segnale rispetto all'idrotalcite (vedi a titolo di esempio gli spettri riportati nelle figure 4.9).

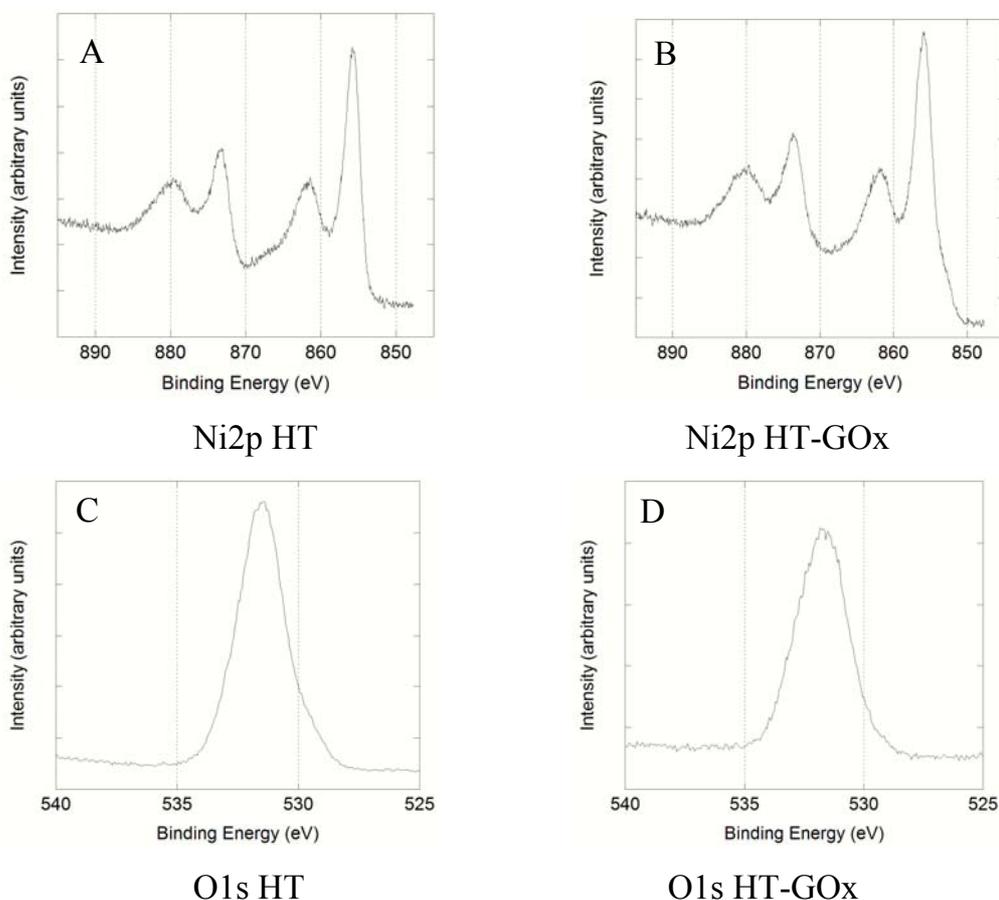


Figura 4.9 Spettri XPS relativi ai segnali del Ni2p dell'elettrodo Pt-HT (A) e del biosensore Pt-HT-GOx (B) e relativi a O1s dell'HT (C) e del biofilm HT-GOx (D)

L'altra zona (zona 2) è caratterizzata da una composizione più complessa, infatti, oltre agli elementi presenti sulla superficie modificata con HT, sono stati identificati anche Na e Cl, probabilmente provenienti da NaCl contenuto nell'enzima liofilizzato. In questa zona si è osservata una variazione di forma del segnale del nichel e le due componenti del Ni1s, a 398.5 e 400 eV, sono ancora più intense (fig. 4.10).

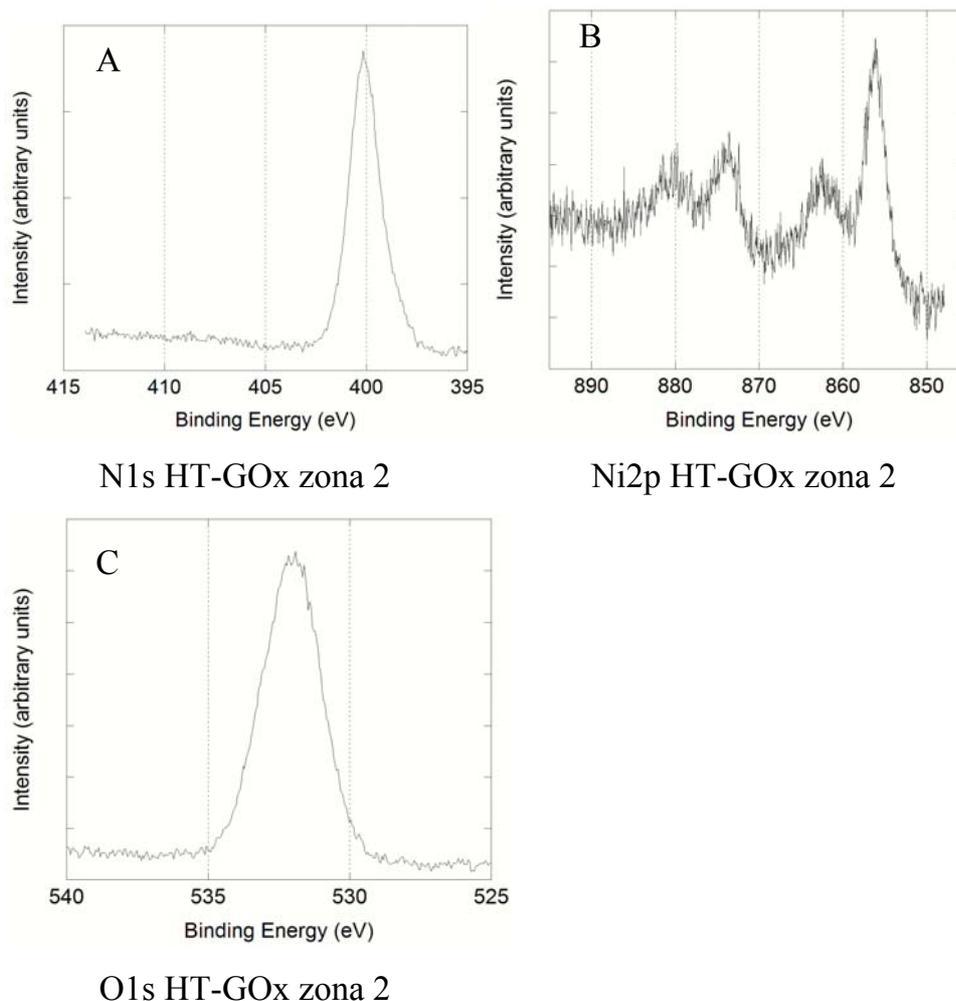


Figura 4.10 Spettri XPS relativi ai segnali del N1s (A) , del Ni2p (B) e del O1s (C) della zona 2 osservata nel biofilm Pt-HT-GOx.

Inoltre il rapporto Ni/Al è compatibile con quello di una fase idrotalcitica. Di conseguenza i risultati portano a concludere che in questa zona sia particolarmente localizzata la biomolecola e che, in questo caso, la matrice di supporto enzimatica sia una vera fase idrotalcitica. Probabilmente, nella fase di elettrodeposizione il nichel interagisce con i siti amminoacidici della GOx e la biomolecola si localizza particolarmente nei punti della superficie elettrodica in cui il nichel si rende disponibile per la precipitazione di una fase idrotalcitica. La distribuzione dell'enzima è stata studiata monitorando il segnale N1s a 400.3 eV; i primi risultati hanno mostrato che l'intensità di questo segnale cresce in maniera monotona dagli angoli meno radenti (24.88°) a quelli più radenti (81.12°), denotando una concentrazione di enzima

maggiore nella parte più esterna del biosensore. Il rapporto Ni/Al è inferiore a quello di una vera fase idrotalcitica per gli angoli 24.88° e 28.62° , cioè nella parte inferiore del film di HT, nelle vicinanze della superficie di Pt, mentre il rapporto è in accordo con quella previsto per una HT per angoli superiori a 28.62° . Anche i risultati ottenuti dagli esperimenti eseguiti in risoluzione angolare portano a concludere che l'enzima si comporta come "carrier" del Ni, rendendo possibile la precipitazione di una vera HT solamente nella parte più esterna del deposito, dove si raggiunge un rapporto Ni/Al ottimale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K. Wang, J.-J. Xu, D.-C. Sun, H. Wei and X.-H. Xia, *Biosens. Bioelectron.* **20** (2005) 1366–1372.
- [2] M. Maciejewska, D. Schäfer and W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.* **8** (2006) 1119–1124.
- [3] Resoconto dell'Unità di Ricerca dell'Università degli Studi di Cagliari, Responsabile scientifico Prof. Antonella Rossi, nell'ambito del PRIN 2005 "Biosensori sensibilizzati per la protezione dell'ambiente e della salute umana", coordinato dal Prof. Luigi Campanella.

CAPITOLO 5

STUDIO DEI PARAMETRI DI LAVORO E DI FABBRICAZIONE DEI BIOSENSORI

La modificazione degli elettrodi di Pt per contemporanea elettrodeposizione di HT e GOx è stata studiata al fine di sviluppare biosensori per la determinazione di glucosio.

Dopo aver adsorbito l'enzima GOx sull'HT Ni/Al-NO₃ durante la fase di elettrosintesi, è stato utilizzato un sistema di stabilizzazione comune nei biosensori enzimatici, che sfrutta la reticolazione tra albumina di siero bovino e glutaraldeide (BSA - GA), al fine di evitare il lento rilascio dell'enzima nella soluzione da analizzare (seguendo la procedura riportata nel capitolo 2 (paragrafo 2.4.2)).

Per comodità si è deciso di indicare i biosensori ottenuti secondo tale modalità con l'abbreviazione: Pt-(HT-GOx)-GA-BSA.

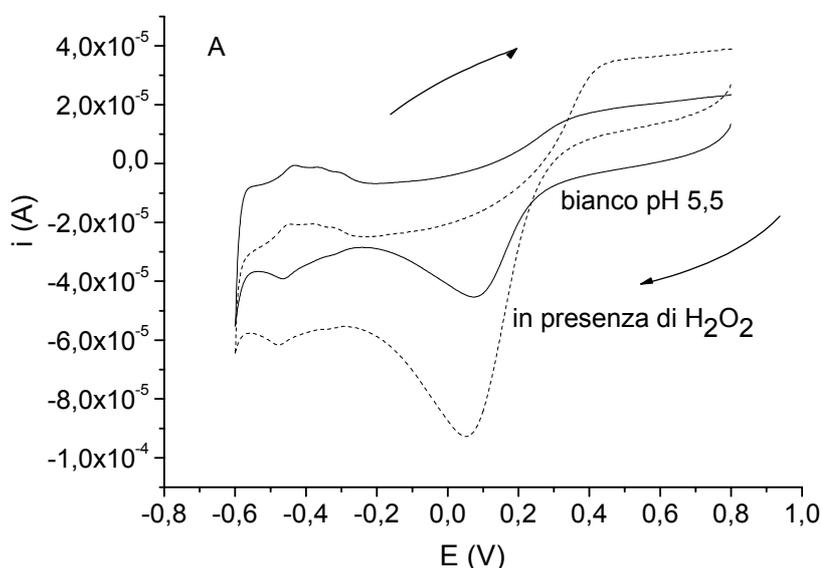
In questo capitolo si dimostra l'importanza dell'HT come matrice di immobilizzazione enzimatica, al fine di ottenere depositi di GOx caratterizzati da un'attività enzimatica elevata e stabile. Inoltre vengono riportati i risultati relativi all'ottimizzazione dei parametri operativi e di fabbricazione del biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, ottenuta mediante lo studio della dipendenza della sensibilità al glucosio dai suddetti parametri.

5.1. STUDIO PRELIMINARE

5.1.1 RIVELAZIONE AMPEROMETRICA DEL PEROSSIDO DI IDROGENO

Preliminarmente, si è studiato il responso degli elettrodi di Pt e di Pt-HT nei confronti del perossido d'idrogeno, in soluzioni tampone fosfato 0.1 M a pH 5.5 e 7.0, con l'intento di trovare le condizioni operative ottimali dell'elettrodo modificato per la determinazione di perossido di idrogeno. Sono state registrate voltammetrie cicliche per valutare il potenziale a cui si verifica l'ossidazione dell'acqua ossigenata, registrando il segnale di corrente nell'intervallo di potenziale - 0.6 ÷ + 0.8 V vs. SCE, in presenza di H₂O₂ alla concentrazione di 1.4 mM.

L'analita può essere ossidato elettrochimicamente a potenziali più anodici di + 0.3 V o ridotto a potenziali più catodici di + 0.2 V, come si può notare dal CV riportato (figura A PBS pH 5.5).



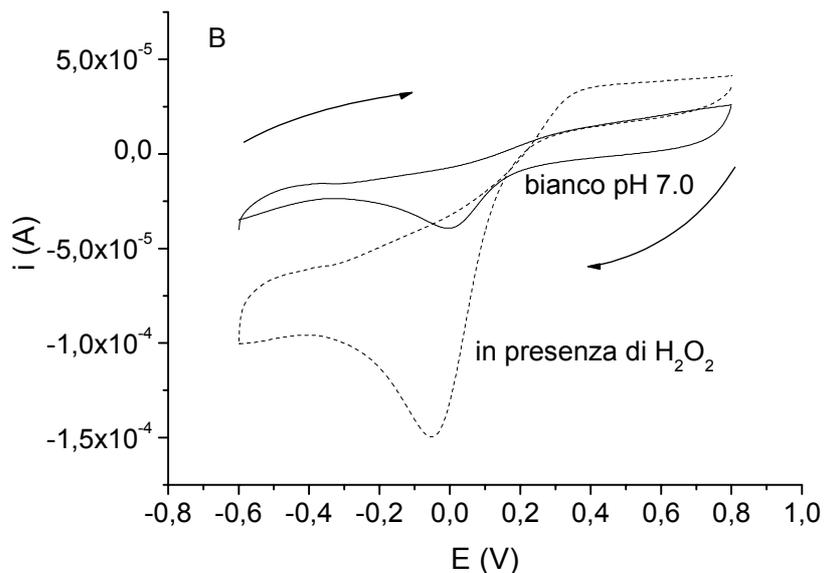


Figura 5.1. Voltammogrammi ciclici registrati, con velocità di scansione 0.02 Vs^{-1} , ad un elettrodo di Pt modificato con HT sia in assenza (linea continua) che in presenza di perossido di idrogeno 1.4 mM (linea tratteggiata), in soluzione tampone fosfato pH 5.5 (A) e in soluzione tampone fosfato pH 7.0 (B).

Le condizioni operative ottimali sono state valutate eseguendo cronoamperometrie ad elettrodi di Pt modificati con HT (Pt-HT) in soluzioni di PBS a pH 5.5 e 7.0, a cui si applicava un potenziale variabile per aggiunte successive di perossido di idrogeno. In tabella 5.1 si riportano i valori dei parametri caratteristici delle curve di calibrazione ottenute graficando i valori della corrente di stato stazionario contro la concentrazione di perossido di idrogeno.

Potenziale (V vs. SCE)	pH	Rivelazione elettrochimica	Sensibilità* \pm S.D. ($\text{mAM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	Intervallo di linearità (mM)	R^2
+ 0.20	5.5	Riduzione	11.7 ± 0.2	0.2 - 2.0	0.993
0.00	5.5	Riduzione	17.1 ± 0.2	0.1 - 2.0	0.992
+ 0.20	7.0	Riduzione	11.3 ± 0.2	0.1 - 2.0	0.985
0.00	7.0	Riduzione	12.4 ± 0.2	0.2 - 2.0	0.988
+ 0.50	5.5	Ossidazione	181 ± 3	0.01 - 8.5	0.995
+ 0.45	5.5	Ossidazione	144 ± 2	0.01 - 8.5	0.992
+ 0.50	7.0	Ossidazione	686 ± 7	0.01 - 10.0	0.998
+ 0.45	7.0	Ossidazione	329 ± 5	0.01 - 10.0	0.994

* Calcolata dalla pendenza della parte lineare della curva di calibrazione

Tabella 5.1 Parametri caratteristici dei grafici di calibrazione del perossido di idrogeno ottenuti con un elettrodo modificato Pt-HT.

Come si può osservare, per l'elettrodo modificato la maggior sensibilità nei confronti dell' H_2O_2 si ottiene per l'ossidazione elettrochimica a +0.50 V e a pH 7.0.

Se si lavora in riduzione, si riscontra un notevole rumore di fondo della corrente relativa allo stato stazionario, che ha, come risultato, una riduzione dell'intervallo di linearità. Ciò può essere facilmente spiegato considerando i voltammogrammi ciclici di figura 5.1. L'ossidazione dell' H_2O_2 ha luogo a valori di potenziale ai quali è già avvenuta la formazione di ossidi di platino, mentre il perossido di idrogeno viene ridotto a potenziali corrispondenti alla superficie pulita Pt^0 . La presenza di ossidi o idrossidi di platino sulla superficie elettrodica promuove, probabilmente, l'ossidazione elettrocatalitica del substrato, mentre l'efficienza della riduzione è limitata dalla passivazione dell'elettrodo per effetto dell'adsorbimento di reagente/prodotto e/o intermedi. Inoltre l'ossidazione di H_2O_2 risulta favorita al potenziale più anodico, tra quelli considerati, e a pH 7.0, probabilmente a causa della stechiometria di

reazione; ciò è in accordo con quanto osservato da Hall e altri [1] riguardo all'ossidazione elettrochimica di H_2O_2 ad elettrodi di Pt non modificati, in soluzioni di tampone fosfato. Secondo tali autori, l'ossidazione è sotto controllo misto, cinetico e diffusivo, e il meccanismo di reazione può essere spiegato in termini di una cinetica tipo Michaelis-Menten.

Nei biosensori di prima generazione (senza mediatore) per la determinazione di glucosio, basati sull'ossidazione elettrochimica di perossido di idrogeno, l'adesione di bolle di ossigeno alla superficie elettrodica è senz'altro una delle maggiori sorgenti di rumore nel segnale di corrente e può essere ridotta aumentando l'idrofilicità della superficie [2]. Un metodo per aumentare l'idrofilicità di una superficie consiste nell'aumentarne la rugosità, per esempio mediante deposizione di materiali inorganici porosi, quali le HT.

In figura 5.2 si osserva la topografia di un elettrodo di Pt modificato con un film sottile di HT Ni/Al- NO_3 , mediante analisi al microscopio a forza atomica. È stato anche calcolato il valore della rugosità quadratica media (S_q) per tale elettrodo modificato, che è risultato pari a 31.70 nm contro un valore di 1.2 nm calcolato per una superficie di Pt pulita.

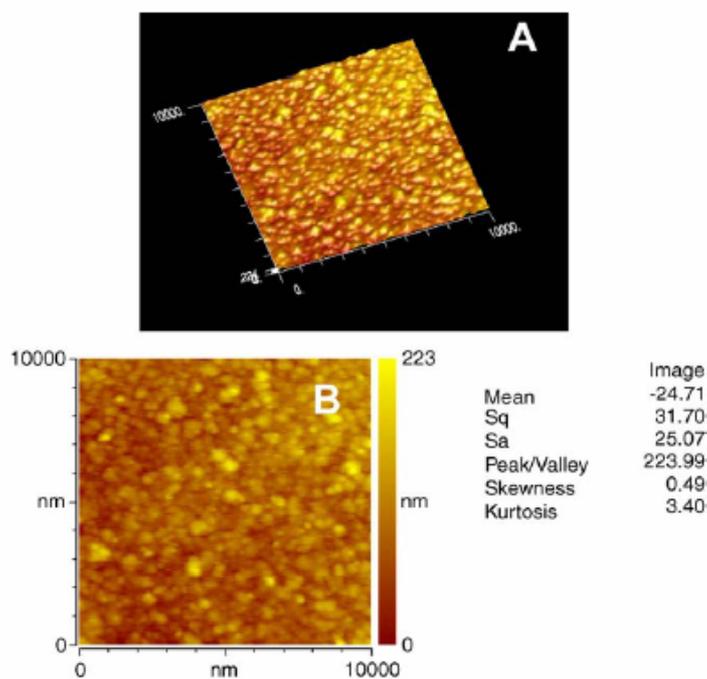


Figura 5.2 A) immagine 3D ottenuta con AFM della topografia di una superficie di HT Ni/Al-NO₃ su Pt. Dimensioni dell'area scansionata: 10 μm x 10 μm; B) immagine 2D ottenuta con AFM del medesimo elettrodo con i parametri relativi alla superficie analizzata.

Dalla figura 5.3, in cui sono mostrati i responsi cronoamperometrici ottenuti per aggiunte successive di H₂O₂ ad un elettrodo di Pt e ad un elettrodo di Pt modificato con elettrodeposizione di HT (Pt-HT), si può chiaramente notare che la presenza dell'HT consente di ottenere un miglior rapporto segnale/rumore per il segnale amperometrico dovuto all'ossidazione di H₂O₂, grazie ad un'evidente riduzione del rumore di fondo.

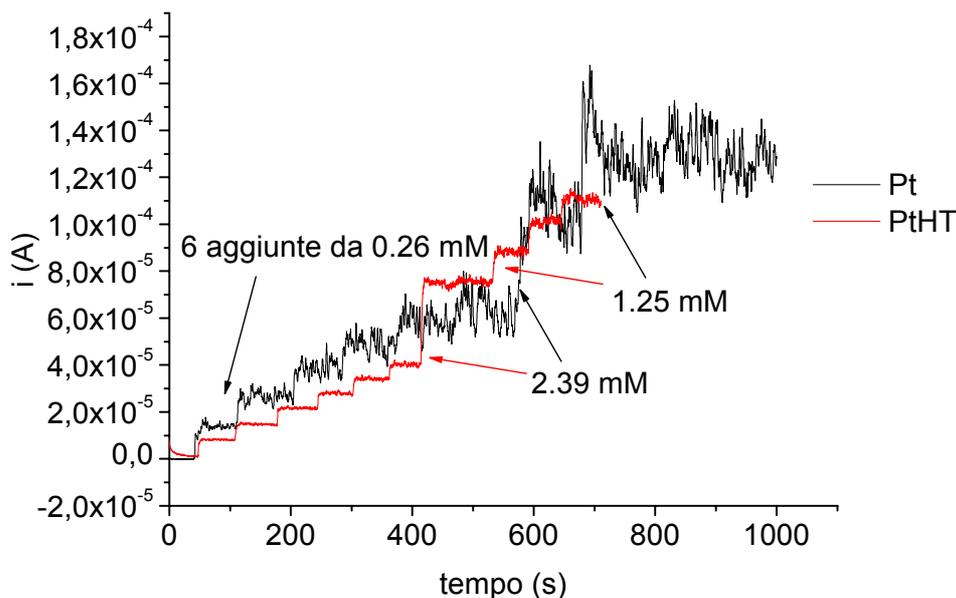


Figura 5.3 Responsi di corrente relativi a concentrazioni crescenti di H_2O_2 agli elettrodi di Pt e di Pt-HT (0.45V, 25°C, PBS pH 7.0). Le prime sei aggiunte corrispondono a concentrazioni di 0.26 mM, le altre ai valori indicati nel grafico ($\omega = 200$ rpm).

Le medesime prove preliminari sono state effettuate anche con altre superfici elettrodiche, quali Au e GC, ma i risultati migliori sono stati ottenuti con il Pt.

Più precisamente, con Au i risultati sono simili; in tal caso, però, i responsi amperometrici sono spesso caratterizzati da un basso rapporto segnale su rumore e portano ad intervalli di linearità piuttosto limitati.

Per quanto riguarda il GC, l'aggiunta di H_2O_2 non modifica il responso voltammetrico dell'elettrodo, almeno per valori di potenziale inferiori a +0.6V.

5.1.2 RESPONSO AL GLUCOSIO DI ELETTRODI DI Pt MODIFICATI SOLO CON L'ENZIMA

Preliminarmente, si è studiato il comportamento dell'elettrodo modificato solo con il biofilm, ottenuto per reticolazione dell'enzima GOx (10 μL di una soluzione enzimatica a concentrazione di 3 mg/mL) con la glutaraldeide, secondo una procedura utilizzata comunemente [3] (Pt-GOx-BSA-GA).

Le misure cronoamperometriche sono state effettuate a + 0.45 V in condizioni idrodinamiche ($\omega = 200$ rpm) in PBS (pH 7.0).

La sensibilità in tali condizioni (definita come la pendenza della parte lineare della curva di calibrazione) è risultata pari a 70.0 mA $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e l'intervallo di linearità è molto ristretto (0.2-1.5 mM), a causa dell'elevato rumore associato alla registrazione della corrente.

