



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE**

Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana

CURRICULUM IN NEUROSCIENZE

Responsabile di Curriculum: Dott.ssa Rossana Migheli

XXIX CICLO

***Sviluppo e caratterizzazione di un
nuovo microsensore per il
monitoraggio in tempo reale della
autossidazione della dopamina***

Coordinatore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Co-Tutor:

Dott.ssa Gaia Rocchitta

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Stefania Melis

Anno Accademico 2015 – 2016

La più bella e profonda emozione che possiamo provare è il senso del mistero; sta qui il seme di ogni arte, di ogni vera scienza.

Albert Einstein



Nel corso dei tre anni di dottorato ho frequentato il laboratorio del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Sassari ed il laboratorio del dipartimento di chimica applicata ed ingegneria dei composti inorganici e dell'ambiente, presso l'Università Politecnica di Timisoara per un periodo di nove mesi.

Sommario	
Indice delle abbreviazioni	1
1 INTRODUZIONE	4
1.1 Stress ossidativo	6
1.2 Sintesi, funzioni e metabolismo della dopamina	8
1.3 Dopamina e morbo di Parkinson	10
1.4 Ossidazione della dopamina	12
1.5 Autossidazione della dopamina mediata da perossido di idrogeno	13
1.6 Tecniche elettrochimiche di rilevazione di dopamina e di perossido di idrogeno	14
1.6.1 Voltammetria ciclica	14
1.6.2 Voltammetria ad impulsi differenziali	16
1.6.3 Voltammetria ad onda quadra	16
1.6.4 Amperometria	17
1.6.5 Cronoamperometria	18
1.6.6 Amperometria a potenziale costante	19
1.7 Sensori amperometrici e materiali che li costituiscono	19
1.7.1 Platino	20
1.7.2 Carbonio	21
1.7.2.1 Ossido di grafene	21
1.7.2.2 Nanoparticelle di grafene	22
1.7.2.3 Grafene ridotto	22
1.7.2.4 Fullereni	22
1.7.2.5 Carbonanotubi	23
1.7.2.6 Nanofibre di carbonio	23
1.8 Acido ascorbico ed altri interferenti	24
1.9 Polimeri per schermare gli interferenti: pDA, pNE ed altri	25
2 SCOPO DELLA RICERCA	28
3 MATERIALI E METODI	29
3.1 Reagenti e soluzioni	30
3.2 Cella elettrochimica	30
3.3 Costruzione del microsensore in Platino e dell'elettrodo in Carbonio	31
3.4 Elettrosintesi	32
	IV

3.5	Protocollo sperimentale per le calibrazioni in CPA	32
3.6	Preparazione dei sensori Ep con gli allotropi del grafene	33
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	35
4.1	Polimerizzazione di DA sui sensori Pt ed Ep	35
4.2	Polimerizzazione di NE sui sensori Pt ed Ep	38
4.3	Calibrazione dei sensori Pt ed Ep con HP	40
4.4	Calibrazione dei sensori Pt ed Ep con DA	42
4.5	Calibrazione dei sensori Pt ed Ep con NE	44
4.6	Calibrazione dei sensori Pt ed Ep con AA	46
4.7	Calibrazione dei sensori Pt ed Ep con DOPAC	48
4.8	Tentativo di polimerizzazione dei sensori Pt ed Ep con DOPAC	50
4.9	Polimerizzazione di <i>o</i> -PD e calibrazione dei sensori Pt ed Ep	51
4.10	Ricerca di un materiale atto a discriminare DA ed AA	53
4.10.1	Ossido di grafene	55
4.10.2	Nanoparticelle di grafene	63
4.10.3	Grafene ridotto	64
4.10.4	Fullerene C60	65
4.10.5	Carbonanotubi a singola parete	67
4.10.6	Carbonanofibre	71
4.11	Scelta della combinazione ideale tra materiale del trasduttore e polimero	72
4.12	Studio dell'autossidazione <i>in vitro</i> della dopamina mediata da perossido d'idrogeno	73
5	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	77
6	BIBLIOGRAFIA	80

Indice delle abbreviazioni

3-MHPA: 3-metossi-4-idrossifenilacetaldeide

3-MT: 3-metossitirammina

5-HT: serotonina

6-OHDA: 6 idrossidopamina

AA: acido ascorbico

BTC: acido benzenetricarbossilico

CE: elettrodo ausiliario

CNTs: carbonano tubi

COMT: catecolo O-metil-transferasi

COX: ciclossigenasi

CPA: cronoamperometria a potenziale costante

CV: voltammetria ciclica

d.d.p.: differenza di potenziale

DA: dopamina

DDC: DOPA decarbossilasi

DHPA: 3,4-diidrossifenilacetaldeide

DJ-1: proteina deglicasi 1

DMF: dimetilformammide

DOPAC: acido 3,4-diidrossifenilacetico

DOPEGAL: 3,4-diidrofenilglicolaldeide

DPV: voltammetria ad impulsi differenziali

E: epinefrina

Ep: epoxycarbon

FC60: fullerene 60

GNANO: nanoparticelle di carbonio

GO: ossido di grafene

HP: perossido di idrogeno

HVA: acido omovanillico

IL: liquido ionico

L-DOPA: acido diidrossifenilacetico

LRRK2: dardarina

Lys: lisina

MEFP-5: proteina di adesione del piede della cozza

MOF: struttura organica metallica

MPA: acido meta fosforico+

MPTP: 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina

MTBS: tributilmetilammonio metil solfato

MWCNTs: carbonanotubi a parete multipla

NE: norepinefrina

***o*-PD:** orto-fenilendiammina

PBS: soluzione fosfato salina

PD: malattia di Parkinson

pDA: poli-dopamina

pDOPAC: poli-DOPAC

PINK 1: PTEN chinasi indotta putative 1

pNE: poli-norepinefrina

pPD: poli-fenilendiammina

PRKN: parkina

Pt: platino

RE: elettrodo di riferimento

RGO: ossido di grafene ridotto

ROS: specie reattive dell'ossigeno

SNC: sistema nervoso centrale

SNCA: alfa si nucleina

SNpc: substantia nigra pars compacta

SWCNTs: carbonanotubi a parete singola

SWV: voltammetria ad onda quadra

TH: tirosina idrossilasi

UA: acido urico

VMAT: trasportatori monoaminici vescicolari

WE: elettrodo di lavoro

1. INTRODUZIONE

I radicali liberi sono i principali responsabili dello stress ossidativo, così come le specie ossidanti non radicaliche, quali il perossido d'idrogeno, e le radiazioni ionizzanti (*Redza-Dutordoir M et al. 2016*). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono una duplice attività sull'organismo. È ormai appurato che una loro produzione eccessiva provochi stress ossidativo il quale consegue in un'alterazione di proteine, DNA, lipidi e membrane con effetti dannosi a livello cellulare (*Comporti M et al. 1989*). Tuttavia, a basse concentrazioni, i ROS sono implicati nei processi inerenti alla normale crescita cellulare quali trasduzione del segnale, controllo dell'espressione genica, senescenza cellulare, nonché l'apoptosi a livello del sistema nervoso centrale (SNC) (*Solovieva EY et al. 2015*). In generale, la definizione di stress ossidativo include tutte quelle alterazioni che si generano a livello delle macromolecole biologiche quando queste vengono a contatto con un eccesso di agenti ossidanti, siano essi esogeni o endogeni. Il bilanciamento tra agenti ossidanti e antiossidanti (equilibrio redox) è fondamentale per numerose attività cellulari, tra le quali la trasduzione del segnale, il quale è stato dimostrato essere sensibile anche a leggere variazioni del suddetto equilibrio (*Rahal A et al. 2014*). Il metabolismo cerebrale richiede alte concentrazioni di ossigeno, e per questo esso risulta particolarmente sensibile ai processi ossidativi. Inoltre il SNC è ricco di acidi grassi insaturi, fosfolipidi presenti nelle guaine mieliniche e nelle membrane cellulari, depositi di rame e ferro, anch'esse specie influenzate dalle variazioni dell'equilibrio redox. La substantia nigra, regione del mesencefalo dove si trovano i neuroni dopaminergici che vengono danneggiati con l'insorgere del morbo di Parkinson (PD), è infatti ricca di ferro (*Zhu Y et al. 2017*). È stato dimostrato che anche ossido nitrico, glutatione e dopamina (DA) sono coinvolti nei processi neurodegenerativi; la DA stessa è in grado di catalizzare reazioni "redox cycling" di rame e ferro (*Halliwell B et al. 2006*).

1.1 Lo stress ossidativo

I radicali liberi vengono prodotti in concentrazioni fisiologiche nei mitocondri in seguito alla formazione di ATP. È stato dimostrato che i ROS ad alte concentrazioni sono responsabili di danni a livello di tutte le strutture cellulari (stress ossidativo) (*Sarvajeet SG et al. 2010*) e che lo stesso è coinvolto nell'insorgenza e sviluppo di diversi disturbi patologici, quali artriti, cancro, malattie autoimmuni, malattie neurodegenerative e cardiache (*Uttara B et al. 2009*). Antiossidanti esogeni ed endogeni agiscono come *scavenger* dei ROS con lo scopo di prevenire o riparare i loro danni (*Valko M et al. 2007*). I ROS possiedono una maggiore reattività rispetto alle specie non radicaliche in quanto la presenza dell'elettrone spaiato li rende meno stabili. Il radicale libero è quella molecola che presenta uno o più elettroni disaccoppiati nell'orbita più esterna. Tra queste specie possiamo annoverare:

- l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), il quale possiede la capacità di inattivare il gruppo ferro-zolfo contenuto negli enzimi, liberando di conseguenza ferro semplice nella cellula, secondo la reazione di Fenton e generare il radicale idrossile che è altamente reattivo;
- il radicale idrossile ($\bullet OH$), che risulta essere il più reattivo, il quale si forma dal perossido d'idrogeno (HP) durante la reazione di Fenton o durante l'idrolisi dell'acqua in seguito a radiazioni e che viene trasformato in acqua dalla glutazione perossidasi;
- il perossido di idrogeno (H_2O_2) prodotto da enzimi come le ossidasi e la glutazione perossidasi presenti nei perossisomi.

Tutte le specie sopra elencate sono radicali liberi ed agiscono come agenti ossidanti, andando a scatenare reazioni dannose (*Genestra M et al. 2007*). L'ossigeno molecolare (O_2) presenta un'univoca configurazione elettronica ed è esso stesso un radicale (*Gutowski M et al. 2013*). Per aggiunta di un elettrone viene modificato in anione superossido $O_2^{\bullet-}$ (*Miller DM et al 1990*) che viene considerato uno dei ROS più dannosi e che reagisce con altre molecole producendo ROS secondari. L' $O_2^{\bullet-}$ si forma all'interno dei mitocondri quando una piccola parte di elettroni, implicati nella catena respiratoria, viene trasferita all'ossigeno. Infatti, è stato dimostrato come circa il 97 % degli elettroni coinvolti nella catena respiratoria producono ATP, mentre il restante 3 % sfugge a questa via e determina la formazione di $O_2^{\bullet-}$ piuttosto che ridurre l'ossigeno in acqua (*Turrens JF. 2003*).

Il radicale $\cdot\text{OH}$ è la forma neutra dello ione idrossido e possiede un'alta reattività. Una volta prodotto, $\cdot\text{OH}$ reagisce immediatamente nello spazio dove viene formato. Nella figura 1 sono raffigurati i ROS precedentemente citati.

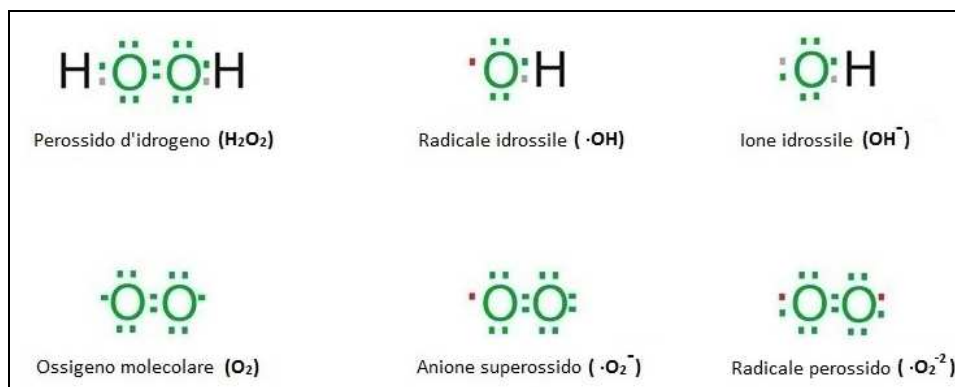
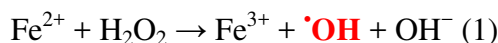
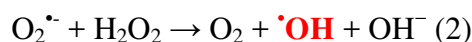


Figura 1: Specie reattive dell'Ossigeno (ROS).

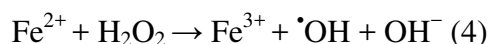
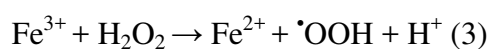
Lo stato redox della cellula è legata ad una coppia redox ferro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) e viene mantenuta entro rigidi limiti fisiologici. La regolazione dello stato ossidativo del ferro è tale per cui non troviamo ferro intracellulare libero, bensì si è visto come in condizioni di stress cellulare $\text{O}_2^{\cdot-}$ induce il rilascio del ferro dalle molecole che lo contengono, sotto forma di Fe^{2+} , il quale partecipa alla reazione di Fenton (reazione 1) generando $\cdot\text{OH}$ altamente reattivo:



L'ossigeno molecolare agisce da ossidante e facilita la produzione di $\cdot\text{OH}$ partendo da H_2O_2 (reazione 2). L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ prende parte alla reazione di Haber-Weiss:



e combina la riduzione del Fe^{3+} (reazione 3) con la reazione di Fenton (reazione 4):



In condizioni fisiologiche, i perossisomi danno luogo alla produzione di HP (*Boveris A et al. 1972*), la quale è dovuta all'utilizzo di ossigeno durante le normali funzioni metaboliche. I perossisomi contengono inoltre l'enzima catalasi che previene l'accumularsi dell'HP convertendolo in acqua (*Fransen M et al.*

2013). Quando tali organuli vengono danneggiati, l'HP viene rilasciato nel citosol cellulare determinando un importante stress ossidativo.

1.2 Sintesi, funzioni e metabolismo della dopamina

La DA, appartenente alla famiglia delle catecolammine, viene sintetizzata a partire dall'amminoacido tirosina. La DA è un neurotrasmettitore endogeno, il quale viene sintetizzato nella midollare del surrene e nel sistema nervoso, in particolare nella substantia nigra e nell'area tegmentale ventrale, ed è precursore di noradrenalina ed adrenalina. La sua biosintesi parte dall'idrossilazione della tirosina per ottenere l'acido diidrossifenilacetico (L-DOPA), per opera dell'enzima tirosina idrossilasi (TH). L-DOPA viene successivamente decarbossilato per azione dell'enzima dopa-decarbossilasi (DDC) che rimuove il gruppo carbossilico dalla sua catena laterale (fig. 2) (Meiser J et al. 2013). La DA viene quindi immagazzinata in vescicole sinaptiche che, successivamente, consentiranno il rilascio del neurotrasmettitore in seguito all'evocazione del potenziale d'azione presinaptico. Questo incapsulamento ha la funzione di conservare e proteggere la DA neosintetizzata per la trasmissione sinaptica (Purves D et al. 2001).

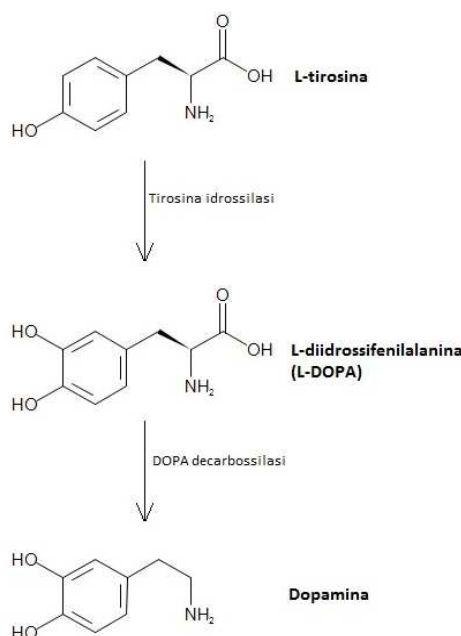


Figura 2: Sintesi della dopamina.

La DA svolge numerose funzioni quali l'inibizione della produzione della prolattina a livello ipofisario (ormone coinvolto nell'appagamento sessuale e nell'allattamento materno) (*Hall TR et al. 1984*), l'accelerazione del battito cardiaco e quindi aumento della pressione sanguigna dovuta all'azione del neurotrasmettitore sul sistema nervoso simpatico (*Montastruc F et al. 2017*), soddisfazione, motivazione, cognizione e movimento volontario. I neuroni dopaminergici, responsabili della sintesi della DA, sono ubicati nella substantia nigra, nella zona tegmentale ventrale del mesencefalo e nel nucleo arcuato dell'ipotalamo (*Halliday G et al. 2012*). La DA rilasciata a livello della substantia nigra ha la funzione di modulare l'attività inibitoria GABAergica (*Olijslagers J et al. 2006*).

La DA rilasciata nello spazio sinaptico subisce un re-uptake da parte del neurone presinaptico e qui viene degradata: essa può essere metilata dalla catecolo-O-metil-transferasi (COMT) in 3-metossitirammina (3-MT), la quale viene trasformata in 3-metossi-4-idrossifenilacetaldeide (3-MHPA) grazie ad una deamminazione da parte delle MAO e trasformata in acido omovanillico (HVA) dall'aldeide deidrogenasi; inoltre la DA può subire prima una deamminazione da parte delle MAO e trasformazione in 3,4-diidrossifenilacetaldeide (DHPA), una successiva conversione in acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) da parte dell'aldeide deidrogenasi ed infine in HVA prima ad opera della COMT e poi della MAO (fig. 3) (*Nishijima H et al. 2016*).

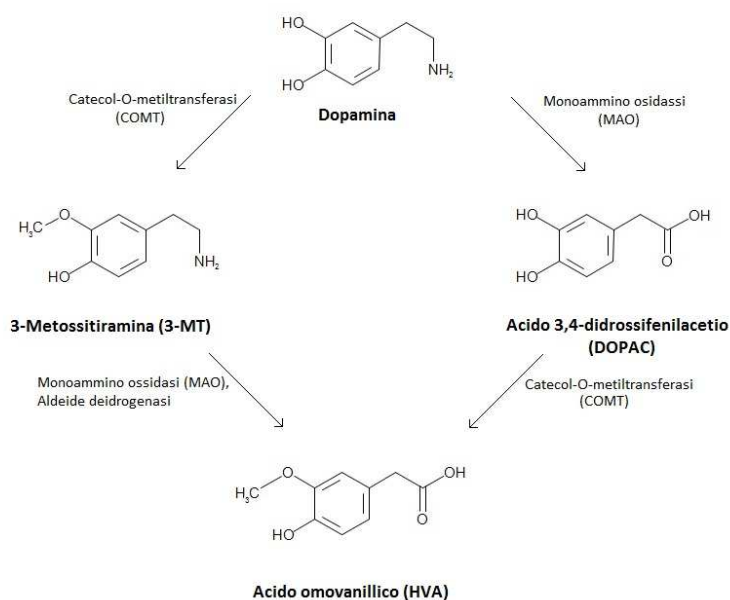


Figura 3: Metabolismo della dopamina.

I recettori per la DA sono legati a proteine G e ne esistono due tipi, differenti per caratteristiche biochimiche e farmacologiche. Alla famiglia D1 appartengono i sottotipi D1 e D5, entrambi postsinaptici: il D1 lo troviamo nel talamo, nell'ipotalamo, nel corpo striato e nel sistema limbico, mentre il D5 è localizzato nell'ipotalamo e nell'ippocampo (*Jaber M et al. 1996*). Le loro funzioni, una volta attivati, sono quelle di mobilizzare il calcio grazie all'attivazione di una fosfolipasi; di determinare vasodilatazione dei vasi periferici, a livello coronarico, cerebrale, renale e mesenterico e di fosforilare la proteina DARPP-32 in seguito ad attivazione dell'adenilato ciclasi (*Franco R et al. 2016*). La famiglia D2 invece consta di più sottotipi: D2Sh e D2Lh, D3 e D4. Questi, a differenza della famiglia D1, possono essere anche localizzati nel neurone pre-sinaptico: i D2 si trovano in sostanza nera, ipofisi e striato; i D3 nell'ipotalamo, bulbo olfattorio e striato laterale; D4 nel bulbo, corteccia frontale e mesencefalo (*Stocchi F et al. 2016*).

1.3 Dopamina e morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson, descritto per la prima volta nel 1817 (*Parkinson J. 1817*), è una patologia caratterizzata da una perdita progressiva dei neuroni dopaminergici localizzati nella substantia nigra pars compacta (SNpc) (*Tanji K et al. 2001*), a livello del mesencefalo, dove viene sintetizzata la DA, fondamentale per il movimento. Queste cellule utilizzano la DA per comunicare con le cellule dello striato (*Jenner P et al. 2003*). L'esordio della malattia ha luogo quando circa il 50 % dei neuroni dopaminergici della SNpc sono compromessi. Questa riduzione nel numero di neuroni porta ad una diminuita sintesi di DA, determinando uno sbilanciamento tra stimolazione colinergica e dopaminergica responsabile della sintomatologia del tremore a riposo, della riduzione della mobilità volontaria, dell'instabilità della postura, dei disturbi della scrittura e della parola e dei sintomi depressivi (*Koo JW et al. 2012*) (fig. 4). Il morbo di Parkinson risulta essere la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo l'Alzheimer e colpisce soggetti con un'età media di 55 anni. I sintomi si rendono manifesti circa 4-5 anni dopo l'esordio effettivo della malattia. Sebbene la sintomatologia abbia dei caratteri ben definiti, l'eziopatogenesi è invece alquanto complessa. Fino ad ora sono state scoperte ben 13 mutazioni genetiche responsabili del 20 % dei casi riscontrati, le quali si verificano in concomitanza con cause ambientali. Tra i geni specifici abbiamo ad esempio la PTEN chinasi indotta putativo 1 (PINK1) (*Sämann J et al. 2009*), la dardarina (LRRK2) (*Zimprich A et al. 2004*), l'alfa-sinucleina (SNCA) (*Ozansoy M et al. 2012*), la parkina (PRKN) (*Oczkowska A et al. 2013*), la proteina

deglicasi 1 (DJ-1) (*Cardona F et al. 2016*) e l'ATP13A2 (*Yang X et al. 2014*). I fattori di rischio dello sviluppo del Parkinson maggiormente riconosciuti sono la LRRK2 e la SNCA. Le mutazioni a carico del gene PARK8, che codifica per una proteina denominata dardarina, rappresentano la causa più comune di Parkinson familiare e sporadico, mentre il gene SNCA, che sintetizza l' α -sinucleina, componente principale dei corpi di Lewy, determina la formazione di aggregati proteici anormali (*Konno T et al. 2016*). Le moltiplicazioni di questo locus sono responsabili di circa il 2 % dei casi familiari. La terapia farmacologica più comunemente utilizzata per il trattamento della sintomatologia a carico delle disfunzioni motorie sono la levodopa (solitamente associato ad un inibitore della COMT, come ad esempio il tolcapone, e della DDC), gli inibitori MAO-B (es. selegilina, rasagilina) e gli agonisti della DA (es. apomorfina) (*Jankovic J et al. 2007*). L'inizio del trattamento con L-DOPA viene ritardato solitamente mediante somministrazione di agonisti della DA e MAO-inibitori, in modo da posticipare la comparsa delle discinesie (disturbi del movimento volontario). Quando i farmaci non sono più efficaci nel controllo dei sintomi, si può ricorrere alla chirurgia o alla stimolazione cerebrale profonda (impianto di elettrodi nel subtalamo grazie ad innesto di un pacemaker in grado di inviare impulsi al cervello) (*Troster AI. 2009*). È risaputo che la maggior parte dei casi di PD è da ricondurre ad un insieme di cause tra cui l'invecchiamento associato ad altri fattori come infezioni batteriche o virali, consumo di caffè, antidepressivi, tabacco, antipsicotici, esposizione a metalli pesanti o pesticidi (*Noyce AJ et al. 2012*). È stato inoltre dimostrato come lo stress ossidativo giochi un ruolo centrale nel PD: infatti diversi studi post-mortem hanno dimostrato come lo stress ossidativo induca degenerazione cellulare della substantia nigra (*Dias V et al. 2013*). Tale degenerazione è presente anche in cervelli sani, ma si è visto aumentare notevolmente nelle autopsie di pazienti con PD (*Levy OA et al. 2009*).

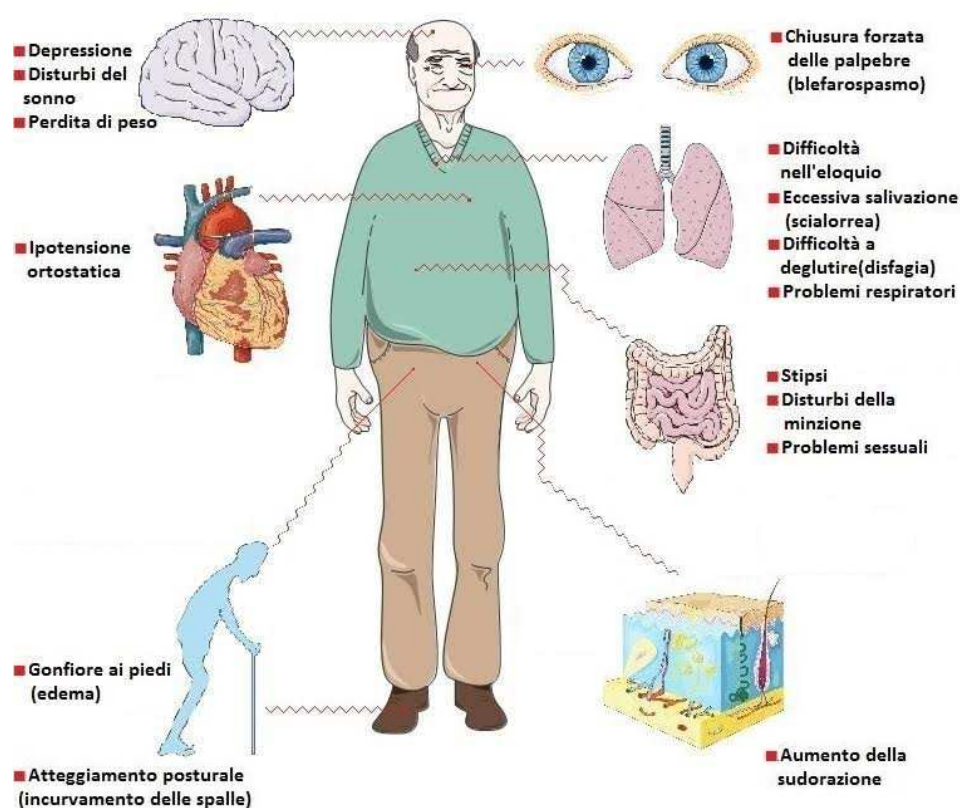


Figura 4: Sintomi non motori del morbo di Parkinson.

1.4 Ossidazione della dopamina

La DA ed altri neurotrasmettitori vengono trasportati dal citosol, dove sono sintetizzati, alle vescicole grazie a dei trasportatori, definiti trasportatori monoaminici vescicolari (VMAT) (*Gasnier B et al. 2000*). I VMAT sono magnesio dipendenti, quindi la loro funzionalità dipende dalla concentrazione di questo minerale. Tali trasportatori vengono bloccati selettivamente dalla reserpina che inibisce il rilascio delle ammine dalle sinapsi (*Biaggioni I et al. 2012*). È stato dimostrato come un'espressione o funzione inadeguata dell'mRNA VMAT2 possa essere correlata con il PD, in cui l'ossidazione della DA diventa patologica (*Lohr KM et al. 2016*). L'ossidazione della DA si può verificare tramite una reazione enzimatica ad opera degli enzimi tirosinasi, fosfolipasi A2 / prostaglandina H sintasi (COX), delle lipossigenasi e xantina ossidasi che portano alla sintesi del dopachinone, responsabile della sintesi della neuromelanina. L'ossidazione enzimatica della DA può essere inoltre mediata dalle MAO. Questa ossidazione porta alla produzione di HP ed alla sintesi di

aldeidi della DA. Si può inoltre verificare un'ossidazione non mediata da enzimi, detta autossidazione, evocata dalla presenza di ossigeno, HP, o metalli. L'ossidazione della DA, sia di natura enzimatica che non, risulta essere determinante nella patogenesi neurodegenerativa; inoltre è dimostrato essere responsabile della deplezione di glutatione, dell'ossidazione dell'ascorbato, ovvero dell'impairment del sistema antiossidante neuronale con conseguente stress ossidativo nel SNC (*Markaverich BM et al. 2007*). Trattiamo in breve l'ossidazione della DA mediata da enzimi. Classi di enzimi, quali le lipossigenasi, la xantina ossidasi, la tirosinasi e le COX, sono in grado di determinare l'ossidazione della DA, trasformando la DA in DA-chinone nella via di formazione della neuromelanina (*Asanuma M et al. 2004*). La perdita della neuromelanina, che può essere evidenziata negli encefali di pazienti PD e non di quelli sani, determina una perdita di efficacia nella sua funzione protettiva di *scavenger* di radicali liberi, ferro e chinoni tossici. Recenti studi mostrano come ratti depletati di COX2 e fosfolipasi A2 mostrino un'elevata resistenza nei confronti della neurotossicità dopaminergica dell' 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP), dopo la sua somministrazione (*St-Pierre J et al. 2006*). Uno dei principali enzimi interessati nell'ossidazione di DA è la MAO, la cui attività aumenta nel corso dell'invecchiamento e che può determinare la formazione di prodotti tossici quali ammoniaca, DHPA, 3,4-diidrofenilglicolaldeide (DOPEGAL), oltre che ROS e HP. È stato dimostrato che DOPEGAL e DHPA inducono una riduzione dell'HP determinando la produzione di $\cdot\text{OH}$ che risulta essere neurotossico (*Marchitti SA et al. 2007*).