Inoltre il biofilm ha presentato una scarsa adesione alla superficie di Pt, tendendo a staccarsi dopo pochi giorni di utilizzo (2-3 giorni); tali biosensori hanno mostrato anche scarsa riproducibilità.

Successivamente sono state effettuate prove cronoamperometriche nelle medesime condizioni operative, utilizzando biosensori in cui il Pt è ricoperto con l'HT, cioè Pt-(HT-GOx)-GA-BSA.

In figura 5.4 si riporta un esempio di cronoamperogramma registrato per aggiunte successive di glucosio ad una soluzione tampone in cui è immerso un elettrodo Pt-(HT-GOx)-GA-BSA e nell'inserito la corrispondente curva di calibrazione, che è lineare fino alla concentrazione 8.0 mM.

La corrispondente retta di calibrazione risulta: $I \text{ (mA)} = 0.402 c + 0.0441$, $R^2 = 0.999$ ($n-2 = 8$), con una sensibilità di 7.7 ± 0.1 mA $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$, dove c è la concentrazione di glucosio in molarità. Il limite di rivelazione (LOD), calcolato come $y_{\text{LOD}} = y_{\text{b}} + 3\sigma_{\text{b}}$ (usando il valore dell'intercetta calcolata come stima del segnale del bianco (y_{b}) e $s_{y/x}$, deviazione standard della regressione, come σ_{b} , deviazione standard del bianco) è 0.35 mM.

Il tempo necessario per raggiungere la corrente di stato stazionario è di circa 5-10 secondi.

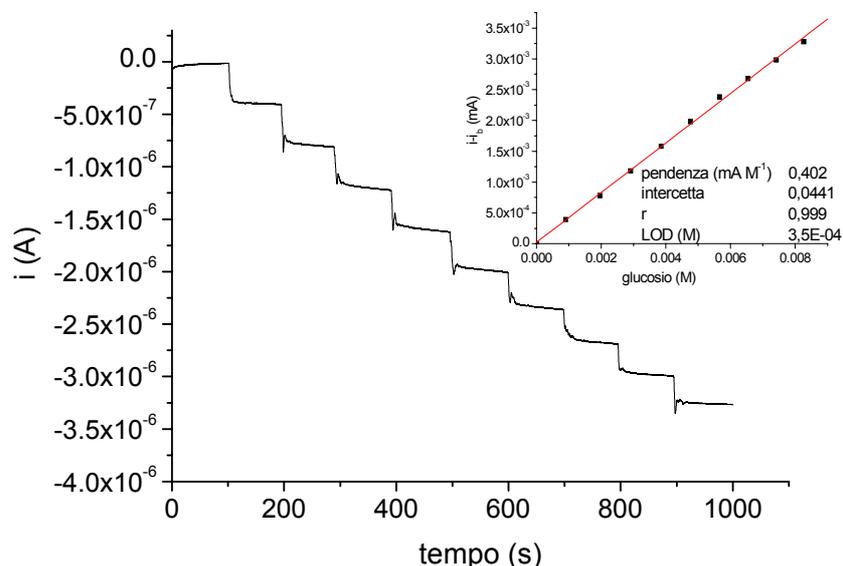


Figura 5.4 Responso cronoamperometrico registrato con un biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, relativo ad aggiunte successive di glucosio. Inserto: curva di calibrazione corrispondente.

Come già osservato per il perossido di idrogeno, i responsi amperometrici sono più stabili e riproducibili quando l'enzima è adsorbito sulla HT Ni/Al-NO₃. La sensibilità del biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA non è confrontabile con quella dell'elettrodo Pt-GOx-BSA-GA, in quanto la quantità di enzima adsorbita durante l'elettrodeposizione è molto inferiore rispetto a quella depositata facendo evaporare i 10 µL della sospensione enzimatica.

Si può osservare che, però, mentre per i biosensori realizzati con l'HT come supporto per l'enzima il valore della sensibilità rimane pressoché invariato per circa un mese, per gli elettrodi su cui il biofilm è depositato direttamente su Pt tale valore si dimezza già durante il secondo giorno di utilizzo.

Pertanto i risultati preliminari, ottenuti utilizzando l'HT come supporto per l'immobilizzazione enzimatica, hanno sottolineato l'importanza dell'uso di tale materiale al fine di ottenere biosensori più stabili ed efficienti sia in termini di responso amperometrico che di adesione del film alla superficie di Pt.

L'idrotalcite presenta una buona adesione alla superficie di platino ed è in grado di adsorbire l'enzima per l'instaurarsi di interazioni di tipo elettrostatico tra la carica netta negativa dell'enzima e gli strati tipo brucitici carichi positivamente. Infatti, durante l'elettrosintesi il valore del pH locale in prossimità dell'elettrodo risulta superiore al punto isoelettrico della GOx, che dalla letteratura risulta essere pari a 4.2 [4].

5.2 OTTIMIZZAZIONE DELLE PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE Pt-(HT-GOx)-GA-BSA

Con l'intento di ottimizzare le prestazioni dei biosensori Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, si è studiata la dipendenza della sensibilità per la determinazione del glucosio da alcuni parametri relativi alle condizioni di fabbricazione del sensore e a quelle in cui esso opera.

Per quanto riguarda la realizzazione del biosensore, i parametri presi in considerazione sono stati la concentrazione di enzima durante la fase di elettrodeposizione e la durata di tale fase.

Come parametri operativi sono stati studiati il potenziale applicato all'elettrodo, la temperatura e il pH della soluzione analizzata durante la determinazione di glucosio.

5.2.1 QUANTITÀ DI ENZIMA IN SOLUZIONE

La quantità di enzima è stato il primo parametro considerato. Si è studiato un intervallo di concentrazione di enzima compreso tra 0.5 mg mL⁻¹ e 4.5 mg mL⁻¹.

Dai risultati, mostrati in figura 5.5, si può notare un miglioramento della sensibilità del biosensore all'aumentare della concentrazione da 0.5 a 3.0 mg mL⁻¹, come prevedibile.

Per concentrazioni superiori non si osserva alcun miglioramento, probabilmente perché il film di HT non riesce ad adsorbire una quantità maggiore di biomolecole, pertanto si è deciso di lavorare con una concentrazione di GOx nella soluzione di elettrosintesi uguale a 3.0 mg mL⁻¹.

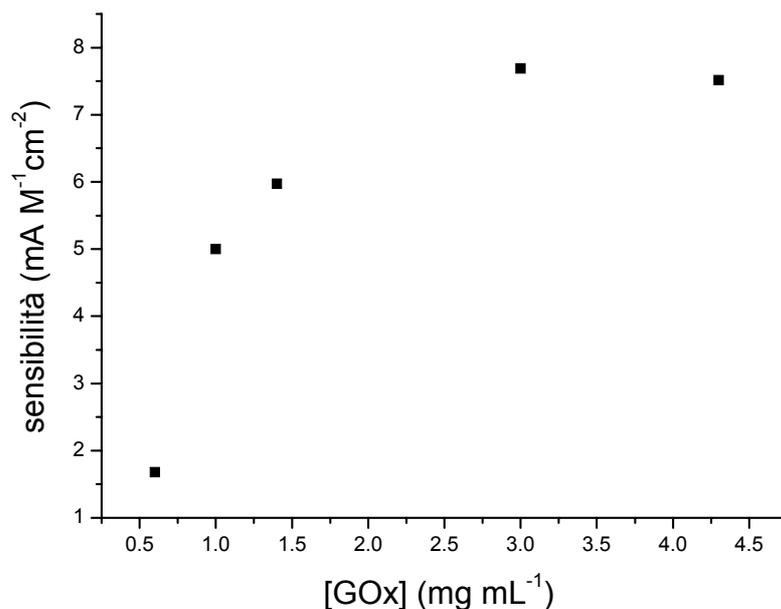


Figura 5.5 Effetto della concentrazione di enzima sulle prestazioni del biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA in termini di sensibilità, valutata mediante cronoamperometrie ad un potenziale di +0.45 V, 25°C, PBS (pH 7.0).

5.2.2. DURATA DI ELETTROSINTESI DELLA HT

L'efficienza elettrocatalitica (E.E.) è definita come rapporto tra l'intensità di corrente, calcolata dopo un'aggiunta di glucosio alla soluzione tampone fosfato (pH 7.0), e la corrente del "bianco", registrata in assenza di glucosio.

Al fine di ottenere il miglior valore di E.E. sono stati considerati elettrodi modificati con film di differente spessore, ottenuti variando il tempo di elettrosintesi. Grazie a precedenti risultati (paragrafo 5.2.1) si è deciso di eseguire l'elettrodeposizione utilizzando una concentrazione di GOx pari a 3.0 mg mL⁻¹.

Il valore più elevato di E.E. si è osservato per un tempo di elettrodeposizione pari a 30 secondi, condizione per cui si ottiene un biofilm ben adeso alla superficie elettrodica.

A tempi di elettrosintesi più prolungati si sono ottenuti film troppo spessi e, inoltre, a tempi superiori a 40 secondi si sono osservate fratture e successivamente distacco del biofilm dalla superficie di Pt.

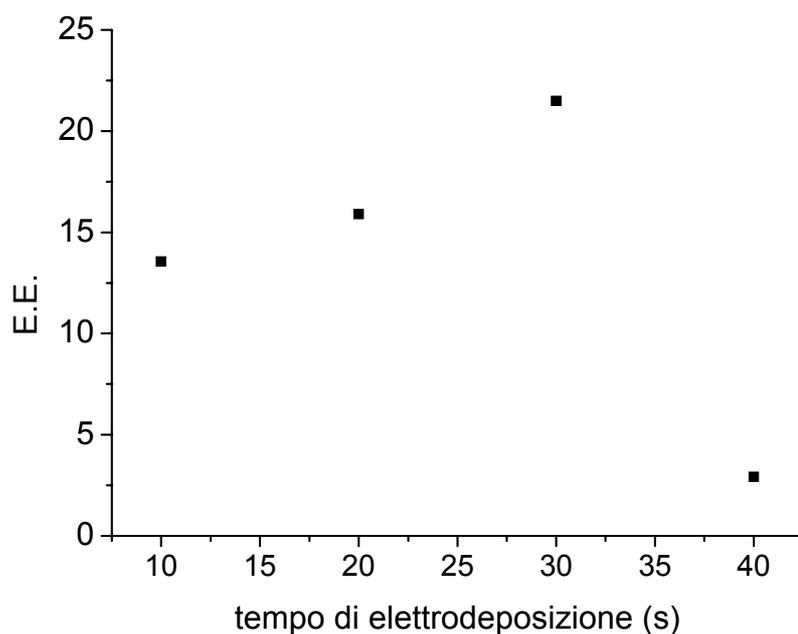


Figura 5.6 Effetto del tempo di elettrosintesi sulle prestazioni del biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, utilizzando una concentrazione di enzima (nella cella elettrochimica) pari a 3.0 mg mL^{-1} , in termini di efficienza elettrocatalitica (E.E.), valutata mediante CA ad un potenziale di $+0.45 \text{ V}$, 25°C , in PBS (pH 7.0).

5.2.3 EFFETTO DEL pH, DELLA TEMPERATURA E DEL POTENZIALE

Tutti gli enzimi sono caratterizzati da un valore ottimale di pH, in corrispondenza del quale presentano il valore massimo di attività. L'effetto del pH sull'attività enzimatica è dovuto alla variazione della struttura della proteina e quindi anche del suo sito attivo, in seguito all'instaurarsi di equilibri acido-base tra gruppi acidi e basici degli amminoacidi dell'enzima.

In letteratura [5] sono riportati per l'enzima "libero" glucosio ossidasi, un valore di pH ottimale pari a 5.5 e un intervallo di pH investigabile compreso tra 4 e 7.

In figura 5.7 è riportato il confronto dei responsi cronoamperometrici ottenuti con il biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA a tre differenti valori di pH: 5.5, 6.5, 7.0. Il responso migliore è stato registrato a pH 7.0, in perfetto accordo con quanto osservato nelle prove preliminari di risposta verso il perossido di idrogeno ad un elettrodo di Pt-HT (vedi tabella 5.1). Questo risultato indica che lo stadio limitante nel responso del biosensore è la elettrossidazione del perossido di idrogeno prodotto enzimaticamente.

I risultati ottenuti ai tre diversi valori di pH dimostrano che non si è verificato alcun cambiamento significativo nella struttura della GOx, in seguito all'immobilizzazione su HT e stabilizzazione con BSA-GA.

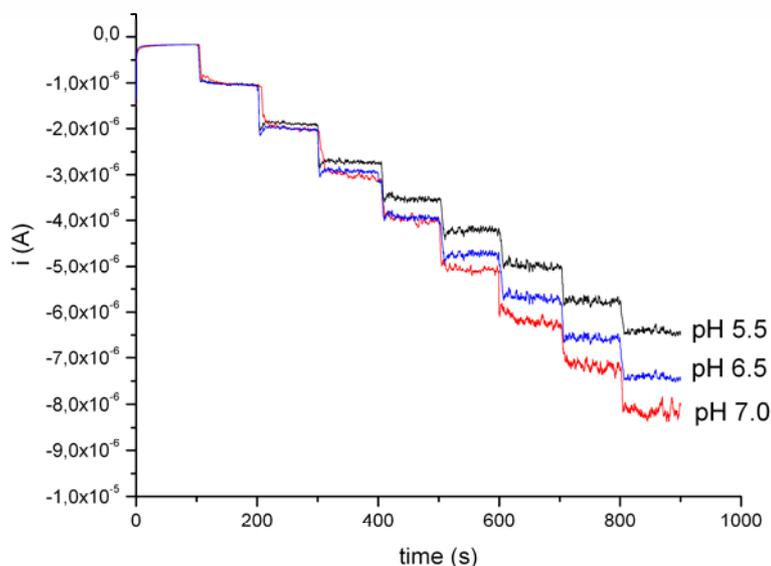


Figura 5.7 Responsi amperometrici registrati ad un elettrodo Pt-(HT-GOX)-BSA-GA (+0.50 V, T = 20 °C) in PBS (ai valori di pH indicati), per aggiunte successive di glucosio (0.15 mM).

Gli effetti della temperatura sull'attività enzimatica sono molto complessi e dipendono anche da altre variabili del mezzo, quali il pH, la composizione della soluzione tampone, la concentrazione del substrato; a scopo esemplificativo l'andamento in funzione della temperatura può essere considerato come risultato di due effetti contrastanti: aumento della velocità della reazione catalizzata dall'enzima con il crescere della temperatura e denaturazione termica dell'enzima.

Fino a 55°C l'effetto predominante è l'aumento dell'attività enzimatica, mentre se la temperatura è più elevata si verifica parziale denaturazione e l'attività enzimatica diminuisce drasticamente. La variazione della velocità di reazione con la temperatura può essere espressa dalla relazione di Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_{att}}{RT}$$

dove k = coeff. di velocità, R = cost. dei gas, E_{att} = energia di attivazione, T = temperatura, A = fattore di frequenza (o pre-esponenziale).

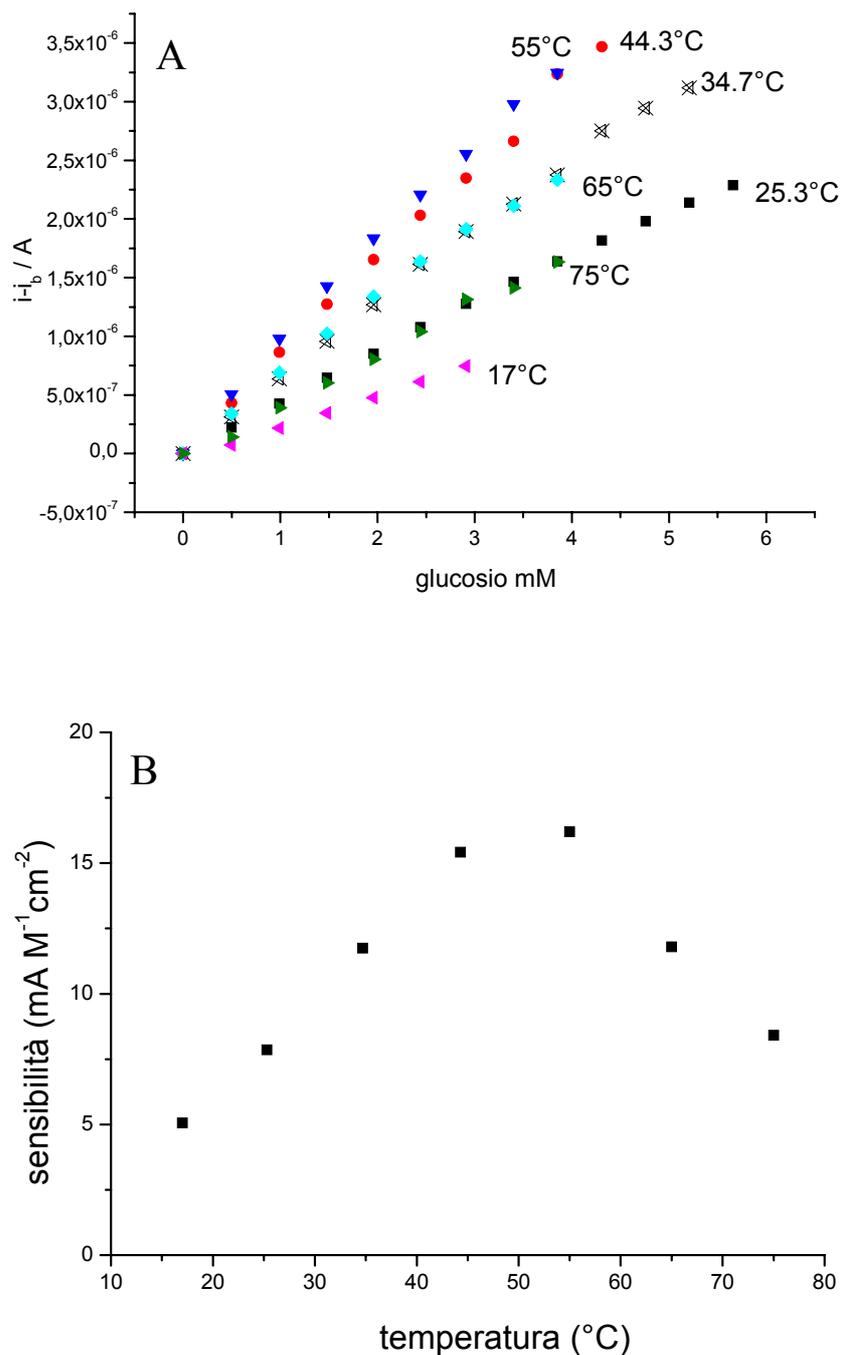


Figura 5.8 A) Rette di calibrazione ottenute per il biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA alle temperature indicate nel grafico B) Effetto della temperatura sulla sensibilità del biosensore

Da un punto di vista pratico diventa estremamente importante mantenere costante la temperatura quando i biosensori vengono utilizzati per la determinazione di glucosio.

La temperatura di 25°C sicuramente presenta notevoli vantaggi in quanto solitamente non si discosta molto dalla temperatura ambiente del laboratorio e, in previsione di future applicazioni dell'elettrodo in apparecchi per la determinazione della glicemia da parte di diabetici, non richiede l'utilizzo di sistemi di termostatazione.

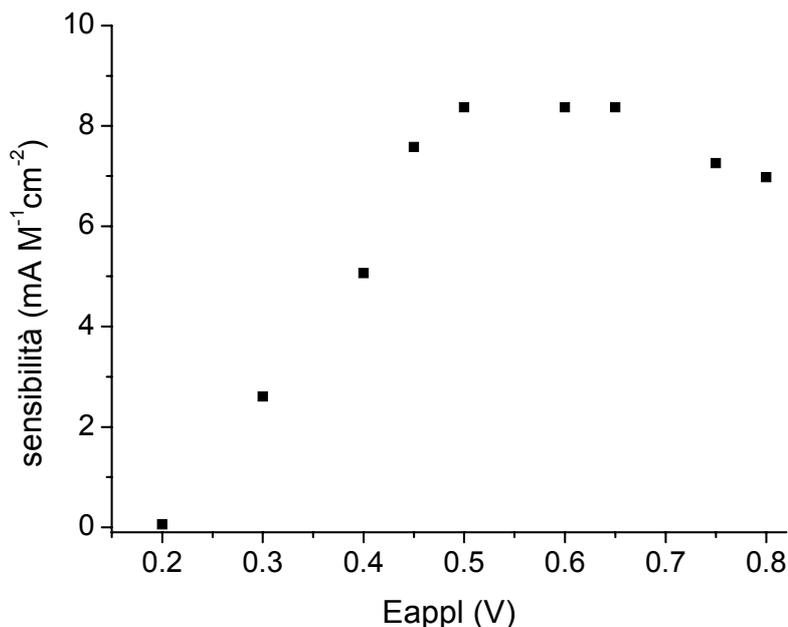


Figura 5.9 Effetto del potenziale sulla sensibilità del biosensore.

In figura 5.9 sono mostrati i risultati ottenuti variando il potenziale applicato all'elettrodo nella determinazione cronoamperometrica del glucosio.

La sensibilità delle curve di calibrazione aumenta man mano che il potenziale diventa più anodico, in quanto le correnti relative all'ossidazione del perossido di idrogeno sono più elevate. Nell'intervallo tra +0.50 V e +0.70 V si ha un valore di sensibilità pressoché costante, mentre a potenziali ancora più anodici si osserva una diminuzione della sensibilità, probabilmente attribuibile al fatto che in tali condizioni si sviluppa di ossigeno.

Si è deciso di utilizzare un potenziale di + 0.45 V, in quanto applicando tale potenziale si ottiene un valore di sensibilità che è quasi quello massimo e, nello stesso tempo, si riduce il contributo dovuto agli interferenti facilmente ossidabili, eventualmente presenti nella matrice da analizzare.

5.2.4 TEMPO DI VITA E STOCCAGGIO

Al fine di studiare la stabilità del sensore Pt-(HT-GOx)-BSA-GA nel lungo periodo, sono state effettuate prove nelle medesime condizioni operative con gli stessi biosensori per 5 settimane, conservandoli in PBS, pH 7.0 a 4°C, quando non in uso.

Dopo 15 giorni consecutivi di prove effettuate in batch, con elettrodo rotante, non si è osservata alcuna perdita di attività, valutata in termini di sensibilità.

Nei giorni seguenti gli elettrodi sono stati testati due volte alla settimana, e hanno mostrato una lenta perdita dell'attività enzimatica, che è risultata essere circa del 13% rispetto al valore iniziale alla fine di ogni settimana. Se consideriamo accettabile una perdita di circa il 25%, il tempo di vita medio dei biosensori può essere considerato di circa un mese.

5.3 PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE NELLE CONDIZIONI OPERATIVE OTTIMALI

L'elettrodeposizione contemporanea di HT ed enzima presenta notevoli vantaggi:

- è molto rapida (circa 30 secondi)
- permette un consumo molto ridotto di enzima. Con la soluzione a concentrazione 3.0 mg mL^{-1} si possono preparare più elettrodi
- si ottengono biosensori caratterizzati da una buona sensibilità verso il glucosio ($7.7 \pm 0.1 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) e da notevole stabilità (tempo di vita medio di circa 30 giorni)

- buona riproducibilità (R.D.S. pari a 4.3%, calcolata dal responso amperometrico ottenuto con soluzioni di glucosio 2 mM per cinque diversi biosensori)

È stata calcolata la quantità di GOx immobilizzata sull'elettrodo, utilizzando il metodo descritto Gooding et al. che si basa sulla determinazione fluorimetrica del FAD, separato dall'enzima immobilizzato mediante "stripping" con una soluzione di urea 8 M [6]. È risultato un valore pari a $46 \mu\text{g cm}^{-2}$.

La sensibilità del biosensore, se correlata alla piccola quantità di enzima adsorbito, mostra come l'HT Ni/Al sia una matrice di immobilizzazione particolarmente appropriata per garantire una efficace stabilizzazione dell'enzima e un'elevata attività enzimatica. Infatti la perdita di attività enzimatica, inevitabilmente associata al processo di immobilizzazione, viene ridotta al minimo.

Il comportamento del biosensore è stato studiato anche in un sistema a flusso. Le prove sono state effettuate a temperatura ambiente al potenziale di +0.50 V vs Ag/AgCl, in soluzione tampone fosfato a pH 7.0, con velocità di flusso del carrier pari a 0.5 mL/min.

Le rette di calibrazione sono state ottenute graficando l'altezza dei picchi registrati (che hanno larghezze circa uguali) in funzione della concentrazione di glucosio iniettata. Le pendenze ottenute risultano $19.1 \pm 0.2 \text{ mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, l'intervallo di linearità compreso tra 0.1 e 12.0 mM e i coefficienti di correlazione eccellenti ($R^2 \geq 0.9989$).