1.5 Autossidazione della dopamina mediata da perossido d'idrogeno

L'ossidazione della DA per via non enzimatica è chiamata anche autossidazione ed è mediata dai ROS e da metalli quali manganese, rame e ferro (*Farina M et al. 2013*). Dall'autossidazione della DA si forma la 6-idrossidopamina (6-OHDA), una potente neurotossina (*Soto-Otero R et al. 2000*). È stato dimostrato che la 6-OHDA sia in grado di determinare neurodegenerazione in quanto riduce i livelli di metallotioneina, che ha un'azione antiossidante, nonché dello zinco striatale. In questo modo gli effetti pro-ossidanti prevarranno su quelli antiossidanti, determinando inoltre un rilascio di Fe^{3+} dalla ferritina (*Hare DJ et al. 2013*). È stato dimostrato che le regioni dove si verifica la neurodegenerazione sono già ricche di ferro libero grazie all'azione dello ione HO^{\cdot} , e l'effetto dell'6-OHDA è quello di determinare l'aumento del pull di ferro presente nella microglia, negli oligodendrociti e negli astrociti. Concludendo, questi eventi vanno a formare un ciclo che si auto-riproduce, in cui si verifica

l'ossidazione della DA, con relativi danni causati dal ferro libero e perdita di neuromelanina. Tutto ciò indirettamente può danneggiare il proteosoma 26S, ottenendo come conseguenza un'accelerazione della condensazione proteica dell' α -sinucleina e concomitante produzione di altre specie radicaliche capaci di ossidare le strutture cellulari, amplificando il danno (*Mastore M et al. 2005*).

1.6 Tecniche elettrochimiche di rilevazione di dopamina e di perossido di idrogeno

Nello studio inerente il mondo delle neuroscienze si sono fatti sempre più strada i metodi elettrochimici. Essi sfruttano le capacità di un dispositivo, in particolare un elettrodo, sulla cui superficie si verificano processi di trasferimento di cariche elettriche. I metodi elettrochimici voltammetrici quali l'amperometria, la polarografia e la voltammetria applicano un dato potenziale al fine di rilevare un flusso di corrente all'elettrodo (*Zuman P. 2006*). I metodi elettrochimici, i quali necessitano di mezzi conduttivi, trovano un ambiente perfetto per la loro applicazione negli ambienti biologici studiati dai neuroscienziati, in funzione dell'enorme forza ionica presente. Le tecniche elettrochimiche trovarono la loro prima applicazione già degli anni '50 quando Clark fu in grado di monitorare l'ossigeno disciolto nel sangue ed altri tessuti grazie ad un elettrodo in Pt su cui verificava la riduzione della molecola in questione (*Cummins AJ et al. 1950*). In seguito lo stesso Clark mise a punto elettrodi a base di carbonio per esaminare l'ossidazione di acido ascorbico (AA) ed idrogeno (H) (*Clark LC et al. 1965*).

1.6.1 Voltammetria ciclica

Tra le tecniche voltammetriche più comunemente utilizzate annoveriamo la voltammetria ciclica (CV) (fig. 5: A) che viene impiegata per lo studio delle proprietà elettrochimiche di coppie redox su superfici elettroattive (*Manea F. 2014*). Il potenziale viene variato effettuando una scansione lineare da un potenziale iniziale, in cui la specie si trova in uno stato elettroinattivo, verso potenziali a cui la specie si ossida (potenziali positivi) o si riduce (potenziali negativi) e ritorna al potenziale iniziale. Il voltammogramma risultante (corrente vs potenziale) assumerà un andamento ciclico (*Borland LM et al. 2007*). La CV solitamente non è utilizzata come tecnica per l'analisi quantitativa per via della sua scarsa sensibilità. Tuttavia tale tecnica è utile per consentire di identificare qualitativamente l'analita, in quanto ogni voltammogramma risulterà unico per posizione sull'asse xy e per la sua forma. Inoltre la CV fornisce informazioni

sulla reversibilità di un sistema e permette di studiare le specie intermedie transienti che si possono eventualmente formare.

Usualmente viene registrata una corrente di fondo, propria del sensore e caratteristica per esempio del materiale utilizzato, o dell'area stessa del sensore, nonché dalla matrice in analisi. In seguito vengono registrate le variazioni di correnti generate durante la scansione dei potenziali nonché vari picchi determinati dall'aggiunta di un determinato analita in soluzione. A questo voltammogramma si sottrae la linea di base, ovvero il voltammogramma caratteristico del sensore, registrato in assenza dell'analita in studio, in modo da avere la corrente effettiva relativa alla molecola e in modo anche da standardizzare le analisi di diverse molecole effettuate sullo stesso sensore amperometrico (*Rice ME et al. 1989*).

Per quanto riguarda la DA, la CV risulta essere particolarmente interessante in quanto fornisce un voltammogramma caratteristico e diverso da quello dell'AA, consentendone l'esatta identificazione (*Broderick PA et al. 2000*).

Solitamente la scansione dei potenziali durante l'esecuzione della voltammetria inizia da valori di potenziale negativi verso quelli più positivi del potenziale di ossidazione della DA; da qui la scansione si inverte per tornare ai valori iniziali di potenziale, più negativo rispetto al suo potenziale di riduzione (*Threlfell S et al. 2007*).

Per il monitoraggio del rilascio della DA in vivo viene preferibilmente utilizzata la voltammetria a scansione rapida (FSV) in quanto è in grado di ridurre il composto formato in seguito alla ossidazione della molecola in esame, ed inoltre prevede un breve periodo di campionamento producendo un segnale più affidabile (*Rodeberg NT et al. 2017*).

I picchi rilevati rispettivi ai fenomeni di ossidazione e riduzione della DA sulle superfici degli elettrodi sono molto variabili. Questa variabilità è dovuta a fattori quali il materiale che costituisce il sensore, il pH della soluzione utilizzata, nonché l'elettrodo di riferimento usato, ma anche altri parametri quali, ad esempio, la velocità di scansione. Come detto precedentemente la CV è in grado di discriminare tra sostanze diverse, per esempio benché la serotonina (5-HT) abbia un picco di ossidazione molto simile a quello della DA, presenta due picchi in riduzione molto diversi da quelli della DA utilizzando sensori in pasta di C a pH neutro (*Conti JC et al. 1978*). Per le sue caratteristiche, il voltammogramma della DA può essere utilizzato come impronta della DA stessa, e quindi per la sua identificazione.

1.6.2 Voltammetria ad impulsi differenziali

È ormai dimostrato che la voltammetria ad impulsi differenziali (DPV) (fig. 5: B) sia una tecnica a più alta risoluzione e maggiormente sensibile, rispetto a tecniche quali la CV, per l'analisi del comportamento elettrochimico di specie reattive presenti sulla superficie dell'elettrodo (Bard AJ et al. 2001). Ciò che la rende così sensibile è il fatto che si riesca ad eliminare la corrente capacitativa, risultando in un voltammogramma finale a forma di picco dove sarà presente solamente la corrente faradica. Alla scansione lineare della CV si aggiungono una serie di impulsi di ampiezza costante, e registrando la differenza di corrente tra immediatamente prima e negli ultimi istanti dell'impulso si è in grado di ottenere una misura meno influenzata dalla corrente capacitativa (Cottis RA. 2001). Questa tecnica è capace di produrre due (o tre) picchi distinti per varie molecole che hanno potenziali di ossidazione molto vicini fra loro, come possono essere la DA, l'AA e l'acido urico (UA) (Ensafi AA et al. 2010). In questo modo si è in grado di analizzare queste molecole simultaneamente, mentre con le altre tecniche solitamente è possibile determinarne solo una, in funzione delle modifiche apportate sulla superficie dei sensori amperometrici (Jacobs CB et al. 2010).

1.6.3 Voltammetria ad onda quadra

La voltammetria ad onda quadra (SWV) (fig. 5: C) è un miglioramento della DPV. In tale tecnica all'elettrodo viene applicata una tensione che varia rapidamente a scalini. A questi scalini viene applicata un'onda quadra da 20 a 100 Hz. Anche qui la corrente viene misurata due volte: alla fine dell'impulso diretto e alla fine dell'impulso di ritorno. Quando otteniamo una durata dell'impulso molto veloce la specie elettroattiva si scarica (coppia redox reversibile), mentre nella seconda fase i prodotti subiscono il processo inverso (se prima si erano ridotti, ora si ossideranno). Queste correnti sono successivamente sommate, ottenendo così una tecnica differenziale ancora più sensibile della DPV (Mirceski V et al. 2007). Esistono anche dei fattori che consentono di aumentare la sensibilità della SWV quali l'ampiezza dell'onda quadra o la frequenza. Anche qui la corrente capacitativa è limitata in quanto la corrente viene determinata alla fine dell'impulso, ovvero quando la corrente di carica del doppio strato elettrico, che si origina al confine tra la superficie dell'elettrodo e la soluzione, è minima. Anche mediante questa tecnica è possibile determinare simultaneamente AA, UA e DA (Gao Z et al. 1998).

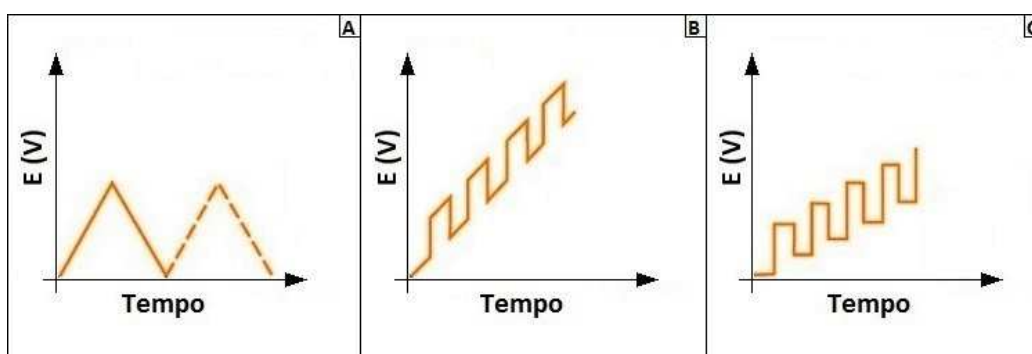


Figura 5: Tecniche voltammetriche. A: voltammetria ciclica; B: voltammetria ad impulsi differenziali; C: voltammetria ad onda quadra.

1.6.4 Amperometria

L'amperometria è una particolare misura voltammetrica, effettuata a potenziale applicato definito, tramite la quale la corrente misurata è proporzionale alla concentrazione dell'analita elettroattivo in studio. I fenomeni di ossidazione e riduzione, che avvengono sulla superficie dell'elettrodo a carico degli analiti presenti in soluzione, determinano un flusso di elettroni che genera una corrente elettrica, rilevabile tramite misurazione elettrochimica (*Swaddle TW et al. 1997*). L'amperometro misura la corrente che si genera sulla superficie dell'elettrodo in seguito ad ossidazione della molecola in studio; mentre quando avviene una riduzione, si avrà un passaggio di elettroni dall'elettrodo all'analita (*Justice Jr. JB et al. 1985*). A seconda del flusso di corrente si potrà quindi definire se il nostro analita è un ossidante o un agente riducente. Chi decide invece se l'elettrodo debba comportarsi da riducente o ossidante è lo sperimentatore che vi applica un determinato potenziale. A potenziali negativi l'elettrodo si comporterà come agente riducente, al contrario, applicando potenziali positivi, il nostro elettrodo si comporterà da ossidante. L'elettrodo necessita di un reale contatto con gli elettroni liberi presenti nella soluzione e la velocità della diffusione elettronica è un importante parametro nella effettiva velocità di reazione di riduzione od ossidazione elettrochimica. Le molecole in soluzione si muovono casualmente, in maniera molto simile al moto Browniano. Il trasporto delle molecole avviene secondo gradiente di concentrazione, che nei sistemi elettrochimici, corrisponde a quello delle reazioni di riduzione ed ossidazione che avvengono sulla superficie dell'elettrodo (*Ganzinger U et al. 1986*). La diffusione viene descritta dalla prima legge di Fick (*Galdzicki Z et al. 1984*):

$$i = nFAD \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0}$$

La DA viene rilevata amperometricamente fornendo un potenziale all'elettrodo di lavoro in grado di ossidarla. Questo potenziale viene determinato sperimentalmente in quanto esso dipende dal materiale utilizzato per la costruzione dell'elettrodo e da tutte le condizioni sperimentali messe in atto. In letteratura sono presenti numerosi lavori dove questo potenziale si trova in un intervallo tra i +300 e +800 mV contro un elettrodo di riferimento Ag/AgCl (*Tse DC et al. 1976*). La corrente che viene generata sulla superficie dell'elettrodo è di fatto proporzionale al numero di molecole presenti nella matrice. Inoltre queste misurazioni non risentono della corrente non faradica residua e non sono influenzate da ioni bivalenti quali il Ca^{2+} e variazioni di pH, di cui invece risente la FSV. Questo è molto utile ad esempio per studi sulla dipendenza ionica del rilascio della DA. Ma lo studio sul rilascio di questa neuroamina ha trovato subito degli ostacoli; infatti il suo potenziale di ossidazione è molto simile a quello dell'AA o dei suoi metaboliti quali il DOPAC, norepinefrina (NE) e serotonina, per esempio sui trasduttori in carbonio (5-HT).

Lo studio dell'HP invece si è affermato oltre che in campo clinico, anche in altri ambiti quali salvaguardia dell'ambiente e nell'industria. Per il suo rilevamento si può ricorrere a numerose tecniche sia elettrochimiche, che spettrofotometriche, che voltammetriche (*Gao F et al. 2007*). Oltre alla partecipazione alla cascata che produce stress ossidativo ed all'ossidazione della DA, si è visto che l'HP può anche determinare l'inibizione del rilascio stesso della DA (*Avshalumov MV et al. 2003*). Per lo studio dell'HP si è visto che tecniche quali microdialisi o chemiluminescenza sono alquanto riduttive perché non forniscono un quadro completo di come varia nel tempo la concentrazione endogena durante attività neuronale. Hanno quindi preso sempre più spazio negli ultimi anni i biosensori amperometrici per il monitoraggio dell'HP (*O'Brien KB et al. 2007*).

1.6.5 Cronoamperometria

La cronoamperometria (CA) è utilizzata quando la reazione di ossido-riduzione che si vuole studiare è governata dalla diffusione che esiste in un'area a distanza d dall'elettrodo. La soluzione è mantenuta a temperatura costante e non è sottoposta ad agitazione. Per questo la CA è il metodo più semplice per la comprensione della legge di Fick. Infatti l'elettrodo si trova ad un potenziale in cui non avvengono reazioni né di ossidazione né di riduzione, detto potenziale di riposo. Esso viene aumentato in modo da iniziare una reazione elettrochimica. In questo modo si va a generare un gradiente di concentrazione tra superficie dell'elettrodo e la soluzione in cui è immerso andando così ad iniziare la diffusione delle molecole verso di esso. Si viene a generare una seconda

sorgente di corrente quando si va a cambiare il potenziale, definito come corrente di carica. Il processo elettrodico è governato dall'equazione di Cottrell, in cui vengono messi in relazione il tempo di applicazione del potenziale e la corrente faradica presente in cella (*Schaschke C. 2014*)

1.6.6 Amperometria a potenziale costante

Nel caso dell'amperometria a potenziale costante (CPA) o a corrente continua, viene applicata una d.d.p. costante tra gli elettrodi di lavoro (WE), presenti nella cella elettrochimica, e l'elettrodo di riferimento (RE). La CPA è l'applicazione principale per il rilevamento di ammine aromatiche e fenoli, mediante l'utilizzo di elettrodi in C (Schönfuss D et al. 2001).