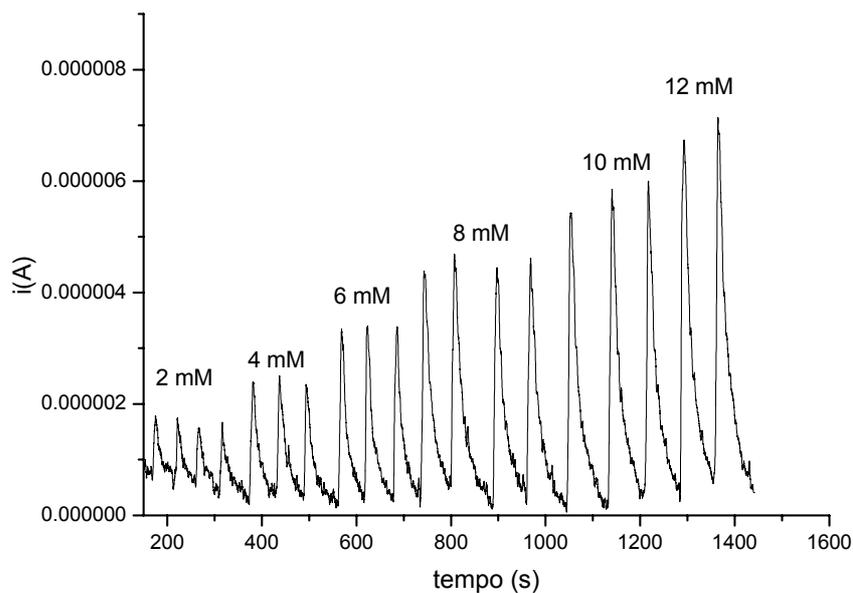


Figura 5.10 Risposta al glucosio registrato con un sistema a flusso.

Sono state studiate quattro differenti velocità di flusso comprese tra 0.2 e 0.8 mL/min.

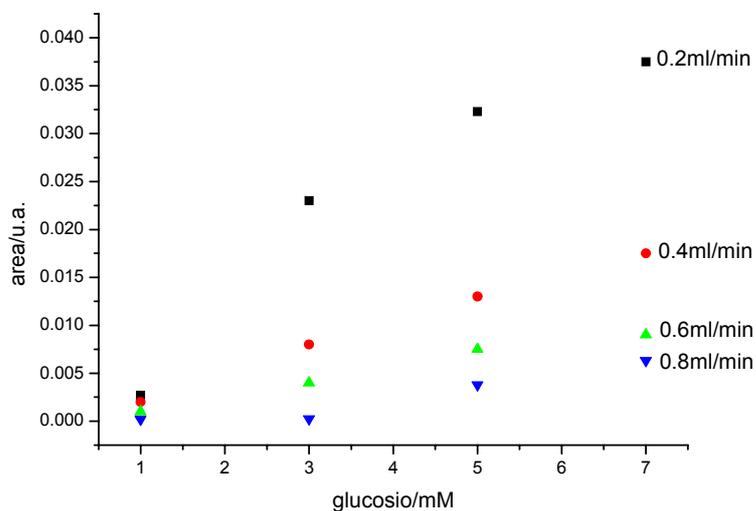


Figura 5.11 Area dei picchi in funzione della concentrazione di analita per le velocità di flusso analizzate.

Dai risultati mostrati in figura 5.11, si nota che l'area dei picchi è inversamente proporzionale alla velocità di flusso in accordo con la

previsione teorica che, a flussi elevati, l'analita ha a disposizione meno tempo per venire a contatto con i siti attivi dell'enzima.

Utilizzando il sistema a flusso, si è studiata la stabilità e durata degli elettrodi Pt-(HT-GOX)-BSA-GA nel tempo.

Sono state effettuate prove nelle medesime condizioni operative utilizzando elettrodi conservati per 18 giorni con due differenti metodi: a secco a 4°C e in soluzione tampone fosfato a pH 7.0, alla stessa temperatura.

Le condizioni operative utilizzate sono: velocità di flusso pari a 0.5 ml/min, tampone fosfato pH 7.0, come elettrolita di supporto, e potenziale applicato +0.50 V vs Ag/AgCl.

Si è osservato che, quando l'elettrodo è conservato in soluzione tampone, la sensibilità si mantiene inalterata fino al decimo giorno e dopo 18 giorni subisce una diminuzione di circa il 30%. Viceversa, se conservato a secco perde il 55% della sua attività nei primi 9 giorni di utilizzo, ed, in seguito, mantiene tale valore invariato per circa 30 giorni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochim. Acta* **44** (1999) 4573.
- [2] C.S. Kim, M. Oh, *Electrochim. Acta* **41** (1996) 2433.
- [3] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Anal. Chim. Acta* **532** (2005) 145
- [4] M. Morikawa, N. Kimizuka, M. Yoshihara, T. Endo, *Chem. Eur. J.* **8** (2002) 5580.
- [5] H.J. Bright, M. Appleby, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 3625.
- [6] J.J. Gooding, M. Situmorang, P. Erokhin, D.B. Hibbert, *Anal. Commun.*, **36** (1999) 225.

CAPITOLO 6

OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI DI FABBRICAZIONE MEDIANTE EXPERIMENTAL DESIGN

Si è già sottolineata l'importanza di alcuni fattori (relativi alla fase di elettrosintesi e alle condizioni di fabbricazione) sulle prestazioni del biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA in termini di sensibilità, calcolata come pendenza della parte lineare della curva di calibrazione ottenuta per il responso amperometrico del perossido di idrogeno, prodotto dalla catalisi enzimatica.

La fabbricazione di biosensori amperometrici che sfruttano HT elettrosintetizzate come matrice di immobilizzazione comprende, come già detto, due fasi: preparazione dell'elettrodo modificato con l'HT su cui è adsorbito l'enzima, applicazione di una membrana che minimizza il rilascio dell'enzima stesso. Poiché l'elettrosintesi dell'idrotalcite è influenzata da moltissimi parametri sperimentali, ulteriormente incrementati dal fatto che il materiale deve funzionare come sistema di supporto dell'enzima, si è pensato di utilizzare tecniche di experimental design per decidere il numero minimo di esperimenti da effettuare, al fine di ottimizzare i principali parametri, da cui dipende la sensibilità del biosensore.

L'experimental design è la formalizzazione del piano in base al quale viene condotto l'esperimento. Esso include la scelta della variabile da considerare come risposta sperimentale, la pianificazione dei fattori da studiare e dei livelli ed, inoltre, l'uso di alcuni accorgimenti come la casualizzazione e la replicazione.

Vengono definite come fattori le variabili che esercitano un'influenza sulla risposta sperimentale a cui si è interessati, mentre i livelli sono i

valori pianificati per un determinato fattore: se, ad esempio, un esperimento è eseguito a tre differenti temperature, il fattore temperatura avrà tre livelli.

Oltre ai fattori selezionati per lo studio, ci sono variabili “incontrollate” che possono influire sui risultati delle prove sperimentali. La condizione di “casualizzazione”, che si realizza quando la sequenza temporale degli esperimenti avviene in modo casuale, aumenta la probabilità che l’effetto di variabili non controllate possa compensarsi nella globalità dell’esperimento. La replicazione, ovvero la ripetizione di una misurazione, rappresenta una modalità operativa finalizzata all’individuazione di errori di misura nelle stime dell’influenza prodotta dai fattori considerati.

Sulla base delle informazioni già ottenute dagli esperimenti precedenti e, considerando che per effettuare un esperimento sono necessari circa due giorni, l’Università di Genova, Dipartimento di Chimica e Tecnologie farmaceutiche ed alimentari, con cui abbiamo collaborato, ha esaminato diversi metodi di experimental design, suggerendo di considerare il minor numero possibile di fattori e di livelli.

6.1 EXPERIMENTAL DESIGN

Il software che è stato utilizzato dall’Università di Genova per l’elaborazione del disegno sperimentale è Matlab con il “chemometrics toolbox” scaricabile dal sito www.chemometrics.it, che permette un’analisi quantitativa e qualitativa.

Come miglior compromesso tra qualità dell’informazione e lavoro sperimentale è stato scelto un disegno fattoriale intero a 2 fattori e 3 livelli [1, 2]. Questo tipo di disegno fornisce informazioni sulla stima dei 2 fattori specificati secondo 3 livelli e delle possibili interazioni dei loro effetti sulla risposta sperimentale.

Le prestazioni del modello sono state calcolate per mezzo del RMSEC (root mean square error in calibration) e del RMSECV (root mean square error in cross validation). Per stimare l’RMSECV, sono stati calcolati

tanti modelli quanti esperimenti eseguiti escludendo ogni volta un esperimento, il cui responso è stato poi predetto.

L'RMSECV è definito come:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N}}$$

dove y_i è il responso sperimentale osservato per l'esperimento i , \hat{y}_i è il corrispondente responso teorico, stimato mediante il modello applicato e N è il numero degli esperimenti.

Le prestazioni del biosensore sono state valutate misurando le correnti di stato stazionario a +0.45 V per concentrazioni crescenti di glucosio in PBS 0.1 M. Le aliquote di glucosio sono state aggiunte a PBS operando in condizioni idrodinamiche ($\omega = 200$ rpm) e si è misurato il corrispondente valore di corrente. La curva di calibrazione è stata ottenuta, come già descritto nei capitoli precedenti, dai valori di corrente di stato stazionario (I_L) a cui viene sottratto il valore di corrente registrato per la sola PBS (I_{bianco}), $I_L - I_b$, in funzione della concentrazione di glucosio (mM). La pendenza della parte lineare della curva di calibrazione fornisce la sensibilità del biosensore che è la misura fisica che si è presa in considerazione, come responso sperimentale.

L'elettrosintesi è stata effettuata in condizioni potenziostatiche, in una soluzione contenente GOx, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ in KNO_3 (0.3 M), con un elettrodo di Pt rotante (RDE) al fine di garantire l'omogeneità della sospensione di elettrosintesi e, di conseguenza, una quantità riproducibile di enzima intrappolato.

Per stabilizzare il biofilm HT-GOx su Pt e impedire il rilascio di enzima in soluzione, tutti gli elettrodi sono stati mantenuti per circa 60 minuti in atmosfera satura di vapori di glutaraldeide (GA). Si è optato per tale metodo poichè la reticolazione tra i gruppi amminici dell'enzima e la GA è un sistema di stabilizzazione di facile realizzazione che garantisce risultati riproducibili.

Si è effettuato uno studio preliminare considerando i seguenti fattori: tempo di deposizione (30 - 120 s), concentrazione enzimatica (0.5 - 3.0 mg/mL), rapporto molare Ni/Al (3:1 o 2:1) della soluzione di elettrosintesi per una concentrazione totale di Ni e Al pari a 0.03 M e pH della soluzione di lavoro (5.5-7.0).

Sulla base dei risultati di questo studio e a quelli ottenuti precedentemente tramite analisi monovariata, si è concluso quanto segue:

- la concentrazione di enzima nella soluzione di elettrodeposizione è un fattore fondamentale per la sensibilità del biosensore,
- tempi di deposizione più prolungati di 30 s non portano ad alcun miglioramento in termini di sensibilità,
- la sensibilità migliora in PBS a pH 7.0,
- al fine di elettrodeporre una vera fase idrotalcitica, un fattore estremamente importante è, senz'altro, il rapporto molare Ni/Al.

Pertanto, grazie a tali considerazioni, si è deciso di realizzare un experimental design scegliendo come fattori critici solamente la concentrazione enzimatica e il rapporto molare Ni/Al della soluzione di elettrodeposizione.

Più precisamente, si è considerato il rapporto molare Ni/Al nell'intervallo compreso tra 2 e 4 e la concentrazione enzimatica tra 0.3 e 3 mg mL⁻¹, era già stato dimostrato che concentrazioni superiori di GOx non fornivano alcun miglioramento di sensibilità.

Studiando 2 fattori a 3 livelli, si è scelto un disegno fattoriale intero che permette di studiare l'interazione lineare tra i fattori e i loro effetti quadratici. La matrice sperimentale utilizzata è quella in tabella 6.1, i fattori sono codificati da -1 a +1.

Esp N°	Rapporto molare Ni/Al	Concentrazione enzimatica
1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	-0.481
5	0	-0.481
6	1	-0.481
7	-1	1
8	0	1
9	1	1
10	-1	-1
11	-1	-1
12	-1	-1

Tabella 6.1. Matrice sperimentale

Oltre ai nove esperimenti previsti dal disegno fattoriale, tre ulteriori replicati sono stati effettuati al livello inferiore di entrambi i fattori. Il corrispondente progetto sperimentale è riportato nella tabella 6.2, dove il responso è la sensibilità dei biosensori ($S10^6$).

Per ogni esperimento è stato costruito un biosensore utilizzando i livelli dei fattori richiesti dal disegno sperimentale ed è stata stimata la sensibilità per ogni esperimento. La trasformazione logaritmica di $S10^6$ è stata effettuata poiché l'andamento della sensibilità rispetto alla concentrazione enzimatica non è risultato lineare, ma logaritmico.

Nome Esp	Run Order	Rapporto molare Ni/Al	Concentrazione enzima (mg mL ⁻¹)	S10 ⁶ (A mM ⁻¹)	Log(S10 ⁶)
N1	8	2	0.3	0.0115	-1.939
N2	12	3	0.3	0.0111	-1.955
N3	11	4	0.3	0.0055	-2.260
N4	4	2	1	0.0783	-1.106
N5	7	3	1	0.0474	-1.324
N6	9	4	1	0.0245	-1.611
N7	5	2	3	0.7100	-0.149
N8	10	3	3	1.2200	0.086
N9	6	4	3	1.2400	0.093
N10	3	2	0.3	0.0131	-1.883
N11	1	2	0.3	0.0124	-1.907
N12	2	2	0.3	0.0135	-1.870

Tabella 6.2 Disegno sperimentale

Per validare il modello, sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti al livello intermedio di ogni fattore, in tabella 6.3 vengono riportati i risultati ottenuti:

Nome Exp.	Rapporto molare Ni/Al	Concentrazione enzima (mg mL ⁻¹)	S10 ⁶ (A mM ⁻¹)	Log(S10 ⁶)
R1	3	1	0.0458	-1.339
R2	3	1	0.0505	-1.297
R3	3	1	0.0488	-1.312
mean			0.0484	-1.316
s ^a			0.0024	0.022
c.i. (p=0.95) ^b			0.006	0.053

^a deviazione standard, ^b intervallo di fiducia (probabilità = 0.95)

Tabella 6.3 Validazione del modello

Il modello postulato è il seguente:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{12} X_1 X_2$$

dove il responso Y rappresenta il $\text{Log}(S10^6)$ e X_1 , X_2 sono rispettivamente il rapporto molare Ni/Al e la concentrazione di enzima. Gli effetti di ogni fattore sono stati studiati sia come termini lineari sia come termini quadratici, mentre l'interazione è descritta dal prodotto dei due fattori.

Il modello risultante è il seguente:

$$Y = -6.72 - 0.07 X_1 + 1.04 X_2^{***} - 0.010 X_1^2 - 0.23 X_2^{2(*)} + 0.16 X_1 X_2^{**}$$

(* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

dove X_2 è la concentrazione enzimatica con $p < 0.001$, il termine al quadrato della concentrazione enzimatica è X_2^2 con $p < 0.05$ e l'interazione del rapporto molare di Ni/Al con la concentrazione enzimatica è $X_1 X_2$ con $p < 0.01$. Tutte le rappresentazioni riguardanti il modello sono risultate soddisfacenti sia come "fitting", sia come "cross-validation" ($R^2 = 0.991$, deviazione standard dei residui = 0.082, RMSECV = 0.151).

La validazione del modello è stata effettuata sostituendo X_1 e X_2 con i valori codificati dagli esperimenti di validazione. Il responso così stimato è stato -1.27 ± 0.15 , che non è significativamente diverso dalla media dei valori sperimentali, che è risultata pari a -1.32 ± 0.05 . Pertanto il modello può essere usato per valutare il responso nell'intero campo sperimentale.

La rappresentazione grafica delle relazioni messe in luce da tale modello, in base ai risultati sperimentali, è riportata in figura 6.1. Come si può osservare il responso migliora con l'aumento della concentrazione enzimatica a causa dell'interazione tra i due fattori; tale effetto è maggiore quando si lavora ad alti rapporti molari di Ni/Al nella soluzione di elettrodeposizione.

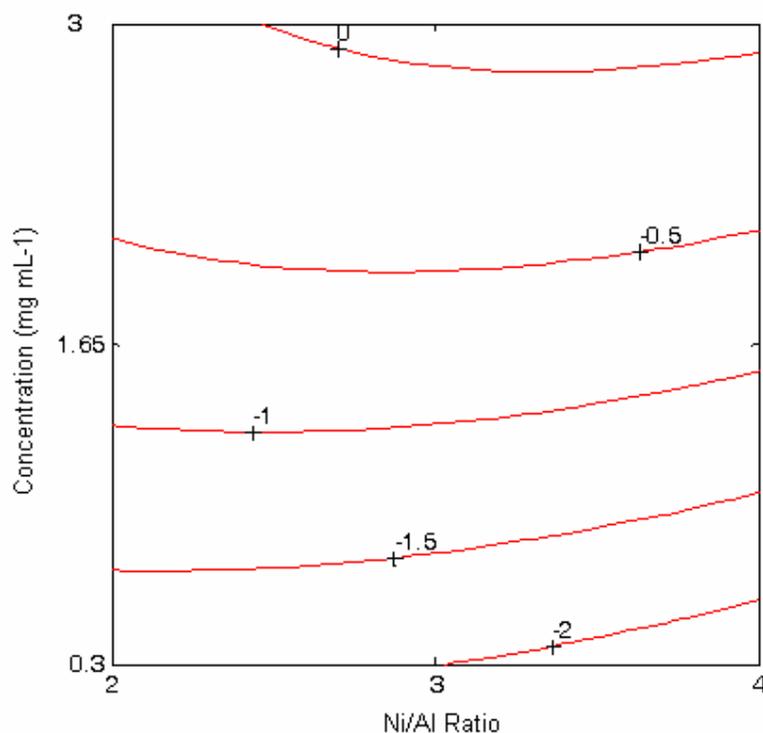


Figura 6.1. Rappresentazione grafica delle risposte sperimentali espresse come $\text{Log}(S10^6)$.

I risultati ottenuti grazie al disegno sperimentale sono in accordo con quanto precedentemente osservato.

Più precisamente il valore ottimale per il rapporto molare di Ni/Al è risultato pari a 3 o 4 e per quanto riguarda l'enzima si è riscontrato che una concentrazione di 3 mg mL^{-1} determina un miglioramento delle prestazioni del biosensore, in termini di sensibilità.

La riproducibilità dei biosensori è pari al 6% ed è stata valutata dalle varianze dei due set di replicati, e cioè gli esperimenti N1, N10, N11, N12 e R1, R2 e R3 riportati, rispettivamente, nelle tabelle 6.2 e 6.3.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R.G. Brereton, in: Chemometrics, Data analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Wiley, p. Chichester, 2003.
- [2] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, in: Statistics for Experiment, An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building, Wiley, New York, 1978.

CAPITOLO 7

PLATINATURA

Molte applicazioni richiedono la miniaturizzazione dei biosensori con una conseguente diminuzione della sensibilità di risposta.

Nel tentativo di superare questo problema sono state proposte molte strategie, quali l'introduzione di mediatori del trasferimento elettronico, l'uso di sol-gels come matrici di immobilizzazione enzimatica per aumentare la quantità di biomolecola immobilizzata [1,2] e lo sviluppo di materiali elettrodi porosi.

Per incrementare la sensibilità di corrente, si è pensato di aumentare la superficie elettroattiva con deposizione di nanoparticelle di Pt sulla superficie elettrodica. In tal modo, si dovrebbe depositare una notevole quantità di enzima per unità di superficie elettrodica.

I film di nanoparticelle di platino hanno una struttura mesoporosa ben definita e si possono ottenere per via elettrochimica in diversi modi: in condizioni potenziostatiche, galvanostatiche o con scansioni cicliche del potenziale.

Secondo quanto riportato dalla letteratura [3], gli elettrodi platinati dovrebbero fornire responsi amperometrici 30-40 volte più sensibili di quelli in cui il supporto elettrodico è il platino non trattato.

In questo capitolo vengono descritti i risultati ottenuti in termini di sensibilità nei confronti della risposta al perossido di idrogeno, utilizzando elettrodi sottoposti a platinatura in condizioni potenziostatiche.

L'incremento di area elettroattiva, in seguito alla platinatura, è stato valutato integrando i picchi di adsorbimento dell'idrogeno nel

voltammogramma ciclico registrato con l'elettrodo immerso in acido solforico.

Avendo verificato un incremento di area elettroattiva, sono stati valutati i parametri ottimali di elettrodeposizione delle nanoparticelle di Pt: potenziale applicato e tempo di deposizione.

7.1 PREPARAZIONE DELL'ELETTRODO

Elettrodi di Pt di area geometrica pari a 0.0706 cm^2 sono stati puliti su carta abrasiva e su un panno da lucidatura con allumina bagnata a diversa granulometria (0.3 e $0.05 \mu\text{m}$), sono stati poi lavati con abbondante acqua bidistillata e posti in bagno ad ultrasuoni, dopo averli immersi in una miscela etanolo/acqua 1:1, per circa 10 minuti.

L'elettrodeposizione delle nanoparticelle di Pt è stata effettuata per via potenziostatica utilizzando una soluzione di HCl 0.1 M contenente K_2PtCl_6 a concentrazione 2.0 mM e acetato di piombo, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1 mM).

Si sono presi in considerazione i seguenti potenziali: -0.1V, -0.2V, -0.3V e i seguenti tempi: 500, 700, 1000 o 2000 secondi.

7.2 DETERMINAZIONE DELL'AREA ELETTROATTIVA

L'adsorbimento di idrogeno sulla superficie elettrodica è stato realizzato mediante l'applicazione di un potenziale sufficientemente catodico all'elettrodo, immerso in un elettrolita acido.

Come si può osservare in figura 7.1 [4], si possono distinguere tre regioni nei voltammogrammi ciclici registrati in acido solforico, relative alla formazione di ossidi sul platino, al doppio strato e alla riduzione di idrogeno che viene adsorbito sul platino.

A potenziali superiori a 0.6 V, durante la scansione anodica, si forma uno strato di ossido di Pt idratato, prima della liberazione di ossigeno. La zona centrale, in cui si osservano bassi valori di corrente sia nell'andata che nel ritorno della scansione, viene definita del "doppio strato elettrico" e in tale zona avvengono solamente processi capacitivi.

La zona relativa all'idrogeno si trova a potenziali catodici ed è quella che ci interessa per il calcolo dell'area elettroattiva [5]. A questi potenziali avviene la riduzione di H^+ e l'adsorbimento di atomi di H; a potenziali catodici più spinti si arriva alla formazione di un monostrato di atomi di idrogeno adsorbiti e, in seguito, ha luogo l'adsorbimento di molecole di H_2 . Sono possibili stati multipli di adsorbimento ascrivibili a diversi piani cristallografici del Pt ((100), (110), (111)) [6]. In figura 7.1 sono visibili i picchi relativi all'idrogeno atomico fortemente legato dovuto all'adsorbimento sul piano (100) e l'idrogeno atomico debolmente legato sui piani (110) e (111).

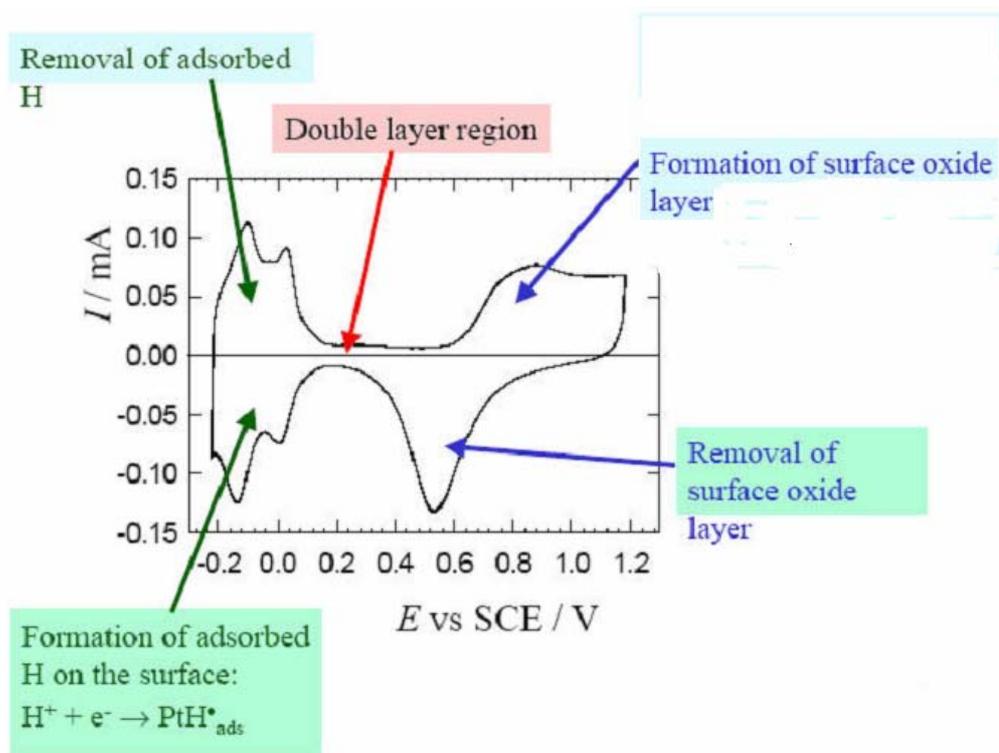


Figura 7.1 Voltammogramma ciclico di un elettrodo di Pt immerso in H_2SO_4 0.5 M.