1.7 Sensori amperometrici e materiali che li costituiscono

Le rilevazioni voltammetriche ed amperometriche vengono condotte in una cella elettrochimica. Essa è costituita da: uno o più WE, un contro-elettrodo o ausiliario (CE) e un RE, immersi in una soluzione elettrolitica.

La reazione di ossido-riduzione dell'analita avviene sulla superficie dei WE e la corrente sviluppata viene misurata sulla superficie del CE. La corrente misurata risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita, secondo l'equazione di Nernst. La d.d.p. applicata viene stabilita dalla presenza di un opportuno RE. La soluzione elettrolitica contiene specie ioniche in grado di garantire un flusso di cariche tra gli elettrodi.

Il flusso di elettroni passa dal WE al CE nel caso di reazione di ossidazione, viceversa in caso di reazione di riduzione gli elettroni passeranno dal CE al WE.

In soluzione si verificheranno delle reazioni di ossidazione o riduzione in funzione della polarizzazione degli WE. La caratteristica dei sensori è di avere la capacità di interagire, grazie alla loro superficie chimicamente sensibile, con gli analiti presenti in soluzione. I sensori elettrochimici sono classificabili in tre categorie, in funzione del metodo di trasduzione del segnale: essi quindi possono essere conduttimetrici, potenziometrici e amperometrici (voltammetrici). Nel caso specifico dei sensori amperometrici viene applicata una d.d.p. tra RE e WE e viene misurata la corrente generata dalle reazioni di ossidoriduzione che coinvolgono l'analita. La d.d.p. può essere fissa nel caso dell'amperometria o variabile nel caso della voltammetria. La superficie del sensore può essere modificata in funzione dei composti da studiare e, soprattutto, della matrice in

cui essi si trovano in modo da massimizzare la sensibilità nei confronti dell'analita in studio e minimizzare i segnali derivanti da specie interferenti. Un esempio può essere fatto con il Nafion, polimero a scambio ionico caricato negativamente, utilizzato per la concentrazione di specie cationiche (*Adhikari B et al. 2004*). I materiali più comunemente utilizzati per la fabbricazione dei sensori amperometrici sono il carbonio, ed i suoi allotropi, ed il platino (Pt), in funzione delle loro proprietà catalitiche. Il Pt inoltre fornisce un miglior rapporto tra il segnale ed il rumore, l'opportunità di lavorare in assenza di elettrolita di supporto e la possibilità di fabbricazione in laboratorio di microelettrodi che contano dimensioni inferiori ai 25 μm (*Rothwell SA et al. 2009*). I sensori amperometrici trovano applicazione in numerosi campi, tra i quali il monitoraggio di specie chimiche nel cervello di animali, il monitoraggio di diverse molecole in colture cellulari (*Migheli R et al. 2008*), in tessuti, ma anche in matrici agrifood (*Barberis A et al. 2014*).

1.7.1 Platino

Attualmente il Pt è il materiale più comunemente utilizzato per il monitoraggio di HP in quanto mostra delle spiccate capacità catalitiche nei confronti di questo analita. Infatti è il materiale che viene prevalentemente utilizzato per la costruzione di biosensori enzimatici amperometrici, che sfruttano la produzione di HP come prodotto secondario nella reazione di trasformazione enzimatica (*Hall SB et al. 1998*).

Per quanto riguarda la DA, Hubbard ha ben documentato come la sua ossidazione a due elettroni in solvente acquoso porti ad un assorbimento chimico del fenolo sulla superficie degli elettrodi in Pt. Diversi fattori influenzano questo fenomeno, come la struttura molecolare dell'analita, il potenziale applicato all'elettrodo, la concentrazione dell'analita e la temperatura di lavoro (*Hubbard AT et al. 1984*). La tecnica elettrochimica che permette di ovviare questo problema della formazione di un film di catecolammine sulla superficie di Pt è la DPV (*Lane RF et al. 1976*).

1.7.2 Carbonio

I sensori al carbonio in tutte le sue forme quali grafite, fibre di carbonio, nanotubi, carbonio vetroso, hanno preso sempre più piede negli ultimi decenni per via delle loro caratteristiche analitiche nelle analisi elettrochimiche relative alle catecolammine sia in campo medico che in campo agronomico (Walcarious A et al. 2014). Essi sono facilmente fabbricabili, permettendo di creare sensori con diverse dimensioni e configurazioni; facilmente miniaturizzabili in modo tale da rendere possibile il loro utilizzo in esperimenti in vivo o in colture cellulari (Migheli R et al. 2008) e posseggono una forte stabilità meccanica e chimica. I primi elettrodi sviluppati per monitorare il rilascio di DA in vivo sono stati costruiti in pasta di carbonio e resina epossidica, utilizzata per aumentarne la stabilità (O'Neill RD et al. 1982). Successivamente essi sono stati sostituiti da microelettrodi in fibra di carbonio, tutt'oggi utilizzati in esperimenti in vitro ed anche in vivo. Un problema non ancora risolto del tutto resta quello dell'interferenza da parte di altre molecole elettroattive presenti nelle matrici quali AA, E ed UA, che sono presenti nel compartimento cerebrale, tutte ossidabili più o meno nello stesso range di potenziale, determinando una sovrapposizione di segnali nella corrente finale (Jackowska K et al. 2013).

1.7.2.1 Ossido di grafene

I fogli sfaldati rappresentano distorte reti di carbonio che posseggono gruppi carbossilici, gruppi idrossilici, ossigeno e gruppi funzionali come l'ossido di grafene (GO) (fig. 6: A). Questi gruppi funzionali consentono la sospensione di fogli di GO in acqua ed altri solventi polari (Kaminska I et al. 2012). GO mostra buona idrofilia e risulta facilmente disperdibile in acqua perché contiene un gran numero di gruppi funzionali idrofili, quali -OH, -COOH ed epossidi sul piano basale e il bordo della lastra (Dreyer DR et al. 2010). La conducibilità del GO non è così elevata se comparata col grafene, ma GO viene comunque considerato come un candidato adatto per analisi biosensoristica, grazie al suo effetto su scala nanometrica, le proprietà di superficie e la forte affinità con le molecole biologiche. (Li D et al. 2008). In letteratura è possibile trovare numerosi lavori in cui si è in grado di determinare DA anche in presenza di AA su sensori all'ossido di grafene. (Gao F et al. 2003; Bahrami S et al. 2016; Mao H et al. 2016; Wang D et al. 2017. Taylor IM et al. 2017).

1.7.2.2 Nanoparticelle di grafene

Le nanoparticelle di grafene (GNANO) (fig. 6: B) sono diventate sempre più utilizzate nella rilevazione elettrochimica e nella quantificazione di piccole molecole. Le nanoparticelle di carbonio possono essere ottenute dai carbonanotubi (CNTs) (*Lim CS et al. 2014*). Per ottenere le nanoparticelle si procede con l'intercalare di piccole molecole, quali acido solforico e acido nitrico, o l'idrossido di tetrabuttilammonio, tra i vari strati di grafene, portando così alla formazione di grafite, e conseguentemente alla separazione in GNANO (tramite sonicazione od evaporazione termica delle molecole intercalate) (*Pumera M. 2010*).

1.7.2.3 Grafene ridotto

I fogli di ossido di grafene ridotto (RGO) (fig. 6: C) sono stati studiati come metodo atto alla produzione di un maggior numero di fogli di grafene in soluzione. Grazie al controllo del processo di riduzione del grafene, sia per via chimica che termica, il RGO offre una varietà di proprietà elettroniche. Il materiale è da ritenersi d'elezione per la costruzione di sensori, elettrodi e transistor, visto il suo basso costo di produzione, la sua flessibilità meccanica e la facilità nel lavorarlo. Possedendo una vasta area bidimensionale, è possibile caricare nanoparticelle sulla sua superficie (*Muszynski R et al. 2008*). Grazie a questo materiale è possibile determinare con tecniche quali CV e DPV diversi analiti presenti simultaneamente nella stessa soluzione quali per esempio UA e DA (*Liu X et al. 2012*).

1.7.2.4 Fullereni

I fullereni (C60, C70, C80-C200), ovvero nanosfere di carbonio, sono noti per le loro proprietà biologiche, ovvero sfruttare la possibilità di introdurre all'interno della sfera atomi di altri elementi o piccole molecole (*Kroto HW et al. 1985*). Il fullerene non è molto reattivo ed è insolubile nella maggior parte dei solventi, caratteristica dovuta alla stabilità dei suoi legami molto simili a quelli della grafite. Oltre allo sviluppo di sensori con deposizione di fullerene, è stato visto come i carbossifullereni, derivati polari del C60 (più piccola molecola di fullerene) (fig. 6: D), posseggano la capacità di superare le membrane lipidiche, agendo come potenti neuroprotettivi e comportarsi da *scavenger* nei confronti dei radicali liberi (*Dugan LL et al. 2001*).

1.7.2.5 Carbonanotubi

I fullereni hanno una forma sferica e la loro struttura tende ad arrotolarsi su sé stessa, andando a formarne una cilindrica, che costituisce i CNTs. Essi si dividono in due sottoclassi: a parete singola (SWCNTs) (fig. 6: E) e a parete multipla (MWCNTs). I SWCNTs possono essere conduttori di corrente o semiconduttori a seconda del diametro o di come i legami C-C sono disposti sulla circonferenza del tubo (*Azamian BR et al. 2002*). Numerosi studi sono stati condotti per renderli solubili in acqua in modo da aumentarne la biocompatibilità e da ridurre la loro citotossicità (*Liu Y et al. 2010; Koh B et al. 2011; Deng Y et al. 2014*). La struttura è molto simile a quella della grafite. Grazie all'utilizzo dei CNT in studi elettrochimici è possibile vedere da una semplice CV l'ossidazione a due elettroni della DA a dopachinone, rispetto che con un elettrodo di carbonio semplice (*Britto PJ et al. 1996*).

1.7.2.6 Nanofibre di carbonio

Le nanofibre di carbonio (CNF) (fig. 6: F) sono strutture filamentose, aventi diametro dell'ordine dei 100 nm. I piani grafiticici formano degli angoli con l'asse della fibra, ed in base a questi angoli si ottengono diversi tipi di CNF come per esempio CNF tubolari, con i piani paralleli all'asse e le nanofibre platelet, con i fogli di grafite perpendicolari all'asse. Tramite preparazione di sensori con CNF, si ottiene un miglioramento delle proprietà del sensore, anche se minore rispetto ai CNTs. Tuttavia a differenza dei CNTs, le CNF sono molto più economiche e quindi costituiscono una valida alternativa ai CNTs. Per questa caratteristica le CNF sono state ampiamente utilizzate in elettrochimica per il rilevamento di neuroammine, quali la DA. Recentemente dei ricercatori hanno progettato un elettrodo in grado di ottenere un LOD per la DA di 0.00005 μM in fluidi biologici (*Rodthongkum N et al. 2013*).

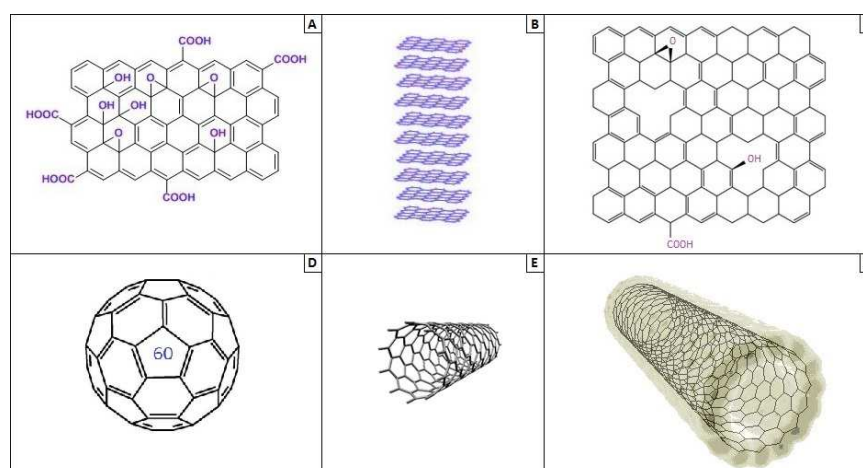


Figura 6: Allotropi del carbonio. A: GO; B: GNANO; C: GRO; D: Fullerene C60; E: SWCNTs; F: CNF.

1.8 Acido ascorbico ed altri interferenti

L'AA, o vitamina C, svolge un ruolo importante nello sviluppo cellulare, nella sintesi di vasi sanguigni, delle ossa, del collagene, dei tendini e nella guarigione da ustioni e ferite (*Iqbal K et al. 2004*). AA viene assunto esclusivamente tramite la dieta, infatti è contenuto in verdura, frutta, ed agisce come un potente antiossidante. Per questo è sempre stato di grande interesse sviluppare un metodo rapido ed affidabile per la sua determinazione, sia per applicazioni diagnostiche che alimentari. Nel primo lavoro atto allo studio di sostanze neuroattive endogene in vivo nello striato di ratto utilizzando la voltammetria ed elettrodi miniaturizzati in pasta di carbonio (*Kissinger PT et al. 1973*), sebbene l'obiettivo principale fosse quello di monitorare la DA presente, la molecola maggiormente rilevata in assenza di stimoli era l'ascorbato. Ciò ha rallentato gli studi sul rilascio della DA ed il fulcro degli esperimenti è stato quindi spostato verso la ricerca di metodi per ovviare a questo problema. Dapprima si è pensato ad una modifica della superficie dell'elettrodo che permettesse il rilevamento di AA e di DA a potenziali diversi. L'ossidazione dell'AA è irreversibile ed aumenta il potenziale richiesto per l'ossidazione della DA alla superficie dell'elettrodo di carbonio non modificata. L'utilizzo di un pretrattamento anodico della superficie ridusse la sovratensione dell'AA di circa +200 mV rendendo possibile la simultanea lettura di DA e AA (*Gonon FG et al. 1980*). Un altro metodo utilizzato per ridurre l'interferenza dell'AA è stato quello di rivestire i sensori col Nafion[®], che va a respingere specie cariche negativamente quali AA, per via elettrostatica (poiché esso è carico negativamente) ma risulta permeabile alla DA (*Wiedemann DJ et al. 1990*). L'interferenza causata da AA è

così marcata in quanto l'anione ascorbato è la molecola maggiormente presente a livello cerebrale (circa 200-400 μM).

Il DOPAC e l'HVA sono i principali metaboliti della DA. L'ammontare del DOPAC cerebrale si aggira intorno ai 20-30 μM , mentre la concentrazione di DA è molto più bassa. Per superare l'interferenza dovuta al fatto che anche la molecola di DOPAC ossida sulla superficie degli elettrodi ad un potenziale molto vicino a quello necessario per l'ossidazione della DA si può ricorrere anche in questo caso all'utilizzo di elettrodi ricoperti col Nafion[®] (*Pihel K et al. 1996*).

Altre molecole che interferiscono con il rilevamento della DA sono la NE e la 5-HT. Il livello di interferenza è dato anche dall'innervazione in una determinata area cerebrale. Per esempio nello striato dorsale la DA è la sola molecola rilevata per via dell'alta densità di neuroni dopaminergici. Quando si utilizza la FCV, la 5-HT è ben discriminabile rispetto alla DA per via del voltammogramma caratteristico, cosa che non si può dire per la NE (*Zhu M et al. 1997*).

1.9 Polimeri per schermare gli interferenti: pDA, pNE ed altri

Per ovviare al problema dell'interferenza da parte di molecole elettroattive nella rilevazione della DA, oltre alle tecniche citate precedentemente si sono fatti sempre più strada i polimeri, depositati elettrochimicamente sul sensore in modo da impedire che gli interferenti raggiungano la superficie dello stesso.

Un alto contenuto di DA e lisina (Lys) è stato trovato nella proteina adesiva MEFP-5 dei mitili situato nella parte superiore del tampone adesivo (*Danner EW et al. 2012*). Studi su questa proteina hanno portato alla scoperta di un polimero utilizzabile nell'ambito dell'elettrochimica. La polidopamina (pDA) si forma in seguito ad ossidazione della DA che presumibilmente forma legami covalenti con le altre molecole di DA. La sua struttura è ancora in discussione. Recentemente è stata proposta una nuova forma di pDA in cui le molecole che la formano sono tenute insieme da legami idrogeno tra gli atomi di ossigeno (*Mrowczynski R et al. 2013*). Quando una soluzione contenente DA viene esposta all'aria, dopo un po' il colore vira da trasparente a rosato a causa della sua ossidazione. La pDA così formata presenta una struttura aromatica con gruppi catecolo, i quali conferiscono al polimero l'adesione al supporto su cui viene depositato (*Lee H et al. 2007*).

La NE, composto strutturalmente analogo e derivato della DA, è in grado di formare anch'esso un film aderente sulle superfici degli elettrodi, grazie ad una polimerizzazione per via ossidativa in condizioni alcaline (*Kang SM et al. 2011*).

L'orto-fenilendiamina (*o*-PD) è una diamina aromatica con formula $C_6H_4(NH_2)_2$. La deposizione del polimero sulla superficie del sensore è abbastanza immediata e non difficoltosa: viene depositata elettrochimicamente a partire dal suo monomero *o*-PD a pH neutro per andare a produrre un sottile film isolante di polifenilendiamina (pPD). Oltre alla capacità di ridurre l'interferenza verso AA e di essere al contrario altamente permeabile all'HP, si è visto inoltre rallentare il processo di deposizione di particolato sulla superficie del sensore che ne potrebbe compromettere le funzionalità. Inoltre viene utilizzato in alcuni casi per l'immobilizzazione dell'enzima sull'elettrodo (*Killoran SJ et al. 2008*). Poiché il monomero è un composto tossico, si sta cercando di sostituire l'*o*PD con prodotti più sicuri, come magnololo ed isoeugenolo (*Monti P et al. 2017*), in grado anch'essi di dare la formazione di polimeri ad alto potere schermante nei confronti delle specie interferenti.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Da numerosi studi è stato evidenziato che lo stress ossidativo è uno dei principali responsabili della morte dei neuroni dopaminergici a livello nigro-striatale. Come affermato nei capitoli precedenti, questo è uno delle cause alla base del morbo di Parkinson, durante il quale i ROS si rendono responsabili dell'ossidazione non enzimatica della DA. Tale processo porta a sua volta ad una produzione di radicali liberi i quali determinano una amplificazione del danno a livello della via dopaminergica. Lo scopo della tesi è stato quello di riprodurre in vitro, un ambiente che desse la possibilità di studiare le interazioni tra molecole realmente presenti nel SNC quali DA, HP ed AA, discriminandole in tempo reale. In questo studio è stato sviluppato un sistema elettrochimico in grado di monitorare l'autossidazione della DA, indotta dall'HP, sfruttando le diverse proprietà catalitiche intrinseche ai materiali utilizzati come trasduttori elettrochimici. Il sistema utilizzato per la caratterizzazione dei sensori è costituito da una cella elettrochimica contenente una soluzione salina (PBS) a pH 7.4, la quale riproduce l'ambiente extracellulare cerebrale, un RE in Ag/AgCl, un CE (in platino) e due WE, uno in epoxycarbon (Ep) e l'altro in Pt. Entrambi i sensori sono stati ricoperti da diversi polimeri permeselettivi in grado di ridurre l'interferenza creata dall'AA e dal DOPAC, i quali sono stati considerati come specie elettroattive interferenti di riferimento. Il sistema è in grado di registrare le interazioni di ossido-riduzione tra DA e HP in tempo reale ed in fase omogenea, anche in presenza di molecole interferenti quali AA ed altri anioni elettroattivi (DOPAC, UA, 5-HIAA) generalmente presenti nei fluidi del sistema nervoso centrale. Più nello specifico, il sistema sviluppato permette di osservare l'ossidazione di HP sulla superficie del sensore in Pt, mentre sulla superficie a base di epoxycarbon è possibile registrare solo quella della DA, sfruttando anche le qualità aggiuntive schermanti apportate dalla deposizione di specifici polimeri. Questa selettività permette di discriminare tra le due molecole e di registrare le loro variazioni in fase omogenea tramite CPA. Inoltre il lavoro svolto presso il laboratorio di Timisoara ha permesso di selezionare un materiale capace di discriminare DA ed AA con tecniche elettrochimiche quali SWV e DPV senza l'utilizzo di polimeri. La SWV e la DPV sono maggiormente sensibili e avanzate rispetto alla tecnica della CV. Queste caratteristiche permetteranno ulteriori e più approfonditi studi in questa direzione, al fine di progettare un sistema elettrochimico in grado di essere permeabile alla DA e quasi totalmente insensibile all'AA, in maniera tale da eliminarne l'interferenza che si registra con tecniche meno sensibili quali CPA e CV.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti e soluzioni

Tutte le sostanze chimiche utilizzate sono state disciolte in acqua deionizzata bidistillata (MilliQ®). HP, DA, AA, DOPAC, NE, acido cloridrico (HCl), acido metafosforico (MPA), GO, GNANO, fullerene-C60 (FC60), SWCNTs, CNF, *o*-PD, diidrogenofosfato di potassio (KH₂PO₄), idrogenofosfato di disodio (Na₂HPO₄), cloruro di sodio (NaCl), idrossido di sodio (NaOH), polvere di grafite, resina epossidica, dimetilformammide (DMF), acido cloroaurico (HAuCl₄), acido cloroplatinico (H₂PtCl₆), sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano). RGO è stato acquistato dalla DropSens. L'1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato è stato acquistato dalla Merck. La soluzione utilizzata per l'elettrosintesi di pDA, polinorepinefrina (pNE) e poliDOPAC (pDOPAC) è costituita come segue: KH₂PO₄ (0.066 M) e Na₂HPO₄ (0.066 M) e tamponata a pH=8. Le calibrazioni sono state eseguite in soluzione fosfata salina (PBS, 0.05 M, pH 7.4), preparata dissolvendo 0.15 M NaCl, 0.05 M NaH₂PO₄ e 0.04 M NaOH. Le soluzioni di DA (1 M, 100 mM), AA (100 mM) e NE (1 M, 100 mM) sono state preparate in HCl 0.01 M e conservate a - 80° sino all'uso; la soluzione di HP (100 mM) è stata preparata in acqua ultrapura (HPLC grade) immediatamente prima dell'uso; il DOPAC (100 mM) è stato dissolto in MPA 0.01 M. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti sotto condizioni standard di pressione e temperatura. Il Pt ricoperto di Teflon® (90 % Pt, 10 % Ir; Ø = 125 µm) è stato acquistato da Advent Research Materials (Eynsham, Inghilterra). Per gli esperimenti svolti nel laboratorio di Sassari è stato utilizzato un potenziostato a 4 canali (eDAQ QuadStat, e-Corder 410, eDAQ, Australia), mentre gli esperimenti svolti presso il laboratorio di Timisoara sono stati eseguiti tramite l'ausilio di un potenziostato PGStat 302 (Autolab, Utrecht, The Netherlands; software GPES 4.9005).

3.2 Cella elettrochimica

La cella elettrochimica è costituita da un contenitore di vetro, contenente una soluzione elettrolitica (PBS, nel caso delle calibrazioni, soluzione tamponata a pH 8 nel caso delle polimerizzazioni) nel quale sono introdotti i tre elettrodi: WE (in Pt ed in Ep), RE (Ag/AgCl) e il CE, costituito da acciaio inossidabile, il quale possiede un'ampia superficie di scambio di elettroni. La cella possiede anche un sistema di agitazione elettromagnetico, tale da creare una distribuzione omogenea delle molecole in soluzione.

3.3 Costruzione del microsensore in Platino e dell'elettrodo in Carbonio

Il sensore in Pt è stato costruito rimuovendo una porzione del rivestimento isolante in Teflon[®] dai fili in modo da lasciare esposto 1 mm di metallo quale superficie attiva del sensore. Il capo opposto del filo è stato saldato ad un supporto metallico, per garantirne il contatto elettrico, dopo privazione di 3 mm di Teflon[®]. Il sensore Ep è stato preparato utilizzando un capillare in silicio (1 cm in lunghezza e 1.4 mm in diametro) all'interno del quale è stata inserita una pasta ottenuta dall'unione di polvere di grafite sintetica (54.5 %), resina epossidica (32.5 %) ed accelerante (13 %). La completa solidificazione della miscela epossidica è avvenuta dopo 60 minuti a 120° C. Il contatto elettrico è stato assicurato grazie ad una lunghezza di 1 mm del filo di rame immersa nel composto di Ep. Anch'esso è stato saldato ad un supporto metallico dopo rimozione di 3 mm di isolante. Il disegno dei sensori è rappresentato nella figura 7.

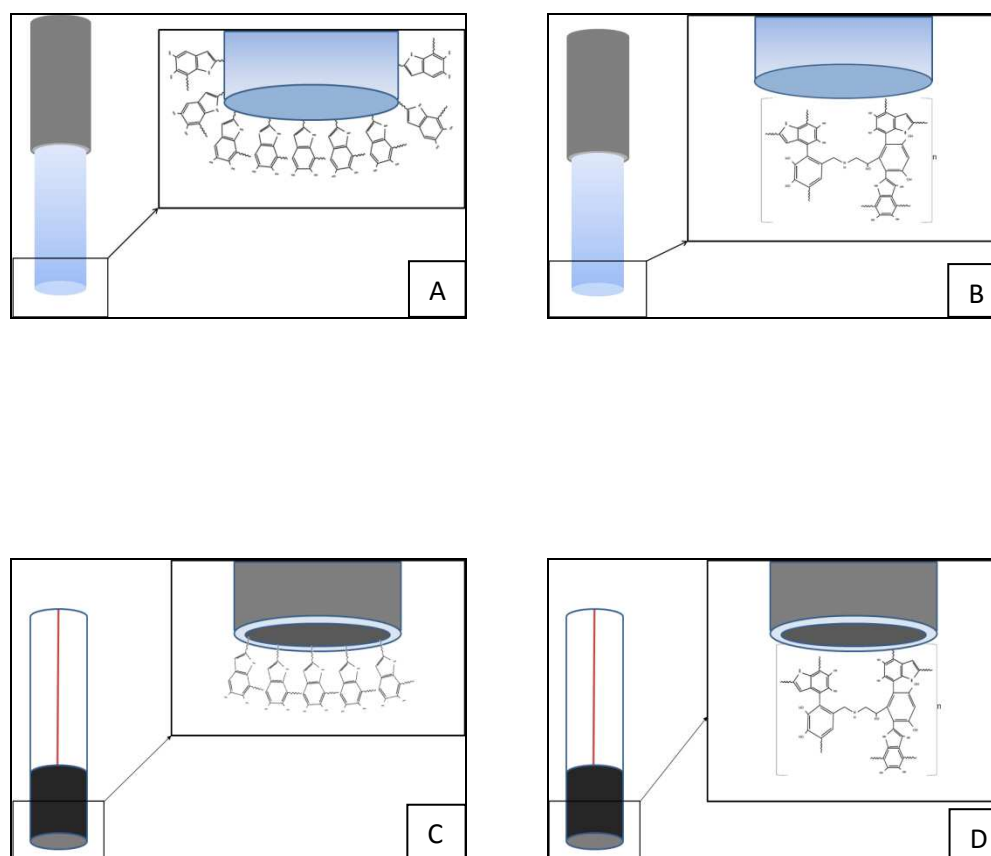


Figura 7: A: Disegno sensore Pt/pDA; B: Disegno sensore Pt/pNE; C: Disegno sensore Ep/pDA; D: Disegno sensore Ep/pNE.

3.4 Elettrosintesi

L'elettrosintesi dei vari polimeri è stata condotta tramite l'utilizzo della CPA, in quanto da esperimenti preliminari la deposizione condotta tramite CV non ha prodotto risultati soddisfacenti in termini di efficienza del polimero (dati non mostrati).

Preliminarmente, per determinare il potenziale di lavoro da applicare per eseguire la polimerizzazione di DA e NE, è stata effettuata una CV in soluzione a pH 8: tale valore di pH è stato scelto anch'esso in base ad esperimenti preliminari, in cui è stata testata l'efficacia della polimerizzazione in soluzioni a pH 5, 7.4, 8 e 12. I parametri utilizzati per la CV sono stati i seguenti: per i sensori Ep, intervallo di potenziale compreso tra -1.0 e $+1.0$ V, velocità di scansione 100 mV/s; mentre per i sensori Pt l'intervallo di potenziale era compreso tra -0.5 e $+1.0$ V, con velocità di scansione pari a 100 mV/s. La concentrazione di DA e NE utilizzata è pari a 10 mM: tale concentrazione è stata determinata in seguito ad esperimenti preliminari (dati non mostrati) effettuati con concentrazioni pari ad 1 mM, 10 mM e 100 mM. La polimerizzazione di DA e NE è stata quindi condotta in CPA applicando un potenziale di $+700$ mV vs Ag/AgCl per 30 minuti, con un fondo scala di 10 mA. Entrambe le polimerizzazioni sono state eseguite a pH 8 su diversi set di sensori in Pt ed in Ep, dopo calibrazioni delle molecole sul sensore precedentemente alla deposizione dello strato permeselettivo. Per quanto riguarda il DOPAC si è proceduto a verificare se anche questo composto desse luogo alla formazione di un polimero, in quanto non è presente nulla a riguardo in letteratura. Come per le altre molecole, è stato applicato lo stesso protocollo sperimentale. Per quanto riguarda la polimerizzazione dell'*o*-PD il protocollo utilizzato è differente. Sono stati pesati 648 mg di polvere di *o*-PD ed agitati energicamente per 5 minuti in una soluzione di PBS a pH 7.4 (20 ml) ottenendo così una concentrazione di 300 mM. La polimerizzazione è eseguita in CPA a $+700$ mV per 30 minuti direttamente nella soluzione precedentemente preparata.