L'area elettroattiva è stata calcolata valutando l'area sottesa dai picchi di adsorbimento dell'idrogeno, ottenuti da CV registrate in H_2SO_4 0.5 M, assumendo che la carica associata a un singolo sito di Pt-H sia pari a $2.1 \cdot 10^{-4} \text{ C cm}^{-2}$, come riportato in letteratura [4].

L'aumento maggiore di superficie elettroattiva è stato osservato con elettrodi platinati a - 0.20 V per 1000 secondi; in particolare, è risultata un'area di $8.21 \pm 0.08 \text{ cm}^2$.

I fattori di rugosità ρ , calcolati dal rapporto tra l'area superficiale elettroattiva e l'area geometrica, sono risultati pari a 43, 116 e 70 per elettrodi platinati per 1000 s rispettivamente a - 0.1V, - 0.2V, - 0,3V.

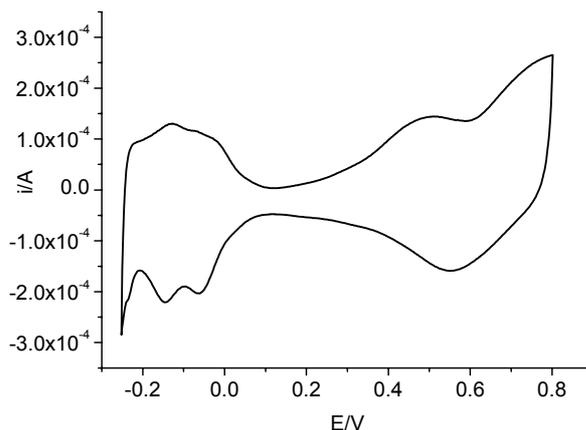


Figura 7.2 CV di un elettrodo platinato potenziostaticamente per a -0.2V per 1000 s.

La figura 7.3 mostra un'immagine ottenuta tramite microscopia a scansione elettronica di un elettrodo di Pt modificato con nanoparticelle di platino elettrodepositato nelle condizioni che portano al maggior incremento di area elettroattiva (- 0.20 V, 1000 s); sono visibili particelle con un diametro di circa 250-300 nm.

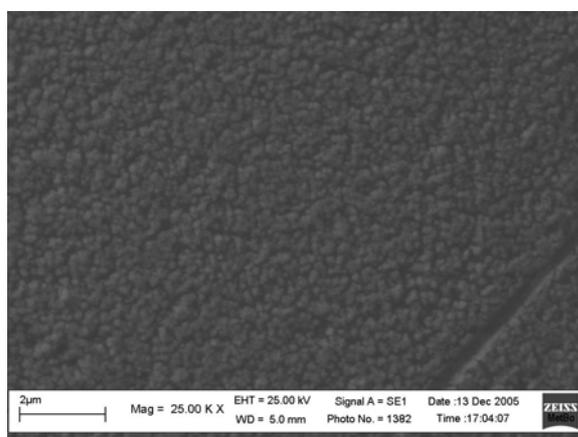


Figura 7.3 Immagine di un elettrodo di Pt platinato (- 0.20 V, 1000 s), ottenuta al SEM (MAG. = 25.000X)

7.3 PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE Pt platinato – HT+GOx

L'HT è stata elettrosintetizzata sugli elettrodi platinati nelle condizioni già descritte nei capitoli precedenti (vedi cap. 2).

In soluzioni acquose basiche l'HT Ni/Al-NO₃ mostra una coppia di picchi redox ascrivibili alla reazione [7]:



Dai responsi dei CV si è potuto osservare un aumento delle aree dei picchi relativi a tale processo di circa 3 volte per il Pt platinato modificato con HT rispetto al Pt-HT; questo risultato è dovuto ad un maggior numero di centri elettroattivi di nichel. Tuttavia tale aumento è risultato di gran lunga inferiore a quello che si poteva prevedere in base ai dati ottenuti per l'area elettroattiva (vedi paragrafo 7.2).

Probabilmente la superficie di Pt platinata non è ugualmente disponibile alla precipitazione dell'HT, ma la crescita del deposito avviene su siti preferenziali delle nanoparticelle di Pt, dove la nucleazione ha luogo più facilmente.

Di conseguenza, il biosensore realizzato elettrodepositando HT e GOx sul Pt platinato (Pt platinato-HT+GOx) ha fornito responsi amperometrici la cui sensibilità è molto inferiore a quella che ci si aspettava dallo studio preliminare sull'effettiva area elettroattiva. La sensibilità è risultata, infatti, circa 3 volte superiore, nonostante il fattore di rugosità fosse elevato (pari a 116), mentre l'intervallo di linearità è risultato più ampio rispetto al biosensore Pt – HT+GOx.

Questo risultato è in accordo con i risultati preliminari ottenuti con la spettroscopia XPS, che ci hanno portato a concludere che nella fase di elettrodeposizione il nichel interagisce con i siti amminoacidici della GOx e la biomolecola si adsorbe particolarmente nei punti della superficie elettrodica in cui il nichel si rende disponibile per la precipitazione di una vera fase idrotalcitica.

Biosensore	Sensibilità mA M ⁻¹	Limite superiore di linearità mM
Pt platinato – HT+GOx	1.54 ± 0.06	15.0 mM
Pt – HT+GOx	0.55 ± 0.07	10.0 mM

Tabella 7.1 Confronto delle prestazioni dei biosensori Pt platinato – HT+GOx e Pt – HT+GOx.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Atanasov, A. Kaisheva, S. Gamburgzev, I. Iliev, S. Bobrin, *Electroanalysis* **5** (1993) 91.
- [2] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **399** (1999) 21
- [3] C.S. Kim, M. Oh, *Electrochim. Acta* **41** (1996) 2433.
- [4] R. Woods, in: A.J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, vol. 9, Marcel Dekker, New York, 1976.
- [5] J.M. Doña Rodriguez, J.A.Herrera Melián, J. Pérez Peña, *J. Chem. Ed.* **77** (2000) 1195
- [6] F.G. Will, C.A. Knorr, *Z.Elektrochem.* **64** (1960) 258
- [7] E. Scavetta, B. Ballarin, M. Giorgetti, I. Carpani, F. Cogo, D. Tonelli, *J. New Mat. Electrochem. Syst.* **7** (2004) 43

CAPITOLO 8

8.1 SISTEMI DI STABILIZZAZIONE ENZIMATICA

Un aspetto molto importante nella fabbricazione di un biosensore è la fase di stabilizzazione enzimatica; da essa dipendono le caratteristiche del biosensore. Un requisito essenziale per la fabbricazione di un biosensore stabile e sensibile è l'immobilizzazione di un'elevata quantità di molecole di enzima, senza perdita di attività.

La stabilità dell'enzima è profondamente influenzata dalla biocompatibilità dei materiali a contatto con la parte biologica.

Fino a questo punto abbiamo descritto le prestazioni di un biosensore realizzato stabilizzando il biofilm HT-GOx con una membrana protettiva classica ottenuta per reticolazione di albumina di siero bovino e glutaraldeide o sottoponendolo ai soli vapori di GA. I biosensori così realizzati presentano una buona sensibilità, ma scarsa selettività. Nello sviluppo di biosensori per la determinazione di analiti in matrici reali l'eliminazione o la parziale soppressione degli interferenti presenti nel campione è uno degli aspetti di maggior interesse, poiché è tra i più ardui.

Con l'intento di aumentare la selettività e la stabilità del biosensore sono state studiate differenti membrane sugli elettrodi di Pt-HT-GOx.

In particolare, sono state prese in considerazione membrane di stabilizzazione innovative, a base di gel di esacianoferrato di palladio (PdHCF) e idrogel di TiO₂, e le prestazioni confrontate con quelle ottenute usando membrane più classiche a base di Nafion, vapori di GA, o reticolazione con BSA + GA.

Una maggior biocompatibilità si è osservata con gli idrogel a base di esacianoferrato di palladio.

8.1.1 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC

Si è effettuato uno studio preliminare sulla modificazione delle superfici elettrodiche di Pt mediante spettroscopia di impedenza AC (EIS).

La spettroscopia di impedenza in corrente alternata è un potente metodo per la caratterizzazione delle proprietà elettriche ed elettrochimiche delle interfacce che si creano su elettrodi conduttori.

Le prove di impedenza sono state effettuate in una soluzione di KCl (0.1 M) contenente 5 mM di $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, ad un potenziale di +0.17 V.

Il potenziale applicato corrisponde al potenziale formale del sistema studiato. L'intervallo di frequenza che si è applicato è stato 100mHz-10kHz. I risultati sono stati riportati come grafici di Nyquist.

Il valore di R_{ct} per un elettrodo di Pt tal quale è stato calcolato essere 150 Ω (Fig. 8.1); quando si deposita un film di HT sulla superficie elettrodica, ovviamente, si osserva un incremento della R_{ct} , in conseguenza alla barriera al trasferimento elettronico creata dallo strato di deposito.

Il valore di R_{ct} aumenta ulteriormente quando l'enzima GOx è codepositato con l'HT a causa dell'ingombro sterico dell'enzima, che limita ulteriormente il trasferimento elettronico ($R_{ct} = 44090 \Omega$).

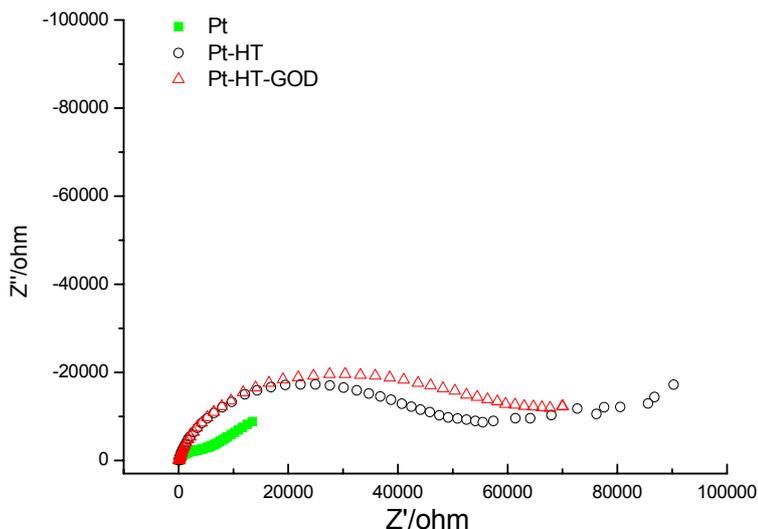


Figura 8.1 Grafici di Nyquist ottenuti per un elettrodo di Pt tal quale (quadrati verdi), per un elettrodo di Pt-HT (cerchietti neri) e per un biosensore Pt-HT-GOx (triangoli rossi).

8.1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRANE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA AC

Dopo aver studiato il comportamento dell'elettrodo di Pt modificato con il biofilm HT-GOx, è stata effettuata la caratterizzazione dei biosensori ottenuti stabilizzando il biofilm con diversi sistemi di stabilizzazione enzimatica.

Le membrane protettive sono state realizzate seguendo le procedure descritte nel capitolo 2 e sono le membrane, già citate: ottenute con Nafion, idrogel a base di esacianoferrato di palladio (PdHCF) e a base di TiO_2 e quelle ottenute dalla reticolazione di GA-BSA e dalla reticolazione dei gruppi amminici della GOx e GA.

I grafici di Nyquist, relativi ai diversi sistemi di stabilizzazione presi in considerazione, sono riportati in figura 8.2.

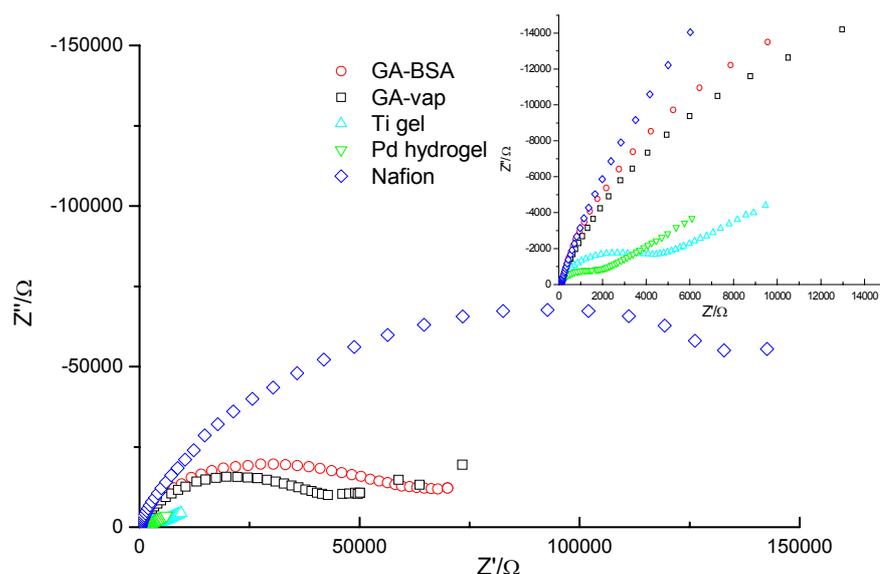


Figura 8.2 Grafici di Nyquist ottenuti per elettrodi di Pt-HT-GOx protetti con i differenti sistemi di stabilizzazione riportati in legenda.

Sistema di stabilizzazione	Rct
Nafion 0.5%	169000 Ω
BSA+GA	45000 Ω
Vapori saturi di GA	44000 Ω
Idrogel a base di PdHCF	1558 Ω
Idrogel a base di TiO ₂	3900 Ω

Tabella 8.1 Valori di Rct ottenuti con i diversi sistemi di protezione

Il valore di Rct più elevato è stato ottenuto con il Nafion; tale risultato è dovuto al fatto che il mediatore redox utilizzato nelle misure di impedenza è carico negativamente e la sua diffusione verso la superficie elettrodica è ostacolata dalla carica negativa della membrana.

Ciò è in accordo con i risultati riportati più avanti, nel capitolo 9, riguardanti la selettività dei biosensori nei confronti di interferenti carichi negativamente. Più precisamente, si è osservato un responso limitato nei

confronti degli ioni ascorbato e citrato, se la misura del glucosio è eseguita con l'elettrodo Pt-HT-GOx- Nafion.

Il valore inferiore di R_{ct} si ottiene quando il sistema di stabilizzazione è l'idrogel a base di PdHCF, ma anche quando si utilizzano idrogel a base di TiO_2 , il valore di R_{ct} è piuttosto basso. In entrambi i casi la resistenza al trasferimento di carica risulta inferiore rispetto a quella dell'elettrodo di Pt-HT-GOx non protetto e ciò dimostra che tali idrogel permettono una migliore permeazione del mediatore $Fe(CN)_6^{3-}$ rispetto al "più compatto" film Pt-HT.

Se si utilizzano membrane protettive quali GA+BSA e GA (vapori) si ottengono valori di R_{ct} simili tra loro e paragonabili a quanto osservato per l'elettrodo di Pt-HT-GOx non protetto, ciò indica che questo tipo di membrana non crea alcuna barriera diffusionale.

8.1.3 CONFRONTO DELLE PRESTAZIONI DEI DIVERSI SISTEMI DI STABILIZZAZIONE ENZIMATICA

È stato effettuato un confronto delle prestazioni dei biosensori realizzati con i differenti sistemi di stabilizzazione, registrando il responso cronoamperometrico al perossido di idrogeno, enzimaticamente prodotto, nelle condizioni sperimentali che sono risultate ottimali per il biosensore Pt-(HT-GOx)-BSA-GA e, cioè, + 0.45 V, in PBS (pH 7.0), a 25° C.

Le rette di calibrazione sono state realizzate con i valori di corrente di stato stazionario, corrispondenti alle aggiunte di glucosio, a cui è stato sottratto il valore del bianco registrato in PBS.

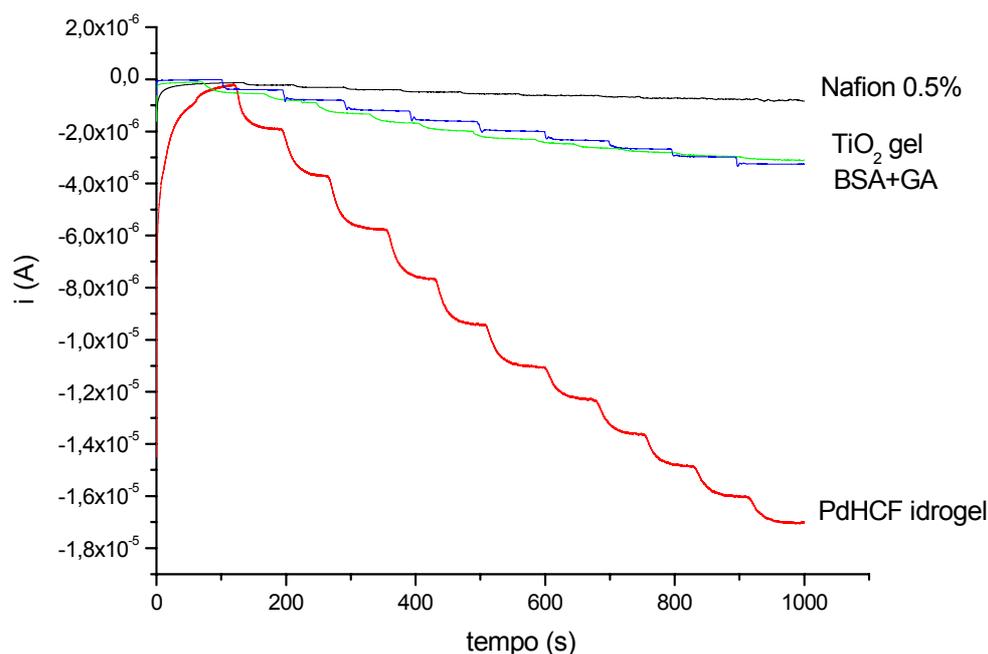


Figura 8.3 Risposti cronoamperometrici al glucosio ottenuti con i biosensori realizzati con i sistemi di stabilizzazione riportati nel grafico.

In tabella 8.2 sono riportati i valori delle sensibilità, intervalli di linearità e tempi di risposta ottenuti con le differenti membrane protettive.

Sistema di stabilizzazione	S ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	Tempo di risposta (s)	Intervallo di linearità (mM)
GA-BSA	7.8 ± 0.1	5-10	0.5-10
GAvap	7.6 ± 0.1	3-9	0.5-10
PdHCF	36.5 ± 0.2	5-10	0.5-10
Nafion 0.5%	3.4 ± 0.2	3-5	0.5-10
TiO ₂	7.5 ± 0.2	20	0.5-6.0

Tabella 8.2 Parametri caratteristici dei grafici di calibrazione ottenuti con i sistemi di stabilizzazione riportati.

Come si può notare dalla tabella, l'intervallo di linearità è indipendente dal sistema di stabilizzazione utilizzato; si osserva un intervallo più ristretto con l'idrogel di ossido di titanio a causa di problemi di stabilità

che si sono riscontrati con tale membrana in presenza di perossido di idrogeno e, di conseguenza, scarsa riproducibilità e ripetibilità. Tale membrana risulta caratterizzata da un tempo di risposta più elevato.

Le sensibilità calcolate per BSA + GA, vapori di GA e idrogel a base di TiO_2 sono paragonabili tra loro, mentre il valore riscontrato con l'idrogel a base di palladio, risulta essere molto più elevato rispetto agli altri.

La sensibilità più elevata non può essere attribuita alla presenza dei centri di ferro nella membrana; infatti i voltammogrammi ciclici registrati in PBS non hanno evidenziato elettroattività dei centri di ferro (vedi figura 8.4); questo risultato è confermato anche da quanto osservato da Pfenning et al. [2].

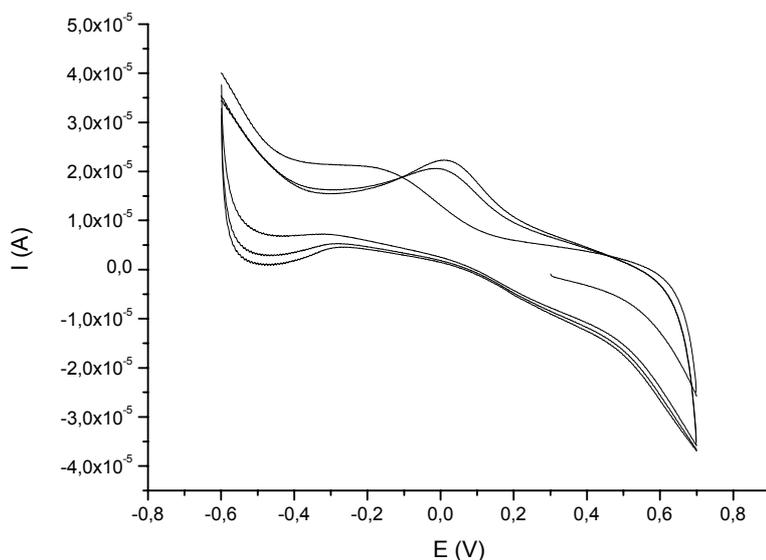


Figura 8.4 Voltammogramma ciclico registrato in PBS di un elettrodo Pt-HT-GOx-idrogel PdHCF

Il valore più elevato di sensibilità potrebbe essere spiegato ipotizzando una migliore biocompatibilità tra l'enzima e la matrice di stabilizzazione, oltre che una miglior diffusione dell'analita [3].

Il Nafion ha portato alla realizzazione di un biosensore caratterizzato da un valore di sensibilità inferiore a quelli ottenuti con gli altri sistemi, che potrebbe essere attribuibile ad una parziale denaturazione dell'enzima a contatto con tale sistema di stabilizzazione.

Il Nafion è venduto come acido perfluorosolfonico ($\text{pH} < 1$) in soluzione idroalcolica al 5%, pertanto per prevenire l'inattivazione dell'enzima durante l'immobilizzazione con Nafion, si è diluita la soluzione iniziale con acqua bidistillata a 0.5% w/w (pH circa 5).

All'aumentare della percentuale di Nafion si sono osservati problemi di diffusione e diminuzione dell'attività enzimatica a causa di un parziale "blocco" dei siti attivi dell'enzima. Con soluzioni di Nafion a concentrazioni inferiori a 0.5 % si è constatato un rapido rilascio dell'enzima in soluzione, notando una perdita dell'attività di circa il 50%, già alla seconda misura.

BIBLIOGRAFIA

- [1] V. Sanz, S. de Marcos, J.R. Castello, J. Galban, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 1038
- [2] B.W. Pfenning, A.B. Bocarsly, R.K. Prud'homme, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 2661
- [3] D.Ivekovic, S. Milardovic, B.S. Grabaric, *Biosensor & Bioelectronics* **20** (2004) 872

CAPITOLO 9

9.1 STUDIO DEGLI INTERFERENTI

È stato condotto uno studio per valutare la risposta di possibili interferenti che possono essere presenti in matrici reali, in quanto una delle principali limitazioni riscontrate con i biosensori amperometrici basati sull'ossidazione elettrochimica del perossido di idrogeno è la sovrastima della concentrazione di glucosio, causata dal contributo di corrente dovuto ai composti facilmente elettrossidabili, presenti nella soluzione d'analisi.

Nell'ottica di un futuro utilizzo dei biosensori, sviluppati per la determinazione del contenuto di glucosio in alimenti e dei livelli di glicemia nel sangue è stata effettuata la scelta dei possibili interferenti da studiare.

I composti che sono stati presi in considerazione sono: metanolo, etanolo, saccarosio, fruttosio, acido citrico, acido ascorbico (AA), acido urico, L-cisteina; inoltre è stato studiato anche l'acetaminofene, poiché essendo un analgesico di uso comune rappresenta una possibile fonte di interferenza per la determinazione dei livelli glicemici nei fluidi biologici.

Si è osservato che le interferenze maggiori sono dovute principalmente all'acido ascorbico e all'acetaminofene.

L'acido ascorbico è una vitamina idrosolubile che è presente ad elevata concentrazione negli agrumi; il contenuto fisiologico nel sangue di un individuo sano è di circa 0.1 mM.

L'acetaminofene può essere presente nei fluidi biologici ad una concentrazione di circa 0.2 mM, essendo impiegato frequentemente in

virtù dei minimi effetti collaterali, se si deve somministrare un antidolorifico.

Gli effetti delle possibili sostanze interferenti sono stati investigati mediante cronoamperometrie effettuate nelle condizioni operative di cui si è già ampiamente discusso (+0.45 V in PBS, pH 7.0).

Il segnale per una determinata concentrazione di glucosio (5.0 mM) è stato confrontato con il valore di corrente ottenuto in presenza di una concentrazione variabile di interferente. L'effetto delle specie interferenti è stato riportato come deviazione percentuale del responso amperometrico per la concentrazione di glucosio selezionata.

Si è scelto il valore di concentrazione 5.0 mM al fine di operare all'interno dell'intervallo di linearità di risposta del sensore.

La deviazione percentuale del responso è stata calcolata come $(I_i - I_g)/I_g \times 100$, dove I_i e I_g sono le correnti di stato stazionario registrate per le soluzioni contenenti, rispettivamente, glucosio e interferente o solamente glucosio.

In tabella 9.1 sono riportati i risultati ottenuti con i biosensori realizzati con i differenti sistemi di stabilizzazione, quando in soluzione sono presenti diversi rapporti molar interferente: analita. Come si può osservare la maggior interferenza è causata dall'acido ascorbico e dall'acetaminofene.

Quando si utilizza il Nafion come membrana protettiva, l'interferenza prodotta dalle specie anioniche è minima, come atteso. Il film di Nafion funge da scambiatore di tipo cationico ed esclude le specie presenti in forma anionica al pH fisiologico, quali urato, citrato e ascorbato.

Pertanto si presta per applicazioni nelle analisi alimentari, mentre a causa dell'interferenza da parte dell'acetaminofene, non può essere utilizzato per la determinazione del livello glicemico nel siero.

Interferente	Rapporto molare interferente : glucosio	Deviazione del responso %			
		BSA+GA	GA vapori	PdHCF idrogel	Nafion 0,5%
acido ascorbico	1:100	+2.3%	+ 2.4%	-	-
	1:50	+14%	+ 15%	+ 14.8%	-
	1:10	+90%	+88%	+98%	+22.6%
L-cisteina	1:100	+2.6%	+3%	-	
	1:50	+3.2%		-	
acido urico	1:10	-		-	
acido citrico	1:5	+3%	+3%	+6.6%	-
acetaminofene	1:50	+40%	+38%	+12%	+100%
fruttosio	1:5	-	-	-	-
saccarosio	1:5	-	-	-	-
metanolo	1:5	-	-	-	-
etanolo	1:5	-	-	-	-

- nessuna deviazione del responso

Tabella 9.1 Deviazioni percentuali del responso amperometrico per una concentrazione di glucosio pari a 5 mM, ottenute con i sistemi di stabilizzazione riportati, a diversi rapporti molari interferente:analita.

Il biosensore realizzato con l'idrogel a base di esacianoferrato di palladio presenta una buona abilità anti-interferente per le applicazioni nel campo della diagnostica clinica, in virtù della piccola deviazione percentuale del responso al glucosio causata dall'acetaminofene, rispetto agli altri sistemi di stabilizzazione e sulla base dei normali valori fisiologici di glucosio, acido ascorbico, acetaminofene e L-cisteina, che risultano essere pari a 5.6, 0.1, 0.2 e 0.08 mM, rispettivamente [1].

Per quanto riguarda le analisi alimentari presenta una scarsa selettività a causa dell'interferenza dovuta all'acido ascorbico; nei confronti di quest'ultimo interferente si sono osservati risultati simili a quelli ottenuti con i sistemi protettivi realizzati mediante reticolazione di BSA-GA e vapori saturi di GA.

9.2 APPLICAZIONE IN CAMPIONI REALI

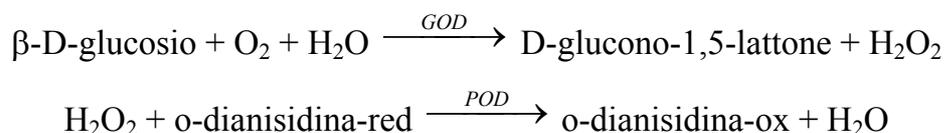
9.2.1 ANALISI DI BEVANDE

Per le analisi di bevande, i campioni sono stati diluiti di un fattore 100 con PBS, pH 7.0, ad eccezione dello sciroppo di ciliegia, che è stato diluito di un fattore 1000, a causa dell'alto contenuto di glucosio.

La determinazione della concentrazione di glucosio in bevande è stata effettuata sia direttamente mediante la curva di calibrazione, sia con il metodo delle aggiunte standard, utilizzando come biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA. È stato scelto tale elettrodo invece del biosensore realizzato con Nafion, in quanto l'utilizzo del Nafion, come sistema di stabilizzazione, pur minimizzando l'interferenza prodotta dalle specie anioniche, abbassa la sensibilità del biosensore e non garantisce un'efficiente stabilizzazione enzimatica. Pertanto, non è stato possibile ottenere risultati ripetibili e riproducibili con tale sistema.

Come metodo di riferimento è stata utilizzata una procedura colorimetrica standard.

Tale metodo spettrofotometrico, come già detto nel paragrafo 2.5, si basa sulla misura dell'assorbanza a 460 nm, risultante dall'ossidazione di o-dianisidina, mediante un sistema di accoppiamento della GOx con perossidasi [2]:



I risultati, ottenuti con il biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA, sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo spettrofotometrico e riportati in tabella 9.2 come valore medio di cinque replicati.

Come era prevedibile, per i campioni in cui AA è naturalmente presente o aggiunto intenzionalmente come antiossidante in quantità elevate, il responso ottenuto è più alto di quello osservato con il metodo indipendente.

metodi	Succo di albicocca	Succo di arancia	Sciroppo di ciliegia	Bevanda a lunga conservazione	Succo di pompelmo	Succo di limone
spettrofotometrico	5.2±0.2 ^a	21.6±0.4	239.6±0.5	19.8±0.2	12.3±0.3	11.2±0.4
aggiunte standard	5.22±0.03	28.8±0.4	252.2±0.4	36.0±0.4	16.2±0.4	11.7±0.4
curva di calibrazione	5.40±0.03	36.0±0.4	250.4±0.4	37.8±0.4	18.2±0.5	13.5±0.4

^a valore medio in g/L ± S.D., (n=5)

Tabella 9.2 Confronto tra i risultati, ottenuti con il biosensore Pt-(HT-GOx)-GA-BSA (sia mediante la curva di calibrazione, sia con il metodo delle aggiunte standard) e quelli misurati con il metodo di riferimento.

Le analisi dei campioni contenenti basse concentrazioni di acido ascorbico portano a valori in accordo con quelli ottenuti con il metodo spettrofotometrico standard; ad esempio per il succo di albicocca si è misurata una concentrazione di glucosio pari a $5.22 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ in accordo con $5.2 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$.

Inoltre, risultati leggermente migliori, rispetto alla determinazione diretta mediante la curva di calibrazione, sono stati ottenuti con il metodo delle aggiunte standard.

9.2.2 ANALISI DI SIERO BOVINO

Per l'analisi di siero bovino è stato scelto il biosensore con la miglior selettività nei confronti dei possibili interferenti in tale matrice e con la

miglior sensibilità; cioè il biosensore Pt-(HT-GOx)-idrogel di PdHCF, determinando la concentrazione di glucosio mediante la curva di calibrazione.

I campioni di siero bovino sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich con relativo certificato di analisi dell'Analytical Service, St.Louise, Missouri (USA).

I campioni analizzati con l'elettrodo Pt-(HT-GOx)-idrogel di PdHCF sono stati diluiti di un fattore 4 con PBS pH 7.0.

Il livello di glucosio del siero bovino, valutato con tale biosensore, è risultato perfettamente in accordo con quanto dichiarato dal certificato di analisi. Quest'ultimo riporta un valore di concentrazione di glucosio pari a 103 mg/dL, con il biosensore di nostra realizzazione è stata calcolata una concentrazione pari a 105 ± 4 mg/dL (n=4).

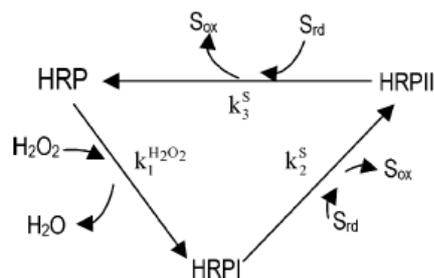
9.3 MIGLIORAMENTO DELLA SELETTIVITÀ TRAMITE LA PRE-OSSIDAZIONE DEGLI INTERFERENTI: BIOSENSORE BIENZIMATICO

Per migliorare ulteriormente la selettività del biosensore si è utilizzato un ulteriore enzima, che ossidi gli interferenti, eventualmente presenti in soluzione, prima che essi raggiungano la superficie elettrodica.

L'utilizzo di perossidasi da rafano (HRP) permette la selettiva pre-ossidazione dei possibili interferenti, come già descritto nel cap. 2:



L'HRP catalizza l'ossidazione di alcuni substrati organici con perossido di idrogeno, secondo il seguente schema di reazione:



Nello stato nativo della perossidasi il gruppo prostetico eme contiene Fe(III). Durante lo stadio di ossidazione, la HRP reagisce con perossido di idrogeno portando alla formazione di un intermedio solitamente noto come composto I e indicato con HRPI, nel quale lo stato di ossidazione formale del gruppo eme è 5+. Lo stadio di riduzione avviene ad opera del substrato S in due passaggi: prima, la HRPI è semiridotta a HRPII, in cui il ferro è nello stato formale di ossidazione 4+, poi si ha riduzione a HRP [1].

Il biosensore bienzimatico è stato realizzato introducendo l'HRP nell'idrogel di palladio e nel network realizzato con BSA e GA, seguendo la procedura descritta alla fine del paragrafo 2.4.

In tabella 9.3 vengono riportate le prestazioni dei biosensori ottenute in termini di sensibilità, tempo di risposta e intervallo di linearità.

L'intervallo di linearità risulta invariato in seguito all'introduzione del secondo enzima, mentre la diffusione dell'analita nella membrana risente della presenza di HRP e, di conseguenza, il tempo di risposta, definito come il tempo che intercorre dal momento in cui viene effettuata l'aggiunta di glucosio e il momento in cui il responso amperometrico si stabilizza a valori di corrente di stato stazionario, risulta di 5-10 secondi per i biosensori bi-enzimatici, leggermente superiore a quello riscontrato per i biosensori senza HRP (5-10 s).

La sensibilità, però, è inferiore in entrambi i sistemi di stabilizzazione in seguito all'introduzione di HRP, con una diminuzione più evidente per l'idrogel a base di esacianoferrato di palladio.

Sistema di stabilizzazione	Sensibilità (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	Tempo di risposta (s)	Intervallo di linearità (mM)
GA-BSA-HRP	3.9 ± 0.1	10	0.5-10
PdHCF-HRP	9.1 ± 0.1	10-15	0.5-10

Tabella 9.3 Prestazioni dei biosensori bi-enzimatici.

Per quanto concerne la selettività, il biosensore con la perossidasi non risente dell'interferenza di acido ascorbico fino ad una concentrazione pari a 0.5 mM e la deviazione percentuale del responso amperometrico è praticamente annullata quando il rapporto molare AA:glucosio è 1:50 e risulta -5.5 % se tale rapporto è 1:10.

Occorre fare presente che la deviazione percentuale del responso amperometrico per alte concentrazioni di interferente è un valore negativo, in quanto parte del perossido di idrogeno prodotto enzimaticamente invece di diffondere verso la superficie elettrodica ed essere rivelato per ossidazione elettrochimica viene sottratto dall'HRP per pre-ossidare l'interferente.

9.4 ANALISI IN MATRICI REALI

È stato effettuato un confronto tra i risultati ottenuti analizzando il contenuto di glucosio in bevande, utilizzando biosensori Pt-HT-GOx modificati con BSA+GA e idrogel a base di PdHCF, con e senza HRP, come sistema pre-ossidativo.

In tabella 9.4 si riportano i risultati ottenuti utilizzando il metodo diretto (curva di calibrazione) per due diversi succhi di frutta: uno ad alto contenuto di acido ascorbico (succo d'arancia) e l'altro a concentrazione di AA inferiore (succo di albicocca).

Campione	Succo di albicocca	Succo di arancia
Metodo spettrofotometrico	5.2 ± 0.2 ^a	21.6 ± 0.4
BSA+GA	5.40 ± 0.03	36.0 ± 0.4
BSA+GA+HRP	5.25 ± 0.05	17.3 ± 0.2
Pd idrogel	5.31 ± 0.05	37.3 ± 0.4
Pd idrogel+HRP	5.24 ± 0.05	20.2 ± 0.4

^avalore medio (g/L) ± S.D. (n=5)

Tabella 9.4

Come si può notare dalla tabella, l'uso di HRP aumenta considerevolmente la selettività del biosensore, portando a valori simili a quelli ottenuti con il metodo spettrofotometrico, anche per bevande come il succo di arancia.

Pertanto l'uso dell'idrogel a base di esacianoferrato di palladio, come membrana protettiva, permette la realizzazione di un biosensore con alta sensibilità, buona selettività e breve tempo di risposta. L'applicazione di tale biosensore per la determinazione di livelli di glucosio in campioni di siero bovino ha portato a risultati soddisfacenti, in accordo con i valori dichiarati nel certificato di analisi del prodotto.

L'uso di un enzima quale HRP, che ossida gli interferenti prima che raggiungano la superficie elettrodica, rende possibile l'applicazione di tale biosensore anche in campo alimentare.

Il bioelettrodo Pt-(HT-GOx)-PdHCF idrogel-HRP combina i vantaggi di una migliore biocompatibilità nei confronti dell'enzima con un efficiente effetto anti-interferente, da parte dello strato preossidativo di HRP.

BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Tang, J. Yao, S. Nie, G. Deng, Y. Kuang, *Anal. Biochem.* **331** (2004) 89.
- [2] J. Duley, R. Holmes, *Anal. Biochem.* **69** (1975) 164.
- [3] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Electroanalysis* **14** (2002) 627

CAPITOLO 10

OSSIDAZIONE DELL'HT Ni/Al-NO₃

Fino a questo punto si è descritto come l'HT sia una matrice di supporto enzimatico ideale nella fabbricazione di biosensori per le interessanti proprietà che la caratterizzano e la rendono particolarmente adatta a garantire un'attività enzimatica elevata e stabile.

In questo capitolo si propone una funzione innovativa per l'idrotalcite HT Ni/Al-NO₃ e cioè, come sistema anti-interferente, oltre che come matrice di immobilizzazione enzimatica nello sviluppo di un biosensore amperometrico per la determinazione di glucosio.

Nei capitoli precedenti si è descritto come i biosensori basati sulla rivelazione di perossido di idrogeno possano essere utilizzati per la determinazione di glucosio in bevande, cercando di limitare l'interferenza dell'acido ascorbico con l'applicazione di membrane pre-ossidative, che ne migliorano la selettività, ma non risolvono completamente il problema quando si analizzano campioni ad alto contenuto di AA. Invece, introducendo un secondo enzima, in grado di ossidare gli interferenti prima che raggiungano la superficie elettrodica, si è osservata una diminuzione della sensibilità dei biosensori.

In questo capitolo viene descritta come l'interferenza dovuta a specie cariche negativamente quali l'ascorbato, possa essere eliminata utilizzando come sistema di immobilizzazione enzimatica una HT in cui il nichel abbia subito un trattamento ossidativo in opportune condizioni.

10.1 PREPARAZIONE DEGLI ELETTRODI MODIFICATI CON HT E HT OSSIDATA

Il film sottile di HT Ni/Al-NO₃ è stato depositato sulla superficie di Pt con il metodo potenziostatico già descritto precedentemente, operando a - 0.9 V per 30 s, mediante la riduzione della soluzione contenente 0.0225 M Ni(NO₃)₂, 0.0075 M Al(NO₃)₃ e 0.3 M KNO₃. In tal modo si è ottenuto l'elettrodo modificato Pt-HT.

L'HT così depositata è stata, poi, ossidata potenziostaticamente a + 1.4 V per 100 s in una soluzione di LiClO₄ (0.1 M) contenente NaOH 10⁻³ M, sotto flusso di azoto. Tale trattamento ossidativo induce una modificazione del film, che diventa nero; tale elettrodo è stato indicato con la sigla Pt-HTox.

La scelta del valore di potenziale anodico e della durata dell'applicazione per ottenere l'ossidazione del Ni dell'HT è stata effettuata sulla base di un studio eseguito da Villemure e altri [1].

Nel loro lavoro, gli autori dimostrarono che quando un film di HT Ni/Al-NO₃ è sottoposto ad una ossidazione elettrochimica lo stato di ossidazione risultante del nichel è determinato dal potenziale applicato, mentre la durata del trattamento ossidativo influenza il numero di centri di nichel ossidati. Gli autori conclusero che l'applicazione di un potenziale pari a +1.4 V vs SCE per un tempo di 100 s permetteva l'ossidazione dei centri di nichel ad un valore medio di +4.02, e garantiva il parziale mantenimento di tale stato di ossidazione, anche se il film depositato veniva sottoposto ad un trattamento fortemente riducente, quale l'applicazione di un potenziale pari a +0.0 V per un tempo di 6000 s.

10.2 CONFRONTO DEI SENSORI MODIFICATI CON HT E HT OSSIDATA

Gli elettrodi modificati con HT prima e dopo l'ossidazione elettrochimica sono stati caratterizzati mediante spettroscopia di impedenza in soluzioni di Fe(CN)₆^{3-/4-} o Ru(NH₃)₆^{3+/4+} alla

concentrazione 5 mM. I potenziali applicati corrispondono ai potenziali formali dei due sistemi studiati e cioè + 0.17 V, quando si utilizza Fe(CN)₆^{3-/4-}, e - 0.22 V, con Ru(NH₃)₆^{3+/4+}. In entrambi i casi si è utilizzata una soluzione di KCl (0.1 M) come elettrolita di supporto e si è studiato l'intervallo di frequenza 100mHz-10kHz. In figura 10.1 vengono riportati i grafici di Nyquist relativi agli elettrodi di Pt modificati con HT prima e dopo il trattamento ossidativo.

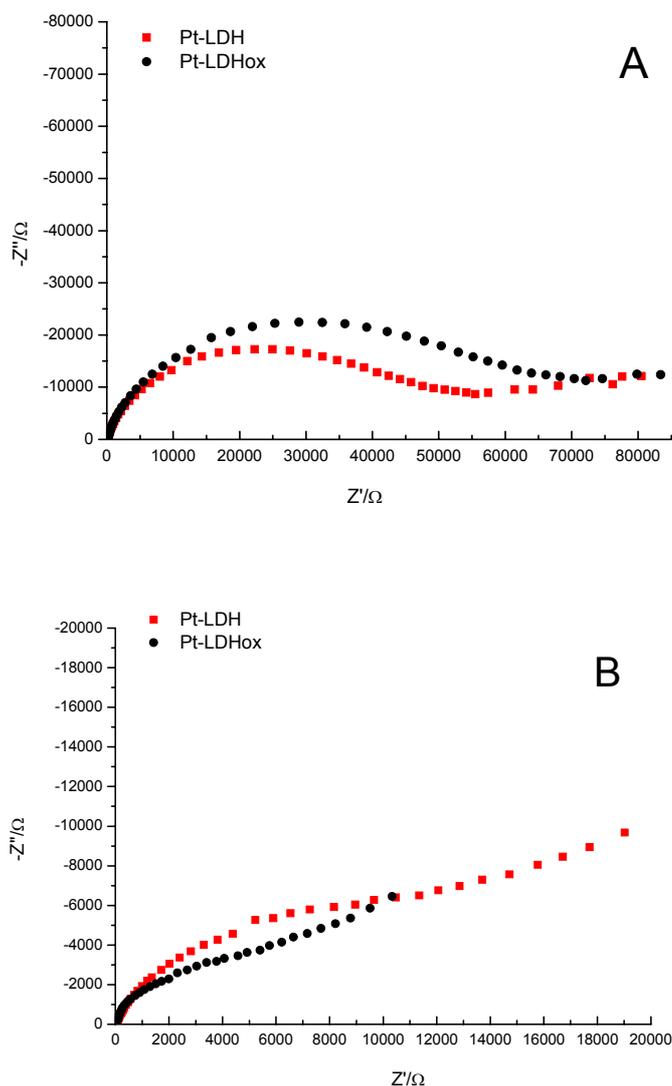


Figura 10.1. Grafici di Nyquist ottenuti con elettrodi Pt-HT e Pt-HTox, registrate in KCl (0.1 M), usando il sistema redox Fe(CN)₆^{3-/4-} nella figura (A) e Ru(NH₃)₆^{3+/4+} nella figura (B). E applicato = + 0.17 V con Fe(CN)₆^{3-/4-} e E applicato = - 0.22 V con Ru(NH₃)₆^{3+/4+}. Intervallo di frequenza = 100mHz-10kHz.

Dai grafici di Nyquist si può notare che il valore di R_{ct} aumenta da $4.01E04 \Omega$ a $8.21E04 \Omega$, in seguito all'ossidazione elettrochimica dell'HT, se si utilizza un sistema redox "sonda" carico negativamente ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$). Invece, quando si utilizza un sistema redox carico positivamente, il valore R_{ct} diminuisce da $1.98E04 \Omega$ a $6.50E03 \Omega$.

Questi risultati indicano la formazione di una carica negativa all'interfaccia film/soluzione. Le misure di impedenza sul film di HT ossidato, ripetute nell'arco di quattro ore, hanno fornito spettri sovrapponibili a conferma della stabilità del trattamento ossidativo, nonostante si sia applicato un potenziale catodico, polarizzando l'elettrodo a $E = -0.22 V$ con il sistema redox $Ru(NH_3)_6^{3+/4+}$; questo risultato è in accordo con le conclusioni tratte da Villemure [1].

Preliminarmente è stato valutato il responso degli elettrodi modificati con i film di HT e HTox mediante CV, nei confronti di possibili specie anioniche facilmente elettrossidabili, al fine di valutarne l'efficacia come sistema anti-interferente.

In figura 10.2 si riportano i CV ottenuti in PBS, sia in presenza che in assenza di AA: quando si utilizza l'elettrodo di Pt modificato con l'HT ossidata non si osserva alcuna differenza nei segnali voltammetrici, mentre quando l'HT è in forma ridotta si ottiene un significativo aumento della corrente anodica ($E > 0.2 V$) in seguito all'aggiunta di AA. Risultati simili sono stati osservati anche per altre specie, quali urato e citrato.