3.5 Protocollo sperimentale per le calibrazioni in CPA

Tutti i sensori, sia Pt che Ep, sono stati caratterizzati eseguendo delle calibrazioni applicando un potenziale anodico costante di $+700$ mV vs Ag/AgCl, al fine di permettere un confronto tra i risultati. Il protocollo sperimentale ha previsto una preliminare calibrazione dei sensori non modificati, esponendo gli stessi a tutte le sostanze in studio nel range di concentrazioni indicato: HP ($0 - 100$ μ M), DA ($0 - 150$ μ M), AA ($0 - 1000$ μ M), DOPAC ($0 - 1000$ μ M), NE ($0 -$

150 μM). In seguito sono state condotte le elettrodeposizioni dei polimeri secondo il protocollo sperimentale indicato nel paragrafo 3.4 e successivamente i sensori modificati dalla deposizione del polimero sono lasciati immersi durante la notte in PBS pH 7.4 con potenziale applicato. Il giorno successivo sono state condotte le medesime calibrazioni eseguite precedentemente sui sensori non modificati, al fine di verificare quale impatto avesse la presenza del polimero sulla lettura di ogni sostanza.

Sui dati ottenuti da ogni calibrazioni è stata eseguita una regressione lineare per estrapolare i valori di slope (corrispondenti alla sensibilità del sensore), espressi come $\text{nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. I grafici sono stati ottenuti riportando in ordinata i valori di corrente ed in ascissa i valori degli slope ottenuti sullo stesso sensore prima e dopo l'elettrodeposizione del polimero. In particolare, è stata fissata una scala con valore massimo di ordinata pari a $1.2 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ in modo da rendere immediatamente chiare le differenze tra i diversi disegni di sensori. La prima colonna rappresenta la media degli slope delle calibrazioni del sensore nudo, mentre la seconda rappresenta la stessa calibrazione eseguita sullo stesso set di sensori dopo polimerizzazione in CPA.

3.6 Preparazione dei sensori Ep con gli allotropi del grafene

Nel laboratorio di Timisoara sono stati eseguiti degli esperimenti paralleli, volti a trovare un materiale ideale per la costruzione di sensori adeguati a monitorare l'ossidazione della DA e dell'AA a due differenti e distinguibili potenziali. Si è dapprima eseguito uno screening sui sensori Ep e sui sensori Ep con deposizione degli allotropi del C. GO è già disciolto 4 mg/ml di H_2O . I sensori Ep quindi sono stati immersi nella soluzione contenente GO per 3 volte lasciando tra un'immersione e l'altra 10 minuti affinché la soluzione di GO si asciugasse sulla superficie del sensore. Gli altri allotropi, sotto forma di polvere, sono stati disciolti in DMF ad una concentrazione pari a 4 mg/ml e poi sonicati al fine di ottenere una soluzione omogenea. Successivamente si è proceduto seguendo lo stesso protocollo di deposizione del GO. Il MOF C300 è stato preparato tramite metodiche elettrochimiche. L'acido benzentricarbossilico (BTC) 0.015 M (3.15 g) e tributilmetilammonio metil solfato (MTBS) 0.033 M (1.038 g) sono stati disciolti in 100 ml di etanolo al 96 % (78.5 g). Questa soluzione è stata scaldata a 40°C in una cella elettrochimica con due elettrodi in rame posti ad una distanza di minimo 3 cm. In seguito è stata applicata una corrente pari a 5 mA/cm^2 agli elettrodi per 60 minuti sotto continua agitazione. Il materiale prodotto è stato filtrato e pulito con etanolo a temperatura ambiente durante la notte, poi filtrato nuovamente ed asciugato a 100°C (*Martinez Joaristi A et al.*

2012). L'elettrodo CNF-MOF-C300-Ep è stato ottenuto tramite deposizione dello stesso sulla superficie dell'Ep. Il sensore finale è stato ottenuto con la seguente composizione: 25 % CNF, 25 % C300 e 50 % resina epossidica. Il sensore CNF è costituito da 50 % CNF e 50 % resina epossidica. Sui sensori è stato anche depositato, per alcune prove, l'1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, un IL disciolto nelle soluzioni dei vari allotropi del C. Il protocollo sperimentale ha previsto l'esecuzione degli esperimenti in un contenitore di vetro contenente PBS a pH 7.4. Su tutti i sensori sono state eseguite delle CV al fine di individuare i picchi di DA ed AA, applicando il medesimo schema sperimentale visto nel paragrafo 3.4.

Tali sensori sono stati caratterizzati tramite diverse tecniche elettrochimiche. Sui sensori sono state eseguite delle CA a 3 livelli con potenziale di -150 mV, 0 mV e $+300$ mV. Nelle CA il potenziale negativo, relativo al picco di riduzione della DA, è stato utilizzato per pulire la superficie del sensore da probabili molecole depositate, mentre 0 mV corrisponde al potenziale di ossidazione dell'AA e $+300$ mV al potenziale di ossidazione relativo alla DA. Per lo studio sull'effetto dello scan rate, il potenziale è stato impostato un intervallo compreso tra -1.0 e $+1.0$ V, mentre la velocità di scansione è stata impostata secondo diversi valori (0.01 , 0.02 , 0.03 , 0.04 , 0.05 , 0.075 , 0.1 , 0.2 V/sec). Per la DPV sono stati applicati i seguenti parametri: potenziale iniziale -0.25 V; potenziale finale $+0.7$ V; variazione del potenziale $+0.00495$ V; ampiezza di modulazione $+0.01$ V. Le calibrazioni sono state eseguite, dopo la registrazione di circa 10 linee di base per permettere la stabilizzazione del sensore, con DA (da 100 a 600 μM , con salti di 100 μM), con AA (da 200 μM a 1200 μM , con salti di 200 μM) e con AA (da 200 μM a 1200 μM , con salti di 200 μM) più una concentrazione di DA pari a 100 μM . Per la SWV le impostazioni sono le stesse della DPV con una frequenza di 25 Hz. Inoltre su alcuni sensori sono state eseguite delle elettrodeposizioni di Au (HAuCl_4 100 mM in 15 ml di PBS) e Pt (H_2PtCl_6 1 mM in 15 ml di Na_2SO_4) in CPA, a -200 mV, 30 secondi per l'Au e 400 secondi per Pt. Sui sensori Ep/GO sono state eseguite fotografie al microscopio a scansione elettronica (SEM, SEM Inspect S, FEI Company, The Netherlands). Sui dati ottenuti da ogni calibrazione è stata eseguita una regressione lineare per estrapolare i valori di slope (corrispondenti alla sensibilità del sensore), espressi come $\text{mA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Polimerizzazione di DA sui sensori Pt ed Ep

La figura 8 mostra il voltammogramma relativo al sensore Pt in soluzione a pH 8 e in presenza di DA 10 mM. Dal grafico risulta chiaramente la deposizione del polimero durante i cicli voltammetrici, caratterizzata da una riduzione progressiva del picco ossidativo, dovuta alla formazione di un polimero non conduttivo. La CV è stata eseguita utilizzando una velocità di scansione di 100 mV/s in un range compreso tra -0.5 e $+1.0$ V.

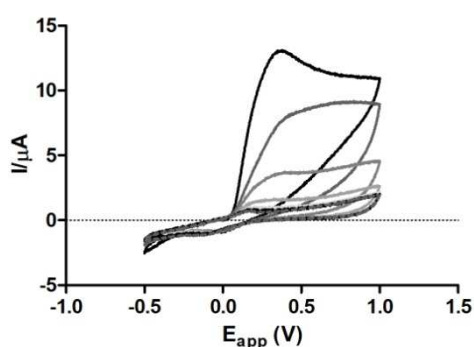


Figura 8: Polimerizzazione di DA 10 mM in CV a pH 8 su sensori Pt.

La polimerizzazione della DA nel gruppo di sensori Pt è stata condotta per 30 minuti mediante la tecnica CPA ($n = 4$) applicando un potenziale di $+700$ mV rispetto all'elettrodo di riferimento in Ag/AgCl in presenza di DA 10 mM ed in una soluzione a pH 8 (fig. 9).

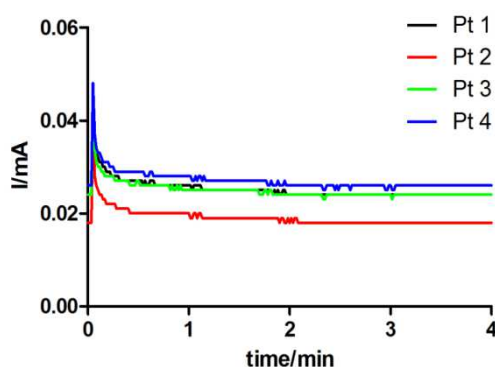


Figura 9: Polimerizzazione di DA 10 mM in CPA a pH 8 su Pt.

Nel grafico che rappresenta l'elettrosintesi in CPA (fig. 9) (ed in tutti i successivi riguardanti lo stesso processo) sono riportati solo i primi 4 minuti, per evidenziare il fatto che il fenomeno della riduzione della corrente, corrispondente alla formazione del polimero non conduttivo, avviene prevalentemente nei primi secondi dopo l'applicazione del potenziale.

In figura 10 è mostrato il voltammogramma relativo al sensore Ep dopo aggiunta, in soluzione a pH 8, di DA 10 mM. Come si può evincere dal grafico, durante i vari cicli voltammetrici si verifica solo una parziale riduzione del picco di ossidazione, in maniera meno accentuata rispetto allo stesso processo su Pt. La CV è stata eseguita utilizzando una velocità di scansione di 100 mV in un range tra -1 e +1 V.

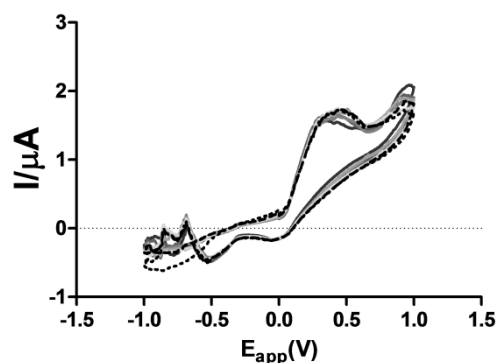


Figura 10: Polimerizzazione di DA 10 mM in CV a pH 8 su sensori Ep.

Grazie al potenziale individuato in CV (+700 mV), è stata eseguita una polimerizzazione in CPA (fig. 11) sui 4 sensori Ep per 30 minuti, in soluzione a pH 8 contenente DA 10 mM.

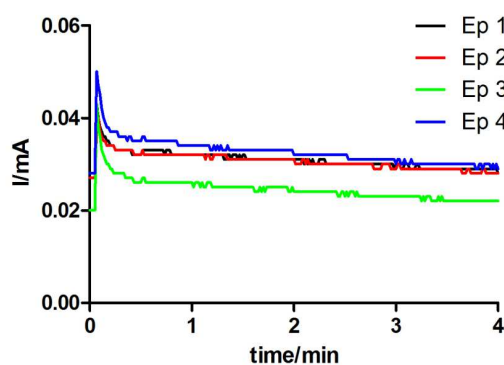


Figura 11: Polimerizzazione di DA 10 mM in CPA a pH 8 su Ep.

4.2 Polimerizzazione di NE sui sensori Pt ed Ep

Anche dal voltammogramma registrato in presenza di NE 10 mM, a pH=8, su sensore Pt (fig. 12), risulta la formazione del polimero durante i vari cicli voltammetrici, con una riduzione di corrente da 15 a 5 μA , ad evidenziare la formazione di un polimero non conduttivo. Il protocollo sperimentale è lo stesso descritto nel paragrafo 4.1 per la polimerizzazione della DA.

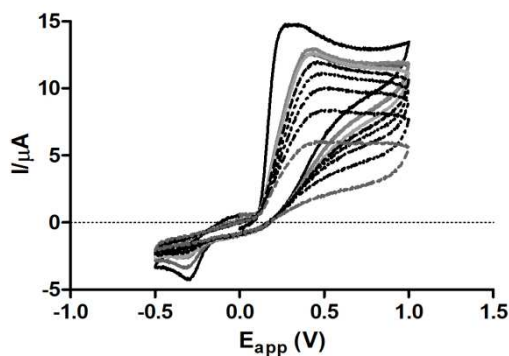


Figura 12: Polimerizzazione di NE 10 mM in CV a pH 8 su sensori Pt.

Il grafico della polimerizzazione della NE condotta in CPA (fig. 13) risulta molto simile a quello della polimerizzazione della DA su Pt, sebbene la riduzione della corrente registrata durante questo processo risulti meno evidente.

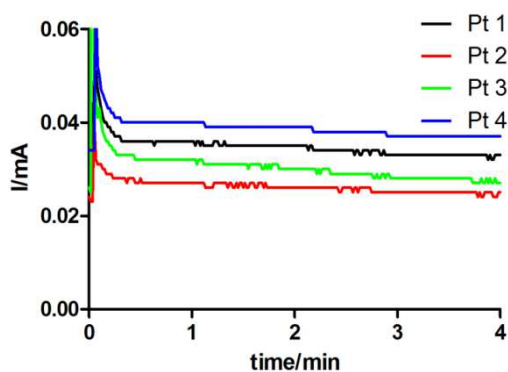


Figura 13: Polimerizzazione di NE 10 mM in CPA a pH 8 su Pt.

Il voltammogramma (fig. 14), relativo al sensore Ep immerso in una soluzione di NE 10 mM a pH 8, mostra come durante i vari cicli voltammetrici si verifichi la polimerizzazione di NE, caratterizzata da una riduzione della corrente. La CV è stata eseguita utilizzando una velocità di scansione di 100 mV/s in un range tra -1 e +1 V.

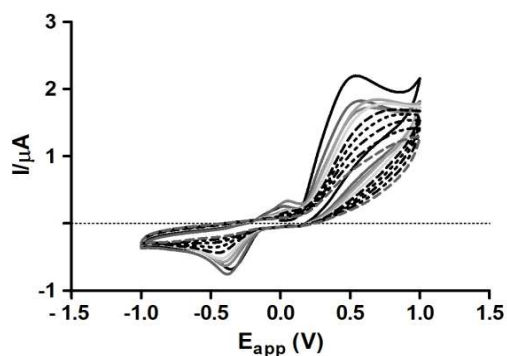


Figura 14: Polimerizzazione di NE 10 mM in CV a pH 8 su sensori Ep.

In seguito all'esperimento in CV, è stato fissato un potenziale di +700 mV vs Ag/AgCl per effettuare la polimerizzazione di NE mediante CPA su sensore Ep. Tale processo è stato condotto in presenza di una concentrazione di NE pari a 10 mM, a pH=8, per 30 minuti.. A differenza della polimerizzazione con DA, si può notare che l'amperogramma (fig. 15) segue un andamento differente, dapprima un lieve aumento di corrente e successivamente una stabilizzazione ad una corrente più alta di quella di partenza. Questo mostra che l'efficacia della polimerizzazione non è la medesima sui due materiali dovuta alla loro differenza strutturale.