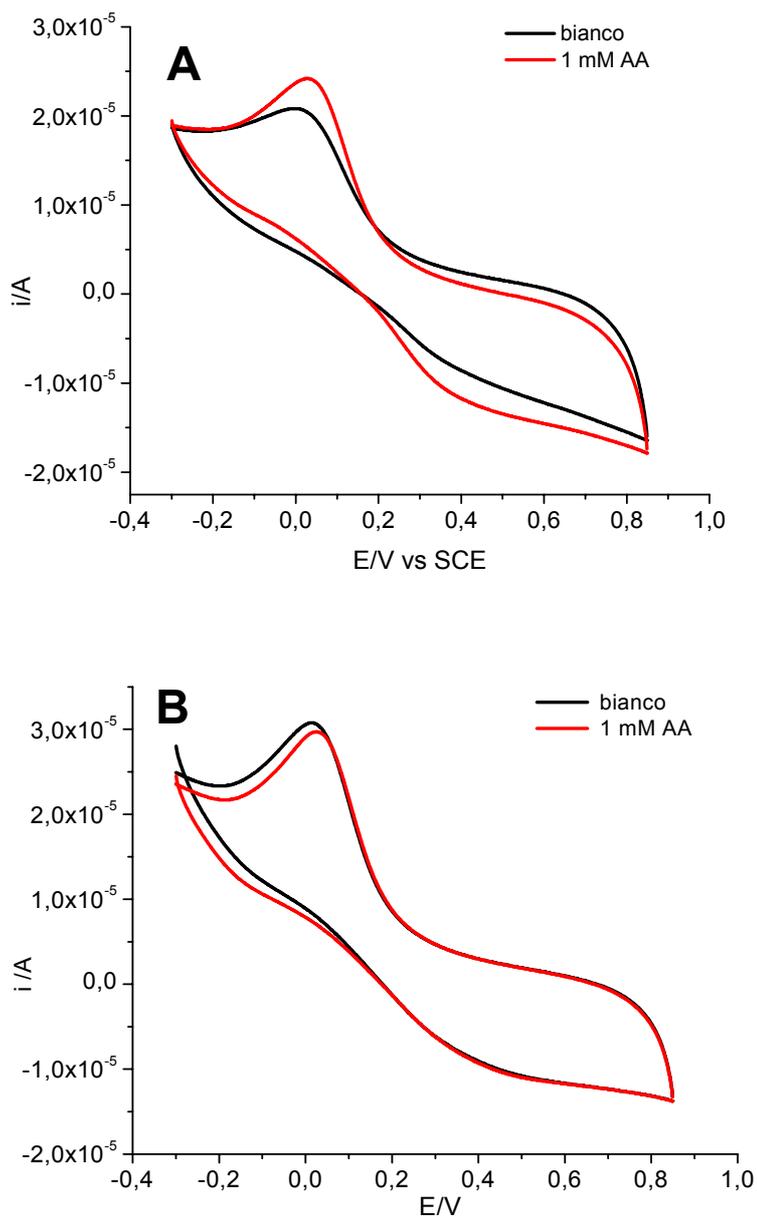


Figura 10.2 CV ottenuti in PBS in assenza e in presenza di AA 1 mM, A) ad un elettrodo modificato Pt-HT; b) ad un elettrodo Pt-HTox; velocità di scansione del potenziale = 0.05 Vs⁻¹.

Prendendo in considerazione i responsi voltammetrici osservati e in base alle misure di impedenza eseguite con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ o $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/4+}$, come sistemi redox, si può ipotizzare che quando il nichel dell'HT è ossidato, all'interfaccia elettrodo/soluzione si instauri una carica negativa, dovuta all'adsorbimento degli anioni presenti in soluzione. In tal modo si crea una barriera diffusoriale nei confronti degli anioni interferenti, che non

riescono a raggiungere la superficie di Pt nei tempi di svolgimento dell'esperimento.

10.3 BIOSENSORI Pt-HT_{ox}+GO_x E Pt-HT+GO_x

Con lo scopo di valutare l'effettiva capacità anti-interferente del film di HT ossidato sono stati preparati biosensori modificando superfici di Pt sia con HT e GO_x, che con HT ossidata e GO_x.

La soluzione enzimatica utilizzata per la fabbricazione dei biosensori è stata ottenuta ponendo 40 mg di albumina di siero bovino (BSA) e 10 mg di enzima GO_x in 1 mL di PBS (pH 7.0). Tale soluzione viene mantenuta in un bagno termostato a 25°C per 1 ora, prima del suo utilizzo al fine di ripristinare l'attività enzimatica.

Successivamente si sono mescolati 30 µL di questa sospensione con 10 µL di glutaraldeide GA (2.5% w/w) [2]; e 10 µL della soluzione risultante sono stati depositati sul film asciutto di HT e HT_{ox}, ottenendo i biosensori Pt-HT+GO_x o Pt-HT_{ox}+GO_x.

I biosensori sono stati asciugati a temperatura ambiente (per almeno 1 ora) e poi sono conservati a 4°C in PBS.

In figura 10.3 si riporta il confronto tra un responso cronoamperometrico registrato ad un elettrodo Pt-HT_{ox}+GO_x e quello ottenuto ad un biosensore Pt-HT+GO_x. A tal fine sono state effettuate aggiunte successive di acido ascorbico (1 mM) ad una soluzione di PBS contenente glucosio 5 mM. È possibile osservare un incremento di corrente simile a quello registrato per l'analita per l'HT dove il nichel è in forma ridotta, mentre se l'HT è ossidata non si evidenzia praticamente alcun effetto alle aggiunte di interferente.

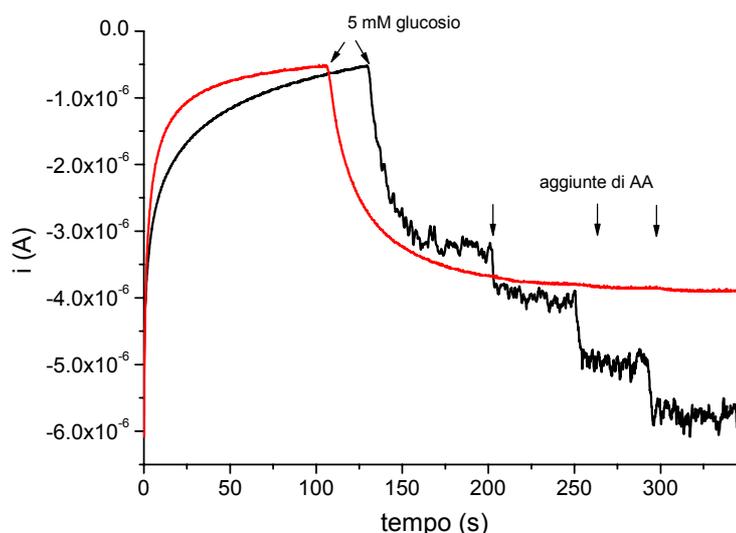


Figura 10.3. Risposti cronoamperometrici ottenuti in PBS con gli elettrodi Pt-HT-GOx (curva nera) e Pt-HTox-GOx (curva rossa) a $E=0.50$ V vs SCE.

Sulla base di questi risultati, si è deciso di utilizzare i biosensori dove l'HT è presente in forma ossidata per l'analisi di bevande ad alto contenuto in acido ascorbico.

Si sono considerate tre differenti bevande dove AA era stato aggiunto come antiossidante.

In tabella 10.1 sono riportati i risultati ottenuti con entrambi i biosensori Pt-HT-GOx e Pt-HTox-GOx e, per confronto, i valori di glucosio dichiarati sull'etichetta e la concentrazione calcolata con il metodo spettrofotometrico indipendente già descritto nel precedente capitolo [3].

	bevanda 1	bevanda 2	bevanda 3
Pt-HTox-GOx	9.73±0.06 ^a	9.23±0.07	7.81±0.09
Pt-HT-GOx	12.25±0.09	12.93±0.07	10.40±0.08
Valore etichetta	9.5	9.5	8
Metodo spettrofotometrico	9.7±0.1	9.3±0.1	7.9±0.1

^a valore medio (g/L) ± SD (n = 3)

Tabella 10.1 Determinazione di glucosio (g/L) in tre campioni reali

I valori ottenuti utilizzando l'elettrodo Pt-HTox sono in accordo con quanto dichiarato dalla ditta produttrice e con i valori che derivano dall'impiego del metodo spettrofotometrico, utilizzato come riferimento. Questo risultato conferma le proprietà anti-interferenti dell'HT in forma ossidata nei confronti di specie anioniche quali l'ascorbato.

Dalla tabella 10.1 è evidente che l'impiego del sensore Pt-HTox-GOx consente di ottenere valori di glucosio non solo accurati, ma anche precisi, anche in soluzioni contenenti elevate concentrazioni di AA, a differenza del sensore Pt-HT-GOx che conduce, invece, a risultati accurati solamente se tale interferente è presente in un rapporto molare basso rispetto al glucosio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Qiu, G. Villemure, *J. Electroanal. Chem.* **395** (1995) 159.
- [2] M. E. Ghica, C. Brett, *Anal. Chim. Acta* **532** (2005) 145.
- [3] J. Duley and R. Holmes, *Anal. Biochem.* **69** (1975) 164.

CAPITOLO 11

CONCLUSIONI

In questo lavoro di ricerca, si è studiata la modificazione di elettrodi di Pt per lo sviluppo di biosensori amperometrici per la determinazione del glucosio, immobilizzando l'enzima glucosio ossidasi (GOx) su un materiale inorganico poroso appartenente alla famiglia delle idrotalciti sintetiche HT, mediante precipitazione condotta per via potenziostatica.

La matrice studiata come supporto per l'enzima GOx è un'argilla anionica, a base di Ni e Al e contenente nitrato, come anione interstrato (Ni/Al-NO₃), che crea un ambiente biocompatibile per la biomolecola e consente di aumentare l'idrofilia superficiale del Pt, migliorando il problema dell'instabilità del segnale dovuto all'ossigeno liberato. Infatti quando un biosensore basato su un'ossidasi opera in presenza di ossigeno, uno dei prodotti della reazione enzimatica è il H₂O₂, che se viene rivelato per via amperometrica in ossidazione porta alla formazione di bolle di ossigeno che possono adsorbirsi sulla superficie elettrodica e causare l'instabilità del segnale.

Si è studiata la morfologia superficiale, la composizione della HT e l'interazione enzima – HT con tecniche di analisi di superficie, quali AFM, SEM, SECM.

Si è notata una distribuzione disomogenea dell'attività di GOx sui film di HT e che, nella fase di elettrodeposizione, il nichel interagisce con i siti amminoacidici della GOx e la biomolecola si localizza particolarmente nei

punti della superficie elettrodica in cui il nichel si rende disponibile per la precipitazione di una vera fase idrotalcitica.

Poiché l'elettrosintesi dell'HT è influenzata da moltissimi parametri sperimentali, ulteriormente incrementati dal fatto che il materiale deve funzionare come sistema di intrappolamento dell'enzima, si è pensato di utilizzare tecniche di experimental design (ED) per decidere il numero di esperimenti da effettuare, al fine di stabilire i parametri principali da cui dipendono le prestazioni del biosensore.

In precedenza era stato condotto uno studio esaustivo, di tipo monovariato, per definire le condizioni ottimali di risposta al glucosio del biosensore, sia in termini di sensibilità che di stabilità temporale, utilizzando anche una membrana di stabilizzazione, comune nei biosensori enzimatici, che sfrutta la reticolazione tra albumina di siero bovino e glutaraldeide (BSA + GA). In particolare, si era studiato l'effetto della durata dell'elettrosintesi, della quantità di enzima in soluzione, del pH, della temperatura e del potenziale di lavoro sulle prestazioni del biosensore.

Sulla base di tali informazioni e considerando che per effettuare un esperimento sono necessari circa due giorni, si è deciso di considerare il numero minore di fattori e di livelli per la pianificazione dell'ED. Come miglior compromesso tra qualità dell'informazione e lavoro sperimentale è stato scelto un disegno fattoriale intero a 2 fattori e 3 livelli.

I parametri principali sono la concentrazione dell'enzima e l'interazione tra la concentrazione enzimatica e il rapporto molare Ni/Al.

Poiché i biosensori messi a punto, pur operando nelle condizioni ottimali, risentono delle interferenze dovute alle specie facilmente elettrossidabili, presenti nelle matrici reali, quali l'ascorbato, è stato condotto uno studio per valutare l'efficienza di diverse membrane applicate sull'elettrodo modificato Pt-HT-GOx, al fine di migliorarne la selettività e la stabilità.

Si è rivolta particolare attenzione a membrane di stabilizzazione innovative, a base di idrogel di esacianoferrato di palladio (PdHCF) o di TiO₂,

confrontando le prestazioni del biosensore, studiate in cronoamperometria, con quelle ottenute con membrane più classiche (vapori di GA, Nafion, GA-BSA).

Il biosensore Pt-HT-GOx-PdHCF ha presentato una sensibilità più elevata rispetto agli altri sistemi di stabilizzazione ($36.5 \pm 0.2 \text{ mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ contro $7.7 \pm 0.1 \text{ mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ per GA-BSA) attribuibile a una maggiore biocompatibilità con l'idrogel a base di PdHCF. Inoltre, la selettività è risultata sufficientemente idonea per la determinazione del glucosio in campioni di siero bovino. Infatti i risultati hanno portato a valori in accordo con quelli del certificato di analisi ($105 \pm 4 \text{ mg/dL}$ (n=4) contro il valore certificato di 103 mg/dL).

Se la membrana di PdHCF contiene anche un enzima quale la perossidasi da rafano, che è in grado di pre-ossidare gli interferenti prima che raggiungano la superficie elettrodica, il biosensore può essere impiegato anche per analisi di bevande contenenti acido ascorbico, con risultati soddisfacenti.

Inoltre abbiamo realizzato un altro innovativo biosensore in cui il film di HT è stato preventivamente ossidato (Pt-HTox-GOx), che ci ha portato a concludere che, in tal caso, il materiale inorganico può operare anche come sistema anti-interferente nei confronti dell'acido ascorbico.

Si è osservato, in particolare, che l'interferenza dovuta a specie cariche negativamente, quali urato, ascorbato, citrato, può essere completamente soppressa se l'ossidazione dell'HT viene eseguita ad un potenziale di 1.4 V vs. SCE per un tempo di 100 s .

Tale risultato è molto promettente e potrebbe essere il punto di partenza per ulteriori applicazioni nel campo dei biosensori amperometrici, estendendo lo studio anche ad altri enzimi.

APPENDICE

TECNICHE ELETTROCHIMICHE UTILIZZATE

In questa appendice verranno esposti i principi teorici alla base delle tecniche elettrochimiche utilizzate per la caratterizzazione e l'utilizzo dei biosensori studiati.

Nella trattazione seguente si farà riferimento alla generica reazione di riduzione:



e si ipotizzerà che all'inizio solamente la specie O sia presente in soluzione.

Cronoamperometria

Fra tutte le esperienze elettrochimiche la più semplice è quella che consiste nella registrazione della corrente nel tempo a seguito del conferimento all'elettrodo di un potenziale opportuno con una forma d'onda E(t) a step in una soluzione non agitata.

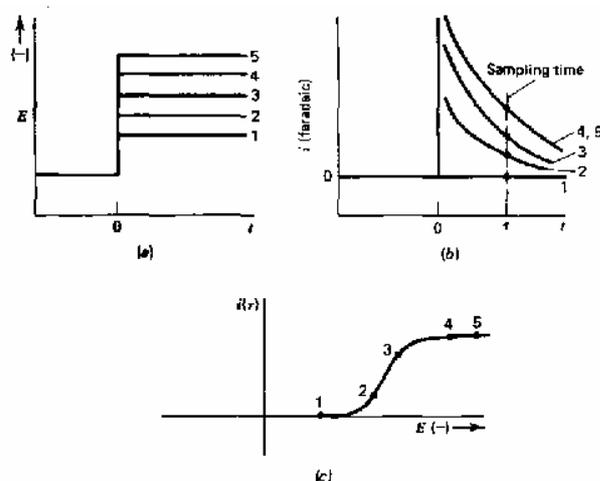


Figura A.1:
a) forme d'onda a step;
b) curve i/t per i
corrispondenti E
applicati;
c) voltammogramma a
corrente campionata

Voltammetria ciclica

Tecnica voltammetrica in cui un piccolo elettrodo stazionario, immerso in una soluzione non agitata, è polarizzato, con una forma d'onda $E(t)$ di tipo triangolo isoscele:

$E(t) = E_i \pm 2Vt_\lambda \pm Vt$ (t_λ : tempo a cui si inverte la scansione del potenziale; ($E(t)$ = potenziale conferito all'elettrodo al tempo t ; E_i = potenziale iniziale; $V = dE/dt$ velocità di scansione).

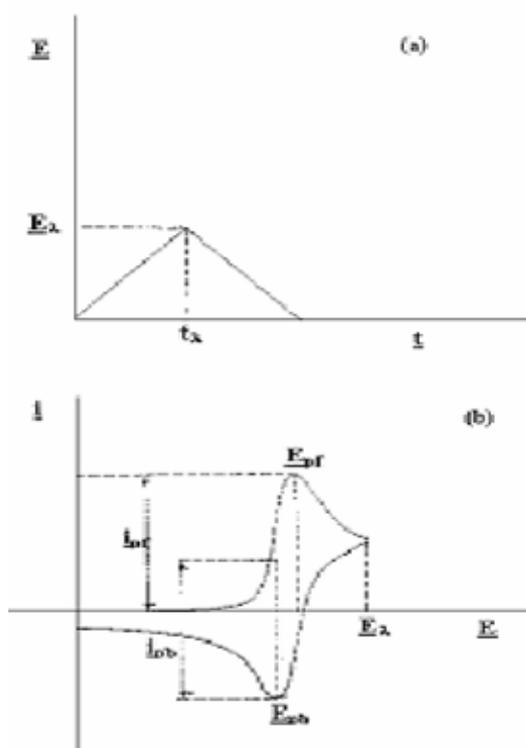


Figura A.2
 Tipico segnale di eccitazione in CV (a) e relativo voltammogramma (b): ottenibile per es. ad un elettrodo di Pt per una soluzione di $K_3Fe(CN)_6$ come specie elettroattiva in 1 M KNO_3 acquoso. Scansione da 0.8 V vs SCE in catodica a 50 mV/s . Potenziale di inversione -0.15 V

A.1 Cronoamperometria e cronocolumbometria

Consideriamo la reazione elettrodica descritta dall'equazione (1).

In una cronoamperometria o in una cronocolumbometria viene applicato all'elettrodo un potenziale opportuno con una forma d'onda $E(t)$ a step in una soluzione non agitata (figura A.3).

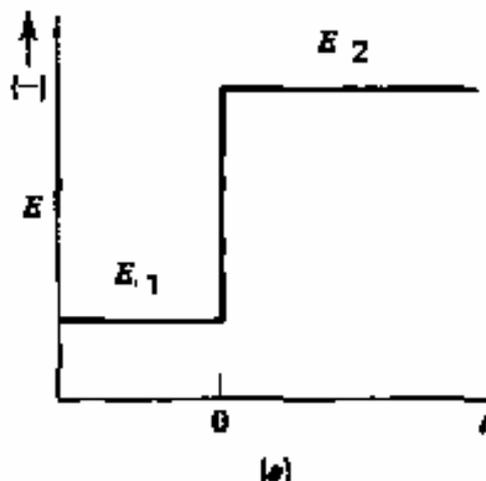


Figura A.3
Andamento del potenziale applicato all'elettrodo lavorante in una cronoamperometria o in una cronocolumbometria

Il potenziale E_1 viene scelto in modo tale che nessuna reazione possa avvenire all'elettrodo, mentre E_2 è il potenziale al quale avviene la reazione riportata nell'equazione (1).

Prima di applicare lo step di potenziale il profilo di concentrazione risulta piatto ($dc/dx = 0$) e non vi è passaggio di corrente.

Dopo l'applicazione dello step di potenziale ($t > 0$):

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

Esisteranno potenziali applicati come E_1 per cui non decorre nessun processo faradico e potenziali così catodici per cui la riduzione è così veloce che $C_o(x=0)$ tende a zero.

Siamo in condizioni di controllo da trasporto di materia. Il flusso di O all'elettrodo e quindi la densità di corrente è proporzionale al gradiente di concentrazione alla superficie dell'elettrodo.

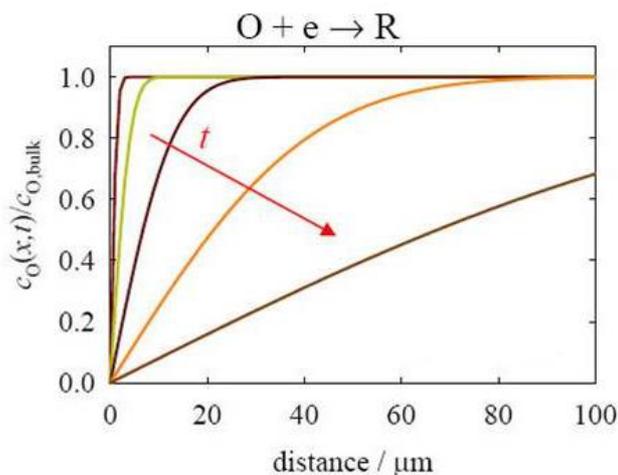


Figura A.4
Profili di concentrazione ottenuti a diversi tempi in condizione di diffusione limite.

Dall'integrazione della II^a legge di Fick:

$$D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t}$$

con le opportune condizioni al contorno nel caso di diffusione lineare semi-infinita ad un elettrodo piano:

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

$$t > 0; c(0,t) = 0$$

si ottiene l'andamento della corrente nel tempo:

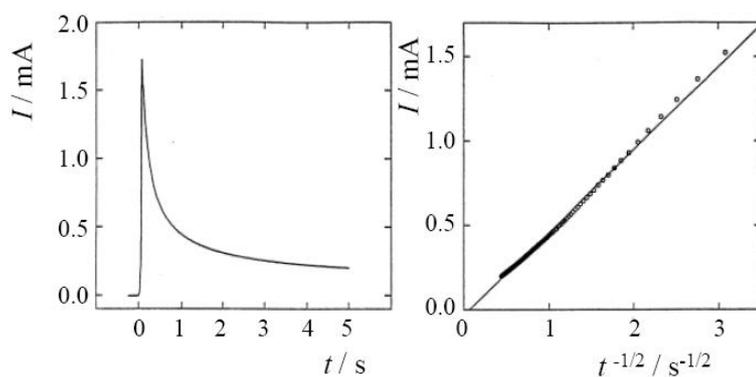


Figura A.5
Esempio di responso ottenuto at un elettrodo di Pt in tampone fosfato pH 6 in presenza di ferrocene 8.25 mM. Step di potenziale: da 0.0 V a +0.4 V vs SCE

espresso dall'equazione di Cottrell, in termini di densità di corrente:

$$|j| = \frac{nFD^{1/2}c_{\text{bulk}}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (2)$$

L'integrazione dell'equazione di Cottrell fornisce l'espressione dell'andamento della quantità di carica nel tempo, osservato in cronocolumbometria.

A.2 Voltammetria a Scansione Lineare del Potenziale(LSV), Voltammetria Ciclica(CV)

La voltammetria a scansione lineare del potenziale e l'associata voltammetria ciclica sono due tecniche voltammetriche in cui un piccolo elettrodo stazionario, immerso in una soluzione non agitata, è polarizzato, con una forma d'onda E/t lineare nel tempo con pendenza dE/dt (velocità di scansione) variabile da alcune decine di mV al secondo a diverse migliaia di Volt al secondo.

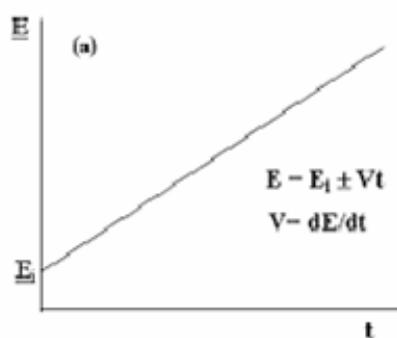


Figura A.6
Andamento del potenziale applicato, variabile nel tempo con la legge $E(t) = E_i \pm Vt$; dove $E(t)$ è il potenziale conferito all'elettrodo al tempo t ; E_i è il potenziale iniziale, V è la velocità di scansione.

La registrazione della corrente nel tempo, ovvero ai diversi potenziali assunti dall'elettrodo, dà origine alla così detta voltammetria a scansione veloce del potenziale (Linear sweep) caratterizzata da curve di risposta i/E a picco.

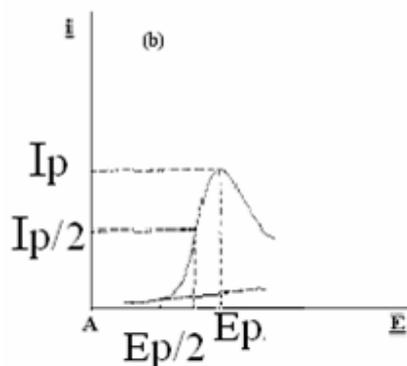


Figura A.7
Curva voltammetrica i/E ottenuta in una voltammetria a scansione lineare del potenziale.
Parametri caratteristici:
 I_p , E_p , $I_p/2$, $E_p/2$

L'aspetto più singolare della curva voltammetrica i/E così ottenuta è che essa non presenta una corrente limite, indipendente dal potenziale applicato, ma raggiunto un massimo, i di picco, decresce continuamente. La spiegazione si ha considerando le condizioni con cui si attua il trasporto di materia, in particolare l'andamento dei profili di concentrazione nel tempo. In fig. A.8 sono riportati i profili di concentrazione che si sviluppano al variare del tempo, ovvero al variare del potenziale applicato, da un valore per cui non ha luogo il processo elettrochimico e quindi $C_o(0)/C_o(\infty) = 1$ a valori per cui $C_o(0)/C_o(\infty) = 0$.

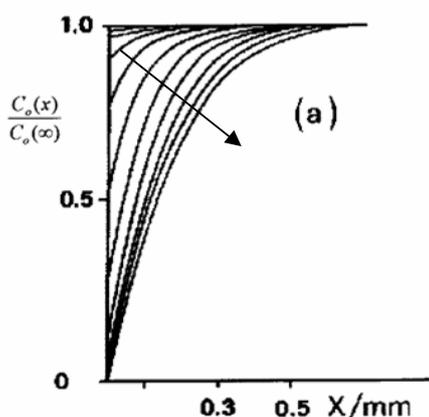


Figura A.8
Profili di concentrazione variabili nel tempo in voltammetria a scansione del potenziale

Alcune peculiarità di questi profili sono particolarmente significative: al progredire del tempo, cioè all'aumentare della polarizzazione, i profili si abbassano e nel frattempo si espandono verso zone progressivamente più lontane dall'elettrodo.

Questo movimento è dovuto, da un lato, all'incremento della velocità di consumo di specie elettroattiva alla superficie elettrodica, dall'altro, all'espansione dello strato di diffusione, e comporta che i gradienti di concentrazione alla superficie dell'elettrodo abbiano un andamento a massimo. Poiché:

$$q(0,t) = D \frac{\delta C(0,t)}{\delta x}$$

$$i(t) = nFA \cdot q(0,t)$$

Ne risulta che la corrente deve avere un andamento a massimo.

La corrente di picco, per un processo reversibile, in caso di diffusione lineare semi-infinita risulta essere:

$$i_p = 0.4463 nFA \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} D^{1/2} V^{1/2} C_o \quad (3)$$

Dove A è misurato in cm^2 , D in cm^2s^{-1} , C_o in mole cm^{-3} e V è la velocità di scansione del potenziale in Vs^{-1} .

Nella voltammetria ciclica la funzione $E(t)$ è di tipo triangolare isoscele,

$E(t) = E_i \pm 2Vt_{\lambda} \pm Vt$ (t_{λ} : tempo a cui si inverte la scansione del potenziale): l'elettrodo assume in due momenti distinti lo stesso potenziale, una volta durante la sequenza diretta (per es. catodica) ed un'altra volta nella sequenza inversa (anodica).

Associato al picco di andata è presente un picco di ritorno, dovuto alla presenza, vicino alla superficie elettrodica, della specie generata elettrochimicamente nel processo di andata e suscettibile, a sua volta, della reazione redox inversa se il processo elettrochimico è di natura reversibile. Poiché la presenza del picco di ritorno nasce dalla reversibilità della reazione elettrochimica, ne consegue che diversi gradi di reversibilità sono evidenziati da forme diverse di curve voltammetriche, tutte caratterizzate dalla presenza dei due picchi. Per un processo reversibile, il rapporto tra la corrente di picco anodica e quella catodica è pari a 1 ed i valori dei potenziali di picco sono distaccati di $57/n$ mV. All'aumentare del grado di irreversibilità del processo i picchi assumono una forma più distesa e la loro separazione aumenta. Nel caso limite di un processo completamente irreversibile non si osserva il picco di ritorno.

A.3 Elettrodo a disco rotante (RDE) [1]

Uno tra i metodi più efficaci per aumentare la velocità del trasporto di massa ad un elettrodo è basato sul suo movimento controllato; in tali condizioni, il trasporto di massa è convettivo. In particolare, un trasporto molto riproducibile è ottenuto con un elettrodo a disco rotante (RDE) (Figura A.9). L'aspetto più interessante di un RDE è che esso funge da

“superficie uniformemente accessibile”, in altre parole la velocità del trasporto di massa è uniforme. Inoltre, un'altra proprietà importante è data dal flusso laminare di soluzione circostante l'elettrodo, ottenibile anche per velocità di rotazione piuttosto elevate. Il flusso si definisce laminare quando il fluido si muove senza provocare mescolamenti di strati o elementi di fluido.

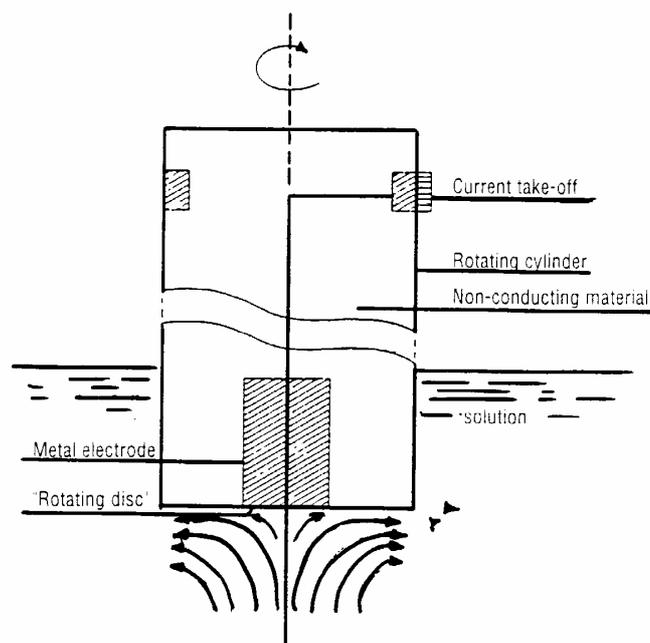


Figura A.9: Costruzione schematica di un elettrodo a disco rotante (RDE) e del flusso radiale di liquido durante la rotazione.

Il movimento dell'elettrodo a disco rotante ha un effetto sul trasporto di massa nella direzione perpendicolare al piano dello stesso perché il disco trascina verso di sé la soluzione più vicina e le impartisce un movimento nella direzione tangenziale. La soluzione è allontanata lateralmente dalla superficie, in un piano parallelo, ed è sostituita dal liquido che si muove dal centro della soluzione nella direzione perpendicolare alla superficie. In pratica, la superficie del disco ruotando agisce come una pompa, risucchiando il liquido verso di sé, come mostrato schematicamente in Figura A.10.

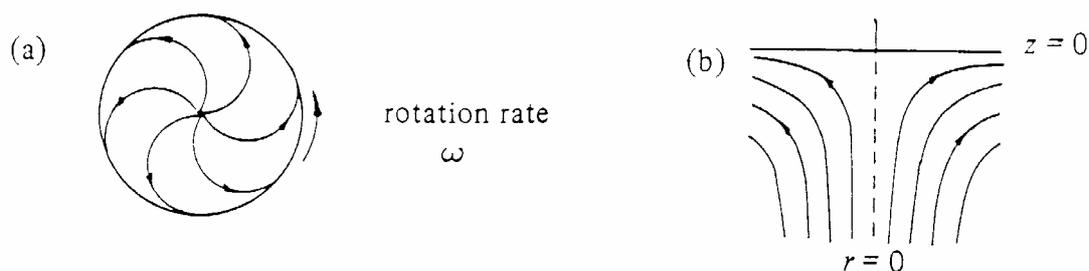


Figura A.10: Rappresentazione schematica del movimento di liquido in prossimità di un elettrodo a disco rotante (RDE). (a) Veduta dal basso; (b) veduta laterale in cui è mostrato come la soluzione risulta essere risucchiata verso il disco e si allontana parallelamente al piano del disco.

La maggior parte degli RDE sono predisposti per operare ad una velocità massima di 1×10^4 giri/min ($\approx 1 \times 10^3$ rad/s, ben all'interno del regime di flusso laminare). Per velocità di rotazione superiori, infatti, il moto della soluzione in prossimità della superficie elettrodica non è più laminare ma turbolento. Di conseguenza, esiste un limite superiore alla velocità di rotazione impiegata, che dipende da alcuni fattori sperimentali come, ad esempio, l'eccentricità del supporto dell'elettrodo durante la rotazione. Oltre ad un limite superiore, ne esiste uno inferiore determinato dalla necessità che la convezione forzata prevalga sulla diffusione e sulla convezione naturale. Negli esperimenti di laboratorio l'intervallo di velocità di rotazione generalmente utilizzato è: 100-6000 giri /min.

Per una reazione reversibile, controllata dalla diffusione della specie elettroattiva verso la superficie elettrodica, se si esegue una voltammetria ciclica con un RDE si ottiene un voltammogramma di forma sigmoidale, tipico di un processo di stato stazionario. Questo comportamento si può comprendere esaminando i profili di concentrazione, riportati in Figura A.11; in particolare, per un RDE non si verifica l'allargamento dello strato di diffusione, che è determinato solo dalla velocità di rotazione dell'elettrodo, e questo fa sì che la corrente raggiunga un valore limite e costante.

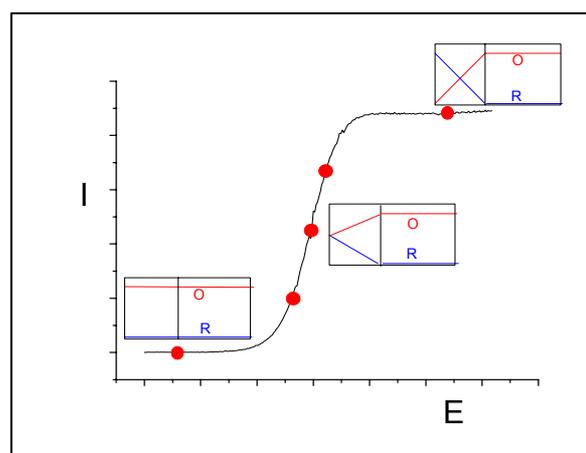


Figura A.11: Voltammogramma ciclico registrato con un RDE e rappresentazione schematica dei profili di concentrazione nei punti indicati.

All'aumentare della velocità di rotazione dell'elettrodo lo spessore dello strato di diffusione diminuisce; questo causa l'aumento del gradiente di concentrazione della specie elettroattiva e, di conseguenza, del valore della corrente limite (Figura A.12).

In condizioni di flusso laminare è possibile calcolare in maniera rigorosa la velocità del trasporto di massa. L'equazione sviluppata da Levich per la corrente limite (i_l) è:

$$i_l = 0.62 n F A D^{2/3} V^{-1/6} \omega^{1/2} C_o \quad (4)$$

Dove D è il coefficiente di diffusione della specie che in soluzione si trova alla concentrazione C_o , A l'area geometrica dell'elettrodo, F la costante di Faraday, V la velocità di scansione del potenziale in Vs^{-1} e ω la velocità angolare espressa in radianti per secondo.

L'elettrodo a disco rotante è utile sia per eseguire misure elettroanalitiche che per determinare i coefficienti di diffusione di specie elettroattive in soluzione.

Diversi sono i vantaggi dell'uso dell'elettrodo a disco rotante in confronto con altre tecniche elettrochimiche: voltammetria ciclica, metodi ad impulso ed in corrente alternata, ecc. La velocità del trasporto

di massa, infatti, può essere variata in modo controllato senza ricorrere al potenziale elettrodico, il quale porterebbe inevitabilmente ad un ulteriore caricamento del doppio strato. L'equazione di Levich fornisce un eccellente test per verificare se la corrente è interamente controllata dal trasporto di massa (Figura A.12). Riportando in grafico le densità di corrente limite in funzione di $\omega^{1/2}$ si dovrebbe ottenere un andamento lineare passante per l'origine; se la concentrazione della specie elettroattiva è nota, è possibile stimare, dalla pendenza della retta, il coefficiente di diffusione di una specie elettroattiva.

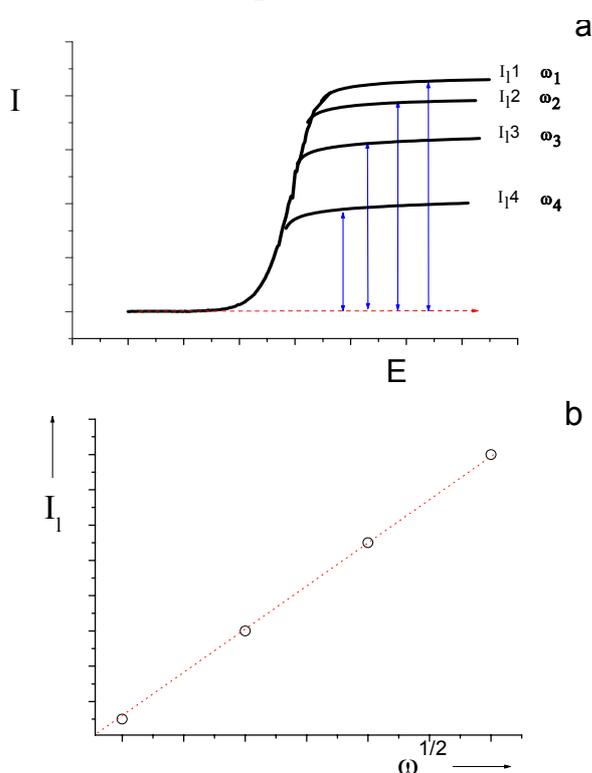


Figura A.12: (a) Variazione della corrente limite con il potenziale a differenti valori di ω ($\omega_1 < \omega_2 < \omega_3 < \omega_4$); (b) andamento della corrente limite in funzione di $\omega^{1/2}$.

Quanto detto fino a questo punto, vale in condizioni di trasferimento elettronico veloce. In condizioni di controllo misto, le densità di corrente controllate dalla cinetica e dal trasporto di massa si combinano e si ottiene la seguente equazione:

$$1/j = 1/j_{cc} + 1/j_l \quad (5)$$

dove j_{cc} è la densità di corrente in condizioni di controllo cinetico. Dato che j_l è proporzionale a $\omega^{1/2}$, l'equazione (5) può essere riformulata come:

$$1/j = 1/j_{cc} + 1/B\omega^{1/2} \quad (6)$$

Per un processo in cui il trasferimento di massa è infinitamente veloce, la velocità di rotazione tende all'infinito e, quindi, la densità di corrente dovrebbe essere indipendente da essa ($1/B\omega^{1/2} \rightarrow 0$).

La costante B sembra essere indipendente dal potenziale. Questo è vero nella maggior parte dei casi, ma un'analisi più dettagliata rivela che B è una funzione del potenziale quando il sistema viene studiato in prossimità del potenziale di equilibrio elettrochimico.

L'equazione (6) è particolarmente utile per lo studio della cinetica elettrodica. E' evidente che un grafico di $1/j$ vs. $1/\omega^{1/2}$ dovrebbe produrre una linea retta con intercetta pari a $1/j_{cc}$. Ripetendo l'esperimento a differenti potenziali, è possibile ottenere l'andamento di j_{cc} con il potenziale, come mostrato in Figura A.13.

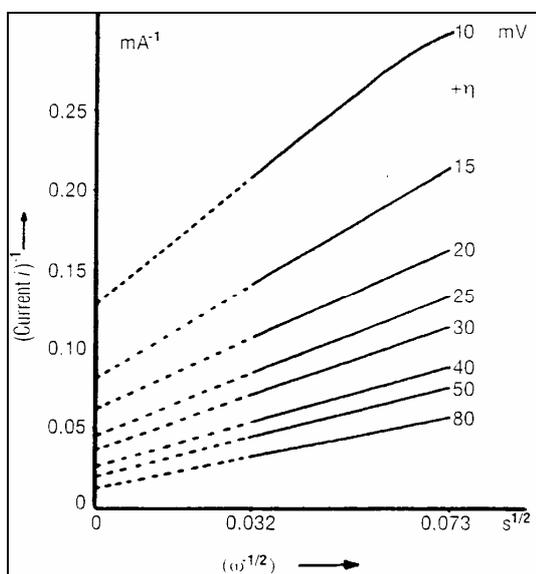


Figura A.13: Grafico che riporta l'inverso della corrente (i_l^{-1}), valutata nella parte crescente della curva corrente-potenziale, in funzione di $1/\omega^{1/2}$ a differenti potenziali elettrodici. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in K_2SO_4 0.5 M.

A.4 Accenni di altre tecniche

A.4.1 Microscopio a scansione elettrochimica (SECM)

L'apparato SECM consiste di quattro componenti di base (Fig. A.14): un controllore della posizione dell'elettrodo-sonda (o “*tip*”) ad alta risoluzione, una cella elettrochimica a tre o quattro elettrodi, un bipotenzistato e un sistema di acquisizione dati (computer, interfacciato sia al potenziostato che al posizionatore).

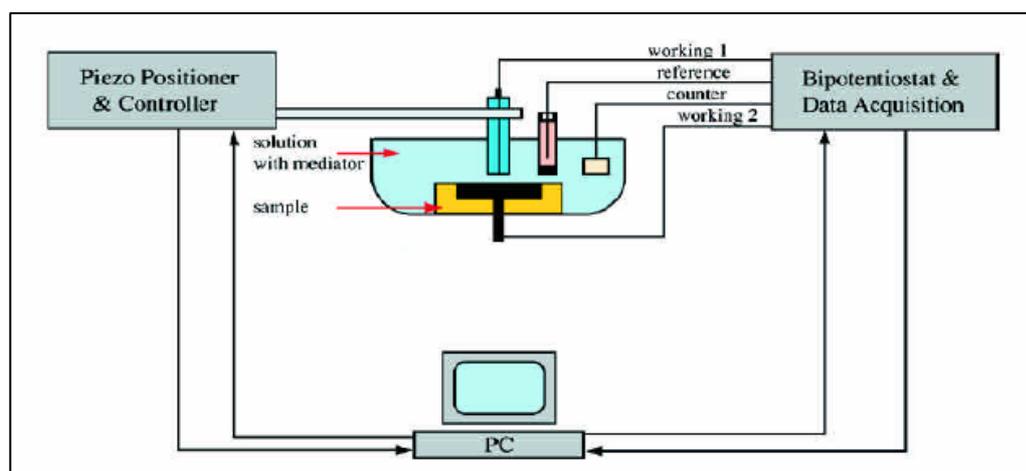


Figura A.14 Rappresentazione schematica della configurazione strumentale SECM (Rif. CHI 900B SECM User's Manual)

Il campione da analizzare (“*substrato*”) è posto sotto una piccola cella di misura, solitamente realizzata in Teflon, contenente pochi mL di una soluzione elettrolitica, sul cui fondo è presente un’apertura; la cella è quindi fissata ad una piattaforma metallica.

Per garantire tenuta ed evitare che il liquido goccioli fuori, si impiega, fra cella e substrato, un O-ring di materiale gommoso deformabile.

È indispensabile porre l'intera strumentazione all'interno di una gabbia di Faraday, per evitare che interferenze elettriche disturbino il segnale; per lavori ad alta risoluzione, si impiega un tavolo anti-vibrazione [2], [3].

La cella elettrochimica è composta da tre elettrodi, uno di lavoro (la tip stessa), uno di riferimento e uno ausiliario (o controelettrodo); se il substrato è a sua volta un elettrodo, oppure è supportato da un materiale conduttore, provvisto di contatto elettrico, può essere anch'esso polarizzato, diventando un secondo elettrodo di lavoro [4].

In alcune applicazioni, come la quantificazione di flussi ionici, la tip lavora in modalità potenziometrica, comportandosi da sensore passivo: in tal caso, un arrangiamento a due elettrodi (lavorante e riferimento) è sufficiente, non verificandosi passaggio di corrente.

Molto spesso la tip lavora invece come sensore attivo, di tipo amperometrico, producendo un segnale di corrente derivante dall'interazione con il campione. In questo caso, è necessario un arrangiamento a tre elettrodi: mentre il generatore di tensione impone una differenza di potenziale fra elettrodo di lavoro ed ausiliario, in un circuito parallelo, nel quale non passa significativa corrente, un voltmetro ad alta impedenza di ingresso misura la differenza di potenziale tra elettrodo lavorante e di riferimento [2], [3], [4].

Gli elettrodi di riferimento comunemente impiegati sono l'Ag/AgCl e l'elettrodo a calomelano saturo (SCE), per le soluzioni acquose. Un bipotenzio stato controlla il potenziale applicato alla tip e al substrato, verso l'elettrodo di riferimento.

La strumentazione SECM necessita di un microcomputer al suo interno, collegato all'apparato di misurazione e al microposizionatore mediante un'interfaccia, per sincronizzare l'acquisizione dei dati elettrochimici con il movimento della tip; l'uso di programmi software sempre più avanzati consente, infine, la manipolazione e la presentazione dei dati sperimentali, fornendo immagini tridimensionali particolareggiate e suggestive [2], [3], [5].

La tecnica SECM può essere impiegata in cinque diverse modalità operative: feedback amperometrico, generation/collection (in amperometria e potenziometria), penetration mode, trasferimento ionico, perturbazione di equilibrio. In questo lavoro di tesi si è utilizzato la modalità: "feedback amperometrico".

Con gli elettrodi della cella immersi in una soluzione, non agitata, contenente una specie di una coppia redox reversibile ("*mediatore redox*"), si applica alla tip un potenziale sufficientemente alto per ossidarla (o ridurla) secondo un processo a controllo diffusivo (in cui il

trasporto di massa rappresenta lo stadio limitante la velocità complessiva del fenomeno) [3].

Mediatori redox comunemente impiegati, in soluzioni sia acquose sia non acquose, sono derivati del ferrocene (FcSO_3H , FcCOOH , FcCH_2OH , e altri), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, metilviologeno ($\text{MV}^{+/2+}$), composti del rutenio (come $[\text{Ru}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$, $[\text{Ru}(\text{en})_3]^{2+/3+}$).

Il panorama di mediatori fra cui scegliere è comunque vastissimo, essendo richiesti pochi requisiti per l'impiego in esperimenti SECM: compatibilità con la superficie e il processo da studiare, coppia redox reversibile (o, perlomeno, quasi reversibile), trasferimento di un solo elettrone, con cinetica veloce, inerzia verso il materiale costituente la tip e verso il substrato (assenza di reazioni chimiche o di processi chimici interferenti, in grado di alterare la concentrazione di mediatore in competizione con il processo redox che genera il responso strumentale) [5].

Inizialmente, la tip è mantenuta nel bulk della soluzione, ad una distanza dal substrato pari ad almeno $10 d_T$ (dove $d_T = 2a$) [6]. All'applicazione del potenziale, si registra una corrente, il cui valore decade a causa della formazione dello strato di diffusione della specie elettroattiva intorno alla tip, fino a raggiungere rapidamente (in un tempo dell'ordine di qualche decina di a^2/D) un valore costante [5].

Tale valore corrisponde alla cosiddetta “corrente di stato stazionario”, $i_{T,\infty}$, che, per un elettrodo con simmetria a disco, è data dall'equazione, $i_{T,\infty} = 4nFDc_b a$ ed è originata dalla diffusione quasi-emisferica della specie redox verso la tip.

Il flusso diffusivo di stato stazionario, espresso in $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, è dell'ordine di Dc_b/a e può assumere valori molto grandi per un UME, nel quale “a” è piccolo; in generale, esso risulta comunque maggiore del flusso convettivo caratteristico di un elettrodo a disco rotante o di un elettrodo in soluzione agitata, pertanto le misurazioni effettuate con un microscopio SECM sono relativamente immuni da effetti convettivi, e il

risponso della tip deriva unicamente dal suo avvicinamento al substrato entro una distanza di pochi diametri elettrodi d_T [5].

Gli effetti convettivi e idrodinamici sono trascurabili anche quando la tip è scansionata su un piano parallelo alla superficie del substrato, a distanza fissa, con una velocità di scansione tipicamente di 10 $\mu\text{m/s}$ [3].

Per comprendere come si produce il feedback, si ipotizzi che in soluzione sia presente inizialmente solo la forma ridotta (R) della coppia redox del mediatore: applicando alla tip, posizionata nel bulk, un potenziale sufficientemente positivo, decorre la reazione di ossidazione, schematizzabile come $R \rightarrow O + ne^-$, a mano a mano che R diffonde verso la superficie della tip.

Se questa viene fatta avvicinare lentamente (con velocità tipiche comprese fra 1 [7] e 7,5 $\mu\text{m/s}$ [8]) ad un substrato elettricamente isolante entro pochi diametri elettrodi, la corrente (i_T) che fluisce è inferiore a quella registrata in bulk ($i_{T,\infty}$), perché la presenza della superficie costituisce un ostacolo fisico alla diffusione emisferica (si parla infatti di “diffusione impedita”). Più la tip è vicina al substrato, più i_T decresce, con $i_T \rightarrow 0$ quando $d \rightarrow 0$ (distanza tip/substrato): il fenomeno per cui, in queste condizioni, si verifica $i_T < i_{T,\infty}$ prende il nome di “feedback negativo”. Può essere impiegato per realizzare immagini topografiche ad alta risoluzione di diverse superfici con proprietà di reattività uniformi: correnti più basse indicano presenza di microprotrusioni ed aree convesse, che si estendono verso la tip, mentre correnti più alte si registrano in corrispondenza di aree concave, fratture, crateri, canali. L'effetto di feedback negativo non si manifesta solo quando il substrato è isolante, ma anche quando il processo elettrodico alla tip è chimicamente irreversibile [2], [5].

Ovviamente, il feedback negativo si instaura perché, ad essere interessato dal processo redox, è solo lo strato di soluzione posto fra la tip e il substrato, che ha un'estensione limitata nello spazio: nella scala temporale di avvicinamento, il mediatore non riesce a diffondere con

sufficiente rapidità dal bulk, ed incontra, oltretutto, l'effetto di schermo della tip. Di conseguenza, diminuendo progressivamente il rifornimento di specie elettroattiva, anche la corrente registrata alla tip diminuisce.