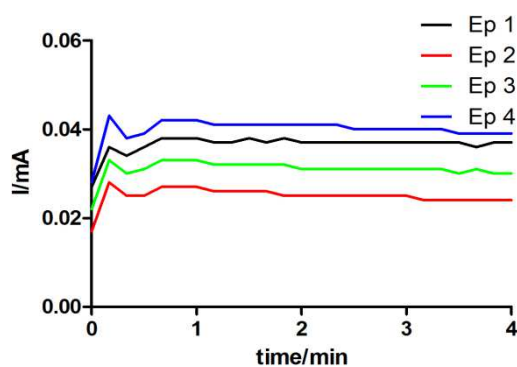


Figura 15: Polimerizzazione di NE 10 mM in CPA a pH 8 su Ep.

4.3 Calibrazioni dei sensori Pt ed Ep con HP

A seguito delle calibrazioni il Pt nudo ha mostrato uno slope di $0.921 \pm 0.055 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$) mentre a seguito della polimerizzazione lo slope risulta, su Pt/pDA, pari a $0.983 \pm 0.054 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.999$, $n = 4$), per cui è evidente che il polimero (pDA) è totalmente permeabile all'HP (fig. 16).

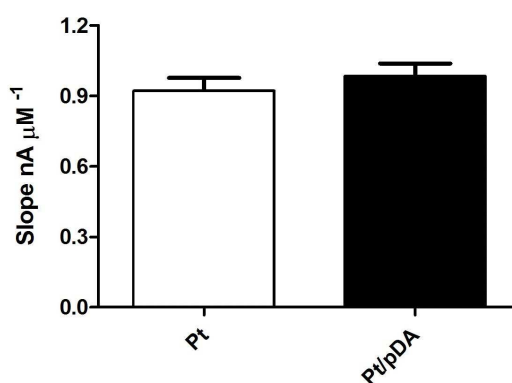


Figura 16: HP su Pt e Pt/pDA.

Per quanto riguarda l'elettrodo Ep è stato dimostrato come non avvenga ossidazione dell'HP sulla superficie, in quanto, né sul materiale nudo, né tantomeno su quello polimerizzato, si verificano ossidazioni a carico di HP: tale fenomeno è dovuto alle proprietà del materiale a base carboniosa (fig. 17).

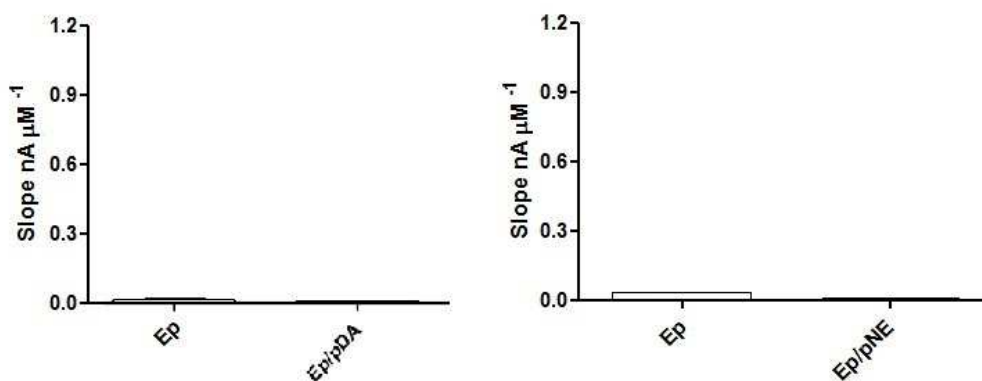


Figura 17: HP su Ep ed Ep/pDA e su Ep e Ep/pNE.

Come verificatosi con la calibrazione di Pt e Pt/pDA, il film polimerico pNE (fig. 18) risulta completamente permeabile all'HP (slope di 0.885 ± 0.035 nA* μ M⁻¹ su Pt rispetto a 0.8 ± 0.04 nA* μ M⁻¹ su Pt/pNE).

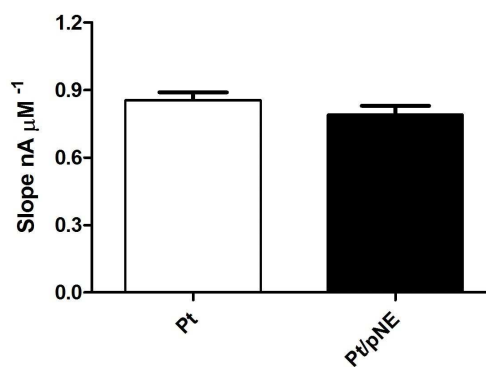


Figura 18: HP su Pt e Pt/pNE.

4.4 Calibrazioni dei sensori Pt ed Ep con DA

Dalla calibrazione con DA (fig. 19), è stato possibile rilevare sul sensore Pt/pDA circa il 67 % della DA ossidata sul sensore Pt, come si evince dai valori di slope ($0.566 \pm 0.062 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ rispetto a $0.842 \pm 0.061 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$).

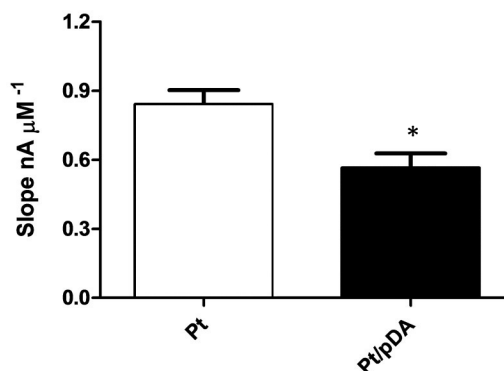


Figura 19: DA su Pt e Pt/pDA.

In seguito alla calibrazione di Ep ed Ep/pDA con DA (fig. 20), si verifica una riduzione del 83,3% della corrente, statisticamente significativo (* $p < 0.01$). Lo slope infatti si riduce da $0.767 \pm 0.162 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.998$, $n = 4$) a $0.128 \pm 0.001 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.998$, $n = 4$).

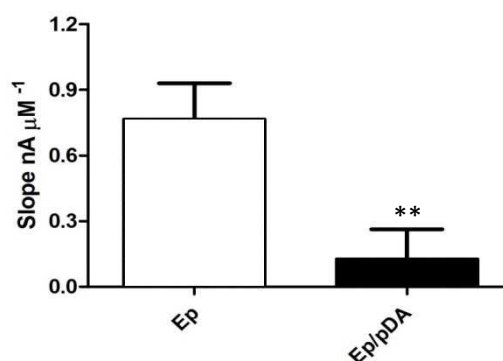


Figura 20: DA su Ep ed Ep/pDA.

Le calibrazioni sui sensori Pt e Pt/pNE con la DA non hanno prodotto una differenza statistica nei valori di slope (fig. 21).

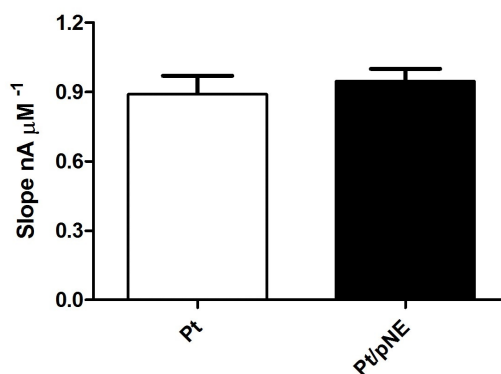


Figura 21: DA su Pt e Pt/pNE.

In seguito a calibrazione con DA su Ep e su Ep/pNE si registra una variazione da $0.712 \pm 0.098 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.999$, $n = 4$) misurato sul sensore nudo a $0.304 \pm 0.059 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.989$, $n = 4$) su Ep/pNE, con una riduzione della corrente del 42.7 % (fig. 22).

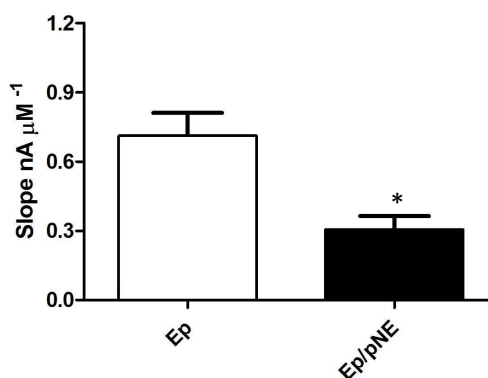


Figura 22: DA su Ep e Ep/pNE.

4.5 Calibrazioni dei sensori Pt ed Ep con NE

La calibrazione con NE (fig. 23) ha generato una risposta da parte del sensore Pt pari a $0.96 \pm 0.056 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$) mentre su Pt/pDA NE viene ossidata con un'efficienza di circa 2 volte inferiore rispetto alla DA (37.8 % vs 67.2 %).

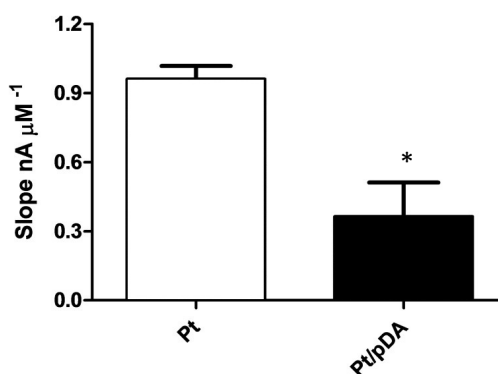


Figura 23: NE su Pt e Pt/pDA.

In seguito a calibrazione di Ep ed Ep/pDA con NE (fig. 24) e data la somiglianza della sua struttura molecolare con quella di DA era altamente probabile ottenere un effetto simile a quello ottenuto in presenza di DA. Infatti, l'andamento è molto simile, con una leggera diminuzione di lettura sul polimero rispetto alla DA ($0.128 \pm 0.001 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ della DA a $0.092 \pm 0.04 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ della NE).

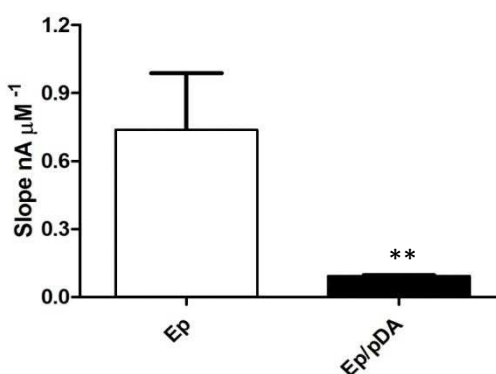


Figura 24: NE su Ep ed Ep/pDA.

La pNE risulta completamente permeabile alla NE (fig. 25), così come alla DA.

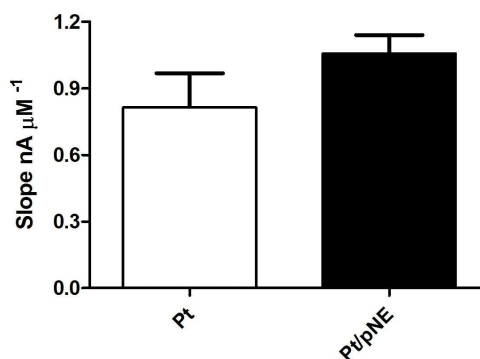


Figura 25: NE su Pt e Pt/pNE.

Lo slope risultante dopo polimerizzazione della NE su Ep mostra una riduzione della lettura di corrente relativa a NE del 68.6 % (da $0.716 \pm 0.12 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ a $0.225 \pm 0.055 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ sul sensore polimerizzato) (fig. 26), mentre su Pt è stato visto non influenzare assolutamente la rilevazione di questa molecola.

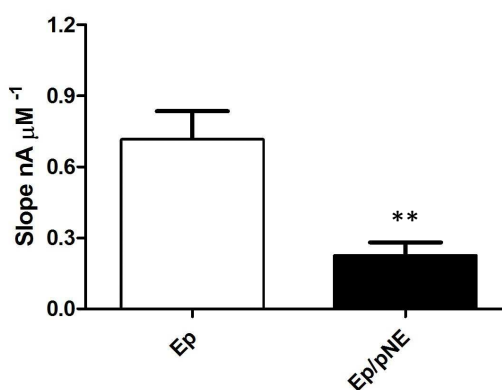


Figura 26: NE su Ep ed Ep/pNE.

4.6 Calibrazioni dei sensori Pt ed Ep con AA

Le calibrazioni effettuate con AA (fig. 27) evidenziano una riduzione della corrente da $0.546 \pm 0.048 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$) a $0.030 \pm 0.003 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.992$, $n = 4$) su Pt/pDA.

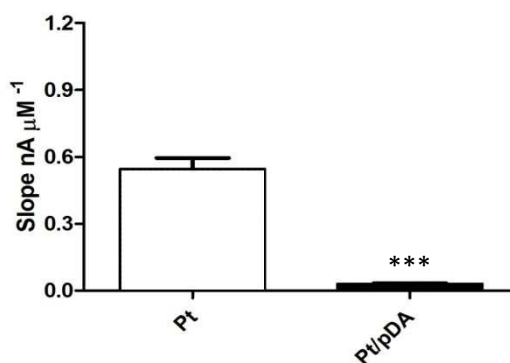


Figura 27: AA su Pt e su Pt/pDA.

In seguito a calibrazione con AA di Ep ed Ep/pDA, è evidente una buona schermatura operata dal polimero pari al 98,6 % (fig. 28), comparabile approssimativamente con la schermatura ottenuta su pDA pari al 94,5 %. Lo slope infatti si riduce dal $0.281 \pm 0.136 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.955$, $n = 4$) a $0.004 \pm 0.02 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.793$, $n = 4$).

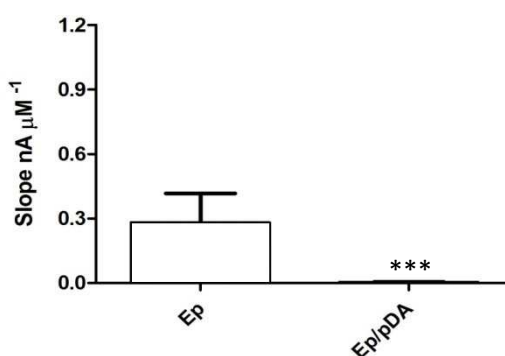


Figura 28: AA su Ep ed Ep/pDA.

Durante calibrazione di Pt e Pt/pNE con AA, mostrata in figura 29, si evince una riduzione nella lettura della corrente sul pNE pari al 79.7 % (da $0.631 \pm 0.081 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ a $0.128 \pm 0.001 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$), contro il 94,5 % ottenuto su Pt/pDA.

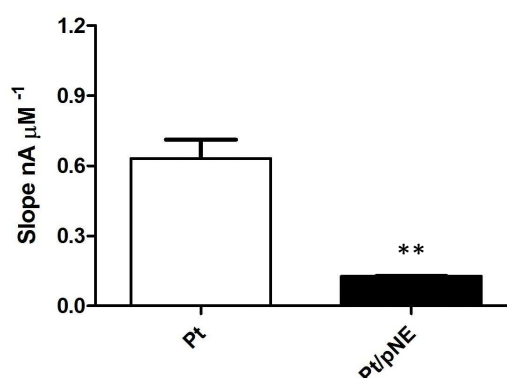


Figura 29: AA su Pt e Pt/pNE.