Se, al contrario, la tip viene portata in vicinanza di una superficie dal comportamento di conduttore elettrico, la specie O formata diffonde verso il substrato e, in opportune condizioni, può essere ridotta nuovamente, rigenerando R: $O + ne^- \rightarrow R$. Si produce così un riciclo, o "loop", che conduce un flusso aggiuntivo di materiale elettroattivo alla tip e genera un incremento di corrente: in questo caso, si verifica la condizione $i_T > i_{T,\infty}$, per cui l'effetto è detto di "feedback positivo" [3], [5]. Minore è la distanza, d, della tip dal substrato, maggiore diventa la corrente, i_T : quando la reazione di rigenerazione del mediatore è rapida, $i_T \rightarrow \infty$ per $d \rightarrow 0$ [3].

In Fig. A.15 è mostrato l'andamento della corrente nei casi di feedback negativo e positivo:

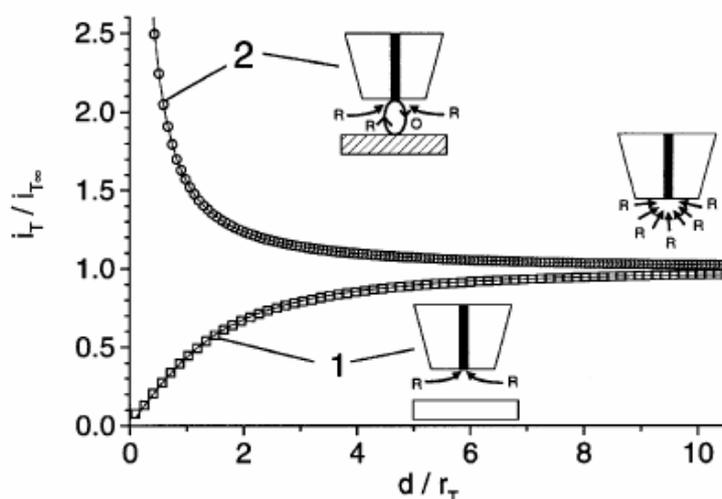


Figura A.15 – Parallelismo fra posizione della tip in soluzione e responso amperometrico nel feedback negativo (curva 1) e positivo (curva 2) (Rif. [9]).

Il processo di rigenerazione del mediatore può avvenire attraverso tre vie:

- reazione elettrochimica, quando il substrato è elettricamente conduttore, la reazione alla tip è chimicamente reversibile e il potenziale (OCP o applicato) della superficie riesce a far decorrere la reazione inversa (rigenerazione);
- ossidazione della superficie del substrato (se esso è un semiconduttore o un isolante), che è accoppiata, di conseguenza, alla riduzione del mediatore;
- consumo di specie ossidata, O, come accettore di elettroni in una reazione catalizzata da un enzima immobilizzato sulla superficie del substrato [9].

Anche il feedback positivo può essere impiegato per ottenere informazioni sulla topografia di un substrato con reattività superficiale omogenea, ma, in questo caso, correnti alte indicano protrusioni e aree convesse, correnti basse avvallamenti e aree concave [2].

Nonostante il responso di corrente sia principalmente legato alla natura del substrato e alla distanza della tip da esso, in realtà esistono molti casi intermedi fra il feedback puramente positivo e negativo: si tratta dei sistemi in cui il trasferimento elettronico eterogeneo al substrato, nella rigenerazione del mediatore, procede con una cinetica “finita”. In generale, a seconda che la cinetica sia veloce o lenta, rispetto alla velocità di diffusione alla tip, la risposta del feedback passa gradualmente da quella attesa per un puro conduttore a quella caratteristica di un puro isolante, rispettivamente [5], [10].

L'andamento della corrente registrata dalla tip (i_T) come funzione della distanza percorsa (x), nell'avvicinamento al substrato, prende il nome di “curva di approccio sperimentale”. Solitamente, a tale curva si applica un trattamento matematico per renderla “normalizzata”: sull'asse delle ordinate, al posto di i_T , si riporta il rapporto $i_T/i_{T,\infty}$ (il cui valore di partenza è pari a 1, corrispondente al posizionamento in bulk, poi aumenta, nel feedback positivo, o diminuisce, nel feedback negativo), mentre su quello delle ascisse si indica la distanza normalizzata

tip/substrato L , espressa in unità di raggio elettrodoico $\left(L = \frac{d}{a}\right)$, anziché la distanza assoluta percorsa (Fig. A.16).

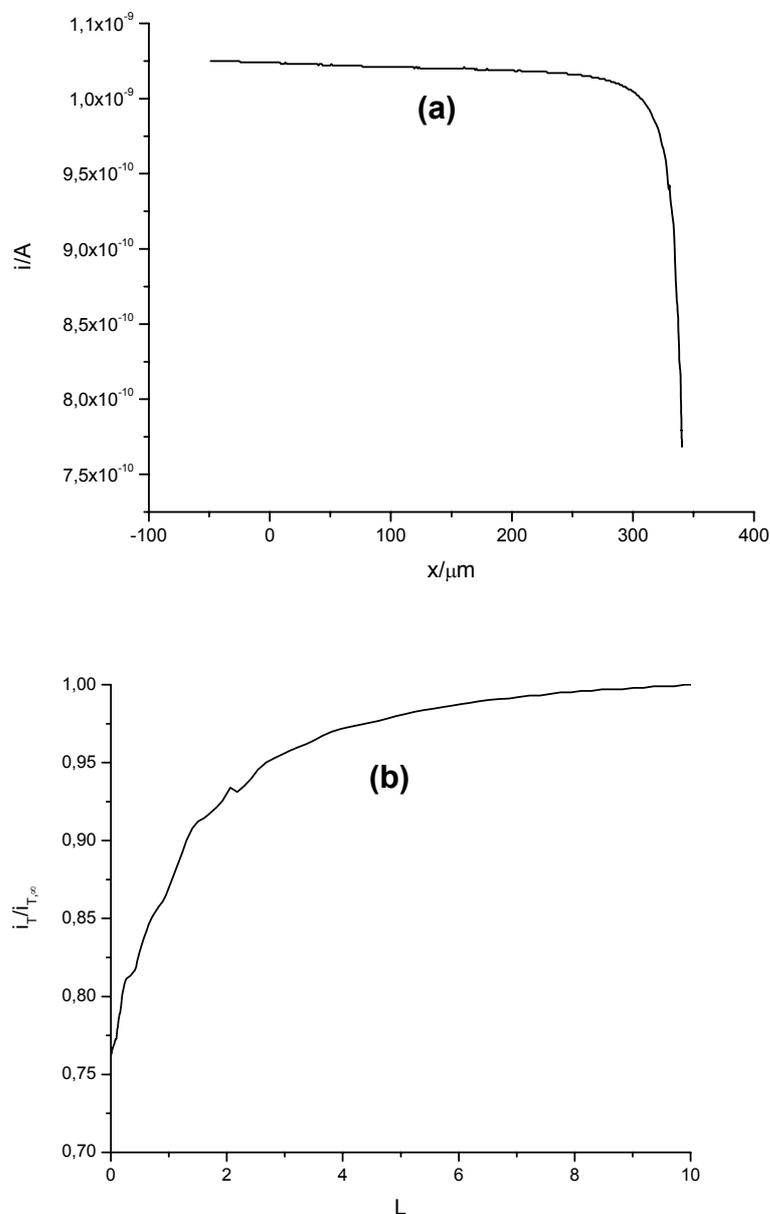


Figura A.16 (a): Curva d'approccio sperimentale (per feedback negativo); (b): corrispondente curva normalizzata.

In ogni curva di approccio è presente un tratto iniziale in cui la corrente è costante, e pari a $i_{T,\infty}$, poiché la tip si trova ancora nel bulk della soluzione, quindi si verifica un cambiamento di pendenza, più o meno

brusco, quando la tip si trova nelle immediate vicinanze del substrato. Se la pendenza dell'ultimo tratto tende a $+\infty$, la reattività della superficie studiata è tale da causare un effetto di feedback positivo, mentre, se tende a $-\infty$, di feedback negativo. Può accadere che la corrente $i_{T,\infty}$ non rimanga costante, ma diminuisca progressivamente (“deriva negativa”), a mano a mano che la tip si muove verso il substrato: questa deviazione dal comportamento ideale è attribuibile a passivazione, a disattivazione della tip per adsorbimento di intermedi o impurezze, oppure a reazioni collaterali di consumo del mediatore.

L'impiego delle curve d'approccio si configura come uno strumento di analisi puntuale, poiché caratterizza le proprietà locali della sola microscopica area di substrato direttamente posta sotto la tip. È possibile caratterizzare un substrato, realizzando un certo numero di curve su punti casualmente distribuiti sulla sua intera superficie, se si desidera conoscerne globalmente le caratteristiche, oppure su poche aree selezionate, per studiare in modo mirato solo il comportamento di piccole porzioni di materiale.

La capacità delle curve di fornire informazioni sul sistema studiato si manifesta, più che nella valutazione assoluta del loro aspetto, nel confronto con altre curve di approccio sperimentali e con “*curve teoriche*”.

Nell'ambito del primo tipo di comparazione, sovrapponendo due curve sperimentali normalizzate, realizzate in condizioni operative o ambienti di reazione differenti, e confrontando in questo modo le loro curvature (ossia la rapidità con cui avviene il cambiamento di pendenza finale), si possono evidenziare visivamente le differenze nelle proprietà di reattività dei due sistemi.

A.4.2 Spettroscopia di impedenza in corrente alternata (EIS)

Una cella elettrochimica presenta solitamente una serie di interfacce. Oltre a quella tra elettrodi ed elettrolita, soprattutto se si utilizzano elettrodi modificati, sono presenti interfacce interne all'elettrodo. Ad

ognuna di queste interfacce, in seguito all'applicazione di un potenziale, le proprietà chimico-fisiche, cristallografiche, composizionali ed elettriche variano velocemente, ed una distribuzione eterogenea di carica (polarizzazione) altera localmente le proprietà del sistema.

Per questi motivi, le tecniche in corrente continua si rivelano efficaci nella caratterizzazione delle prestazioni di una cella e nella descrizione delle grandezze macroscopiche ad essa associate, ma presentano dei limiti nella descrizione dei processi che si sviluppano agli elettrodi e dei meccanismi con cui si verificano.

Una tecnica in corrente alternata come la spettroscopia elettrochimica di impedenza (EIS, Electrochemical Impedance Spectroscopy, AC-Impedance) è invece un mezzo potente ed efficace per la caratterizzazione delle proprietà elettriche ed elettrochimiche delle interfacce che si creano su elettrodi conduttori.

A partire da lavoro di Randles [11], i sistemi elettrochimici possono essere assimilati a circuiti equivalenti costituiti da resistenze, capacità, induttanze e altri elementi che descrivono i vari fenomeni che si verificano nel sistema; è così possibile quantificare il trasferimento di carica, le resistenze della soluzione e degli elettrodi, la capacità del doppio strato elettrico.

Misure di impedenza complessa [12]

Se sottoponiamo una cella elettrochimica ad una tensione alternata $V(t) = V_m \sin(\omega t)$, con frequenza $\nu = \omega/2\pi$, si ottiene, generalmente, una risposta non assimilabile a quella di una resistenza pura: $I(t) = I_m \sin(\omega t + \theta)$

La risposta è funzione della frequenza e presenta uno spostamento di fase θ che dipende dalla natura degli elementi che compongono la cella (se la cella è costituita da un singolo componente resistivo, $\theta = 0$).

La cella è caratterizzata quindi da un'impedenza $Z(\omega) = V(t)/I(t)$, il cui modulo è $|Z(\omega)| = V_m/I_m(\omega)$. L'impedenza è quindi un concetto più

generale rispetto a quello della resistenza perché tiene anche conto di eventuali spostamenti di fase. Se esprimiamo le varie grandezze con numeri complessi abbiamo:

$$V(t) = V_m e^{j\omega t}$$

$$I(t) = I_m e^{j(\omega t + \theta)}$$

$$Z = |Z| e^{-j\theta}$$

Passando alla notazione di Eulero per i numeri complessi l'impedenza può essere scritta come:

$$Z = |Z| \cos(-\theta) + j|Z| \sin(-\theta) = |Z| \cos\theta - j|Z| \sin\theta$$

L'impedenza può quindi essere rappresentata, nel piano complesso, nella forma: $Z = a + jb$

Dove $a = Z' = \text{Re}(Z) = |Z| \cos\theta$ e $b = -\text{Im}(Z) = Z'' = |Z| \sin\theta$, con il modulo $|Z| = [(Z')^2 + (Z'')^2]^{1/2}$

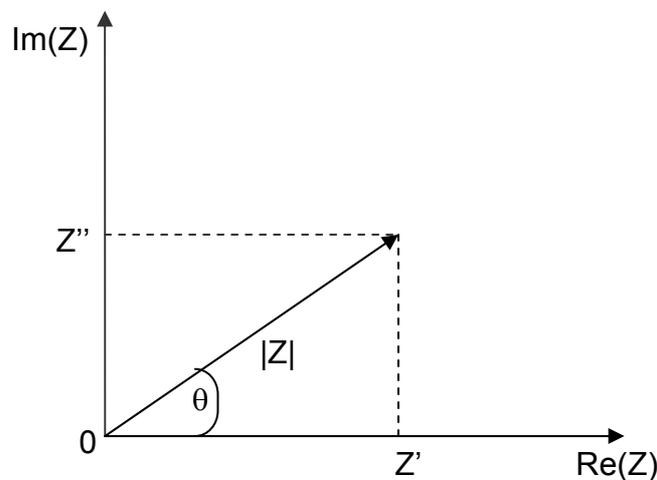


Figura A.17: Rappresentazione dell'impedenza nel piano complesso.

E' importante notare che l'impedenza non è funzione del tempo, ma della frequenza. Le misure di EIS generalmente vengono eseguite misurando Z in funzione della frequenza, in un ampio intervallo di frequenza.

Dall'andamento di Z in funzione di ω si possono trarre informazioni sulle proprietà elettriche dell'intero sistema tramite l'esame del circuito elettrico equivalente costruito. Come già accennato in precedenza, questo tipo di analisi si basa sull'analogia che esiste tra elementi

circuitali semplici come resistenze, capacità, induttanze e processi chimici e fisici che si verificano all'interno della cella e dell'elettrodo. Ad esempio possiamo rappresentare un fenomeno di conduzione come una resistenza, pari all'inverso della conducibilità; in modo simile, capacità ed induttanze saranno generalmente associate a fenomeni di polarizzazione e ad assorbimenti ed accumuli di carica agli elettrodi.

Prendiamo in esame il semplice sistema elettrochimico rappresentato in Figura A.18 e costituito da due elettrodi metallici piani identici e da un elettrolita tra essi interposto:

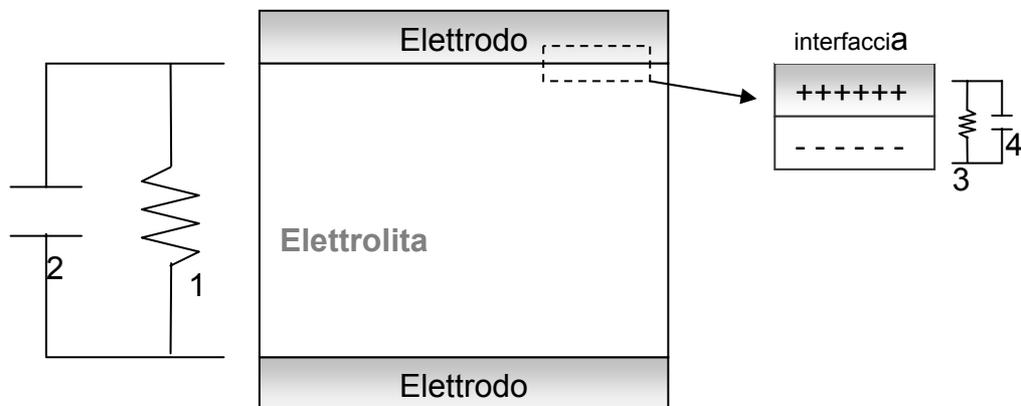


Figura A.18 Modello semplificato di una cella elettrochimica e rappresentazione dei vari fenomeni tramite elementi circuitali semplici.

Gli elementi circuitali che rappresentano la cella sono:

1. R_s : Resistenza dell'elettrolita; $1/R_s$ rappresenta la conducibilità dell'elettrolita;
2. C_g : Capacità geometrica della cella
3. R_{ct} : resistenza al trasferimento di carica che si verifica all'interfaccia elettrodo-soluzione.
4. C_{dl} : capacità del doppio strato elettrico che si forma a causa dell'accumularsi di cariche elettriche all'interfaccia elettrodo-soluzione.

A partire da questi elementi possiamo costruire un generico circuito equivalente, rappresentato in Figura A.19, che può anche essere indicato con $(C_g[R_s(C_{dl}R_{ct})])$, poiché, per convenzione, due o più elementi in parallelo vengono indicati racchiusi tra parentesi, mentre due o più elementi in serie sono riportati consecutivamente senza l'uso di parentesi:

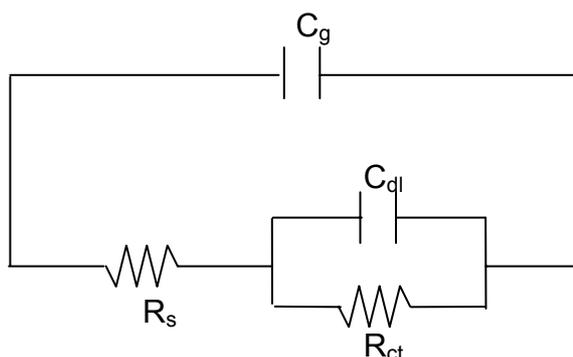


Figura A.19 Circuito equivalente rappresentativo della cella in esame.

A seconda del tipo di elettrodi e di elettrolita si possono verificare tre casi differenti, a cui corrispondono circuiti differenti.

1. Sistema idealmente reversibile, con $R_{ct}=0$. Conseguentemente non si ha accumulo di carica alle interfacce e anche $C_{dl}=0$. Il sistema si traduce quindi in un semplice $(R_s C_g)$.

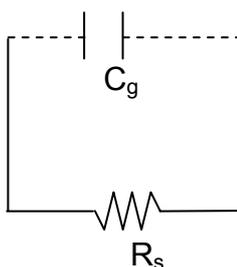


Figura A.20 Circuito equivalente rappresentativo di un sistema idealmente reversibile.

L'impedenza della cella è data da $Z = \left[\frac{1}{R} + j\omega C \right]^{-1}$

Che diventa, dopo essere stata razionalizzata:

$$Z = \frac{R}{1 + (\omega RC)^2} - \frac{j\omega R^2 C}{1 + (\omega RC)^2}$$

A basse frequenze, l'impedenza associata alla capacità è elevata, la corrente passa solo attraverso la resistenza e quindi la conducibilità della cella dipende dall'elettrolita: l'impedenza del sistema può quindi essere approssimata con $Z = R$, puramente reale (per $\omega \rightarrow 0$, $Z \rightarrow R$).

Per frequenze alte la corrente dovrebbe passare anche attraverso la capacità ma di solito, nel range di frequenze utilizzato per le misure di impedenza ($1\text{mHz} < \nu < 100\text{KHz}$), l'impedenza associata alla capacità geometrica degli elettrodi rimane talmente elevata che possiamo assimilare l'elemento ad un circuito aperto. Un sistema di questo tipo si traduce, a qualsiasi frequenza, in un componente resistivo puro, quindi $Z = R$.

2. Sistema con elettrodi idealmente polarizzabili, in cui la resistenza al trasferimento di carica si può considerare infinita. La corrente in questa situazione passa solo attraverso la capacità del doppio strato, che quindi è in serie con R_s (la corrente non passa attraverso C_g per quanto detto al punto 1): $Z = R + 1/j\omega C = R - j\omega C$

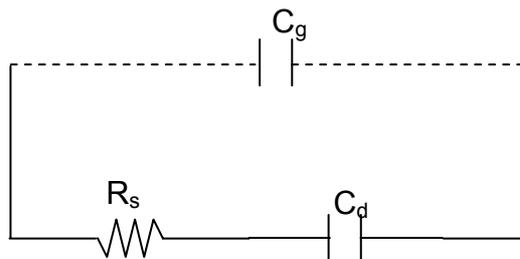


Figura A.21 Circuito equivalente rappresentativo di un sistema con elettrodi idealmente polarizzabili.

3. Sistema reale con resistenza al trasferimento di carica finita e misurabile. Il sistema è una via di mezzo tra i due descritti precedentemente. Se $R_{ct} = 0$ o $R_{ct} = \infty$ si ricade rispettivamente nella prima o nella seconda situazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Pletcher, R. Greef, R. Peat, L.M. Peter, J. Robinson, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Horwood Publishing Chichester ed., Southampton, 2001
- [2] G. Nagy, L. Nagy, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 735-744.
- [3] M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119-146.
- [4] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [5] A. J. Bard, *Electroanalytical Chemistry: a series of advances*, Vol. 18, Marcel Dekker Inc., **1993**.
- [6] A. L. Barker, M. Gonsalves, J. V. Macpherson, C. J. Slevin, P. R. Unwin, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 223-240.
- [7] M. Carano, K. B. Holt, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5071-5079.
- [8] S. A. G. Evans, K. Brakha, M. Billon, P. Mailley, G. Denuault, *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 135-140.
- [9] G. Wittstock, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 370, 303-315.
- [10] A. L. Whitworth, D. Mandler, P. R. Unwin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 356-365.
- [11] J.E.B Randles, *Disc. Farad. Soc.*, 1, 11 (1947)
- [12] J. Ross MacDonald, *Impedance Spectroscopy. Emphasizing Solid materials and System*, John Wiley and Sons ed. New York, 1987

Elenco delle pubblicazioni

- I. "The contribution of homogeneous and non-oxidative side reactions in the performance of vanadyl pyrophosphate, catalyst for the oxidation of n-butane to maleic anhydride, under hydrocarbon-rich conditions", N. Ballarini, F. Cavani, C. Cortelli, F. Gasparini, A. Mignani, F. Pierelli, F. Trifirò, C. Fumagalli and G. Mazzoni, *Catalysis Today*, **99** (1-2), 2005, 115-122
- II. "Electrodeposited glucose oxidase/anionic clay for glucose biosensors design", Adriana Mignani, Erika Scavetta and Domenica Tonelli, *Analytica Chimica Acta*, **577** (1), 2006, 98-106
- III. "Microscopy techniques for the characterization of modified electrodes in the development of glucose biosensors", Lorella Guadagnini, Barbara Ballarin, Adriana Mignani, Erika Scavetta and Domenica Tonelli, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **126**, 2007, 492-498
- IV. "Electrosynthesis of thin films of Ni, Al hydrotalcite like compounds", Erika Scavetta, Adriana Mignani, Daria Prandstraller, Domenica Tonelli, *Chem. Mater.*, **19**, 2007, 4523-4529
- V. "Optimization of a glucose biosensor setup based on Ni/Al HT matrix" A. Mignani, G. Luciano, S. Lanteri, R. Leardi, E. Scavetta, D. Tonelli, *Analytica Chimica Acta*, **599**, 2007, 36-40
- VI. "Glucose biosensors based on electrodes modified with ferrocene derivatives intercalated into Mg/Al layered double hydroxide" M. Colombari, B. Ballarin, I. Carpani, L. Guadagnini, A. Mignani, E. Scavetta, D. Tonelli, *Electroanalysis*, **19**, 2007, 2321-2327

Ringraziamenti

Desidero esprimere la mia gratitudine alla Prof. ssa Domenica Tonelli per il prezioso aiuto e la disponibilità dimostratimi in questi anni di dottorato.

Un sentito ringraziamento ad Erika (Dott.ssa Scavetta), per la collaborazione e l'amicizia.

Grazie a Lorella, Colomba, Gabriele, Federica, Irene, Matteo, Giovanni, Nicola, Marco, Gloria e Barbara per le belle giornate trascorse insieme in laboratorio.

Vorrei ringraziare la Dott. ssa Barbara Ballarin per la sua gentilezza e porgere un ringraziamento al Dott. Marco Giorgetti e al Prof. Mario Berrettoni.

Un doveroso ringraziamento alla Prof. ssa Silvia Lanteri e al Dott. Giorgio Luciano, dell'Università degli Studi di Genova (DICTFA), e alla Prof. ssa Antonella Rossi e al Dott. Danilo Addari, dell'Università di Cagliari, per la loro collaborazione nello studio dei biosensori.

Adriana