Il grafico ottenuto in seguito a calibrazioni di Ep ed Ep/pNE (fig. 30) evidenzia una impermeabilità del polimero nei confronti di AA pari al 98,8%, comparabile con la schermatura ottenuta su pDA, dovuta presumibilmente da una somiglianza strutturale tra i due polimeri e tra le due molecole (DA e NE). Lo slope si riduce da $0.251 \pm 0.045 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.955$, $n = 4$) a $0.003 \pm 0.01 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.989$, $n = 4$).

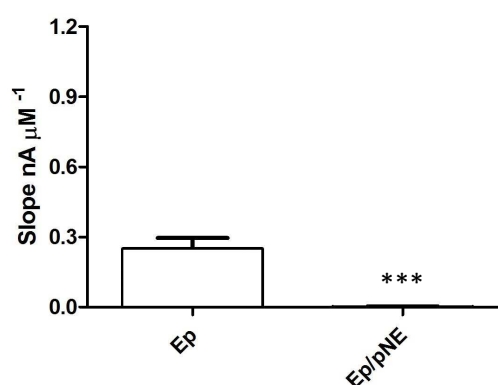


Figura 30: AA su Ep e Ep/pNE.

4.7 Calibrazioni dei sensori Pt ed Ep con DOPAC

In seguito alla calibrazione di Pt con DOPAC (fig. 31) è risultato come la molecola venga schermata del 90.9 % dalla pDA, quando questo polimero è depositato su Pt. Lo slope su Pt è di $0.372 \pm 0.022 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$) mentre su Pt/pDA risulta pari a $0.034 \pm 0.003 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$).

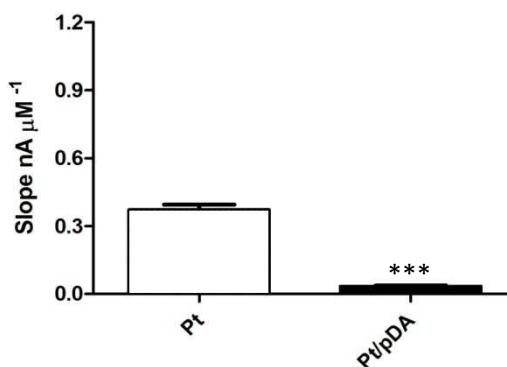


Figura 31: DOPAC su Pt e Pt/pDA.

In seguito a calibrazione di Ep ed Ep/pDA con DOPAC (fig. 32), è possibile osservare una quasi totale impermeabilità del polimero alla molecola, così come si verifica per l'AA. Infatti il polimero risulta impermeabile al 92.7 % del DOPAC a cui viene esposto.

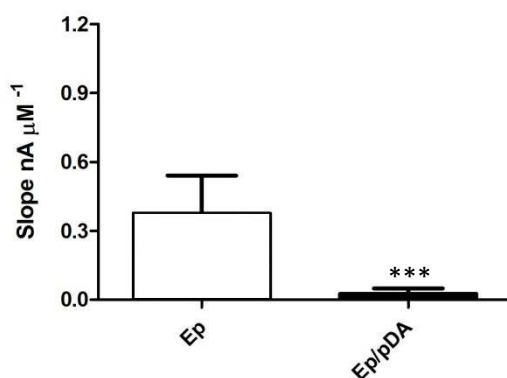


Figura 32: DOPAC su Ep ed Ep/pDA.

Il DOPAC risulta schermato anche su Pt/pNE (fig. 33), ma non in maniera altrettanto efficace rispetto a Pt/pDA (slope ridotto da $0.49 \pm 0.07 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ su Pt a $0.075 \pm 0.01 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ su pNE).

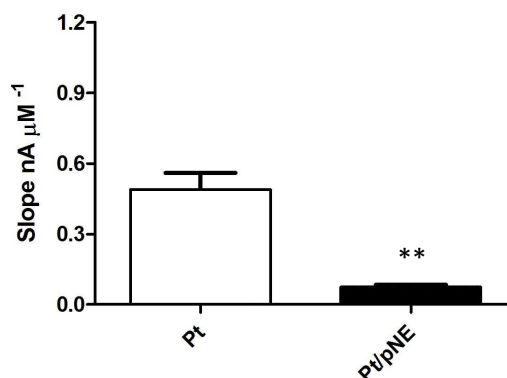


Figura 33: DOPAC su Pt e Pt/pNE.

Come si è visto precedentemente sulle calibrazioni eseguite su Ep/pDA, l'andamento del DOPAC su pNE (fig. 34) risulta molto simile a quello ottenuto in seguito a calibrazioni di AA. Infatti il polimero (slope= $0.375 \pm 0.075 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) risulta permeabile all'6.1 % del DOPAC che si ossida sull'Ep nudo (slope= $0.023 \pm 0.022 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$).

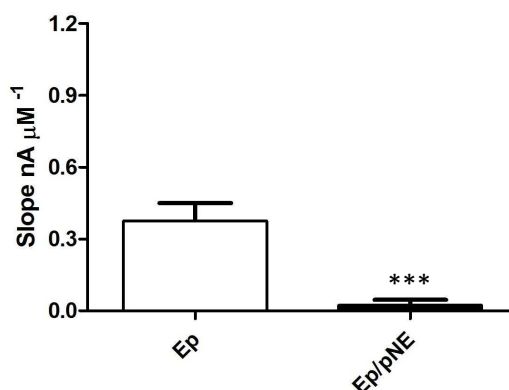


Figura 34: DOPAC su Ep ed Ep/pNE.

4.8 Tentativo di polimerizzazione dei sensori Pt ed Ep con DOPAC

Esperimenti preliminari con la tecnica della CV e CPA (dati non mostrati), suggeriscono che il DOPAC non polimerizzi sul Pt. Per completezza di informazioni si è proceduto comunque alle calibrazioni e, come si evince dai pannelli della figura 35, i sensori in Pt risultano permeabili a tutte le molecole analizzate (HP, DA, NE, AA e DOPAC). Per questo motivo non sono stati eseguiti i medesimi esperimenti sui sensori Ep.

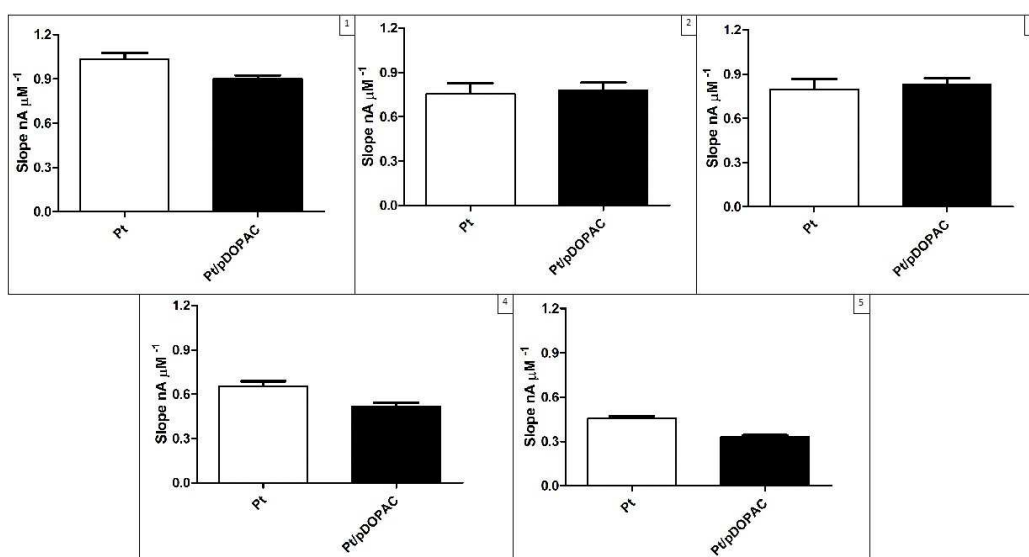


Figura 35: Calibrazioni di Pt e Pt/pDOPAC. 1: HP; 2: DA; 3: NE; 4: AA; 5: DOPAC.

4.9 Polimerizzazione di *o*-PD e calibrazione dei sensori Pt ed Ep

Sebbene sia presente una vasta letteratura riguardante il polimero dell'*o*-PD, sono state eseguite delle prove su sensori Pt, per confermare la permeabilità dello stesso all'HP, e la sua azione schermante nei confronti di DA ed AA. La figura 36 mostra la corrente risultante dalla polimerizzazione dell'*o*-PD 300 mM sui sensori Pt tramite CPA.

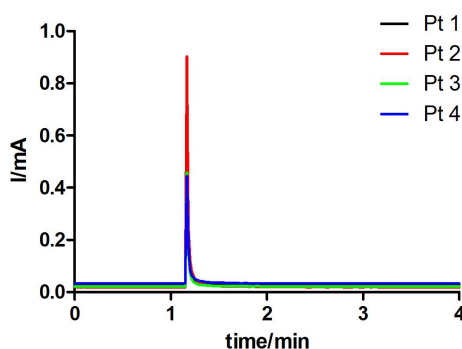


Figura 36: Polimerizzazione di *o*-PD 300 mM in CPA a pH 7.4 su Pt.

Per quanto riguarda le calibrazioni di Pt e Pt/pPD con HP (fig. 37), non risulta una differenza statistica tra i segnali registrati, infatti lo slope relativo al Pt nudo è di $0.860 \pm 0.030 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.997$, $n = 4$), mentre su pPD è di $0.706 \pm 0.099 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.970$, $n = 4$).

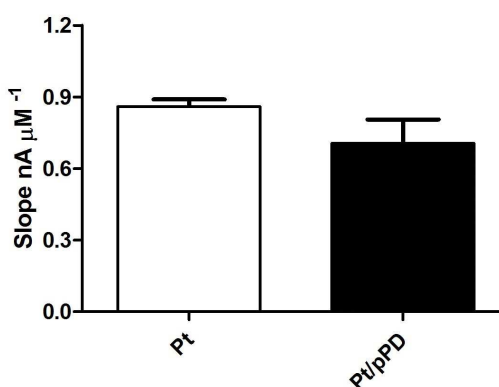


Figura 37: HP su Pt e Pt/pPD.

Dopo calibrazione di Pt e Pt/pPD, dai risultati (fig. 38) si può evidenziare una netta impermeabilità del polimero nei confronti di DA. Infatti lo slope si riduce da $0.938 \pm 0.022 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$) di Pt a $0.027 \pm 0.004 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.984$, $n = 4$) sul sensore polimerizzato.

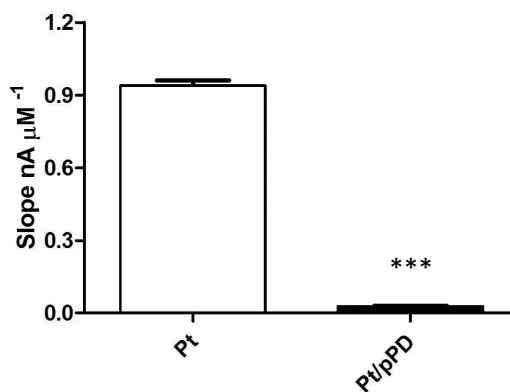


Figura 38: DA su Pt e Pt/pPD.

Risulta verificata, come espresso dalla letteratura, l'impermeabilità del pPD nei confronti dell'AA (fig. 39). Lo slope risultante dalle calibrazioni di Pt con AA risulta pari a $0.693 \pm 0.076 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 1$, $n = 4$), mentre sul polimero è di $0.003 \pm 0.002 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($r^2 = 0.959$, $n = 4$).

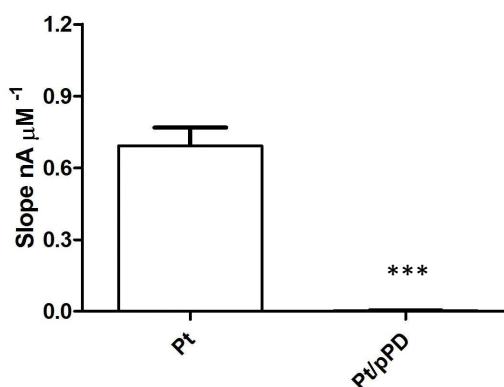


Figura 39: AA su Pt e Pt/pPD.

4.10 Ricerca di un materiale atto a discriminare DA ed AA

Il multisensore per lo studio dell'autossidazione della DA, progettato presso il laboratorio dell'Università di Sassari, prevede l'utilizzo del sensore Ep dopo polimerizzazione con DA, in quanto insensibile all'HP e schermante l'AA, ma sufficientemente permeabile alla DA. Partendo dai dati ottenuti, si è cercato un approccio alternativo per la realizzazione di un materiale maggiormente sensibile alla DA, ma altrettanto insensibile all'HP e all'AA. A questo fine sono stati utilizzati i sensori Ep, fabbricati nel laboratorio dell'Università di Sassari, dopo la funzionalizzazione della loro superficie mediante allotropi del carbonio, ed in alcuni casi con l'elettrodeposizione di Pt, Au o IL, effettuato presso il laboratorio di elettrochimica/materiali del dipartimento di chimica industriale e ingegneria ambientale dell'Università Politecnica di Timisoara. A seguito di uno screening effettuato mediante CV (tab. 1), e dell'applicazione di specifiche tecniche elettrochimiche pulsate, sono stati selezionati dei nuovi materiali capaci di discriminare il segnale della DA in presenza di alte concentrazioni di HP ed AA. Nei paragrafi successivi verrà descritto lo sviluppo dei singoli materiali utilizzati nella presente tesi.

MATERIALE	I/mA	E_p/V
Ep		
DA	5.9 E ⁻⁶	0.2
AA	5.02 E ⁻⁷	0
Ep/GO		
DA	1.95 E ⁻⁵	0.3
AA	1.51 E ⁻⁶	0.4
Ep/GO/Au		
DA	6.65 E ⁻⁵	0.3
AA	2.36 E ⁻⁶	0
Ep/GO/Pt		
DA	7.86 E ⁻⁶	0.2
AA	1.017 E ⁻⁶	0

Ep/GO/IL		
DA	2.32 E^{-5}	0.1
AA	3.12 E^{-6}	0
Ep/GNANO		
DA	5.35 E^{-5}	0.3
AA	1.2 E^{-6}	0.04
Ep/GNANO/Au		
DA	9.6 E^{-5}	0.3
AA	2.32 E^{-6}	0
Ep/RGO		
DA	9.66 E^{-6}	0.23
AA	2.29 E^{-6}	0.15
Ep/RGO/Au		
DA	2.76 E^{-5}	0.2
AA	1.32 E^{-6}	0
Ep/FC60		
DA	5.29 E^{-5}	0.23
AA	4.32 E^{-6}	0
Ep/FC60/Au		
DA	2.25 E^{-5}	0.15
AA	2 E^{-6}	0
Ep/SWCNTs		
DA	2.51 E^{-4}	0.45
AA	4.05 E^{-5}	0.04

Ep/SWCNTs/Au		
DA	$3.97 E^{-4}$	0.33
AA	$1.93 E^{-5}$	0.1
CNF		
DA	$1.28 E^{-2}$	0.2
AA	$1.12 E^{-2}$	0.32
CNF_MOF_C300		
DA	$1.33 E^{-2}$	0.45
AA	$8.67 E^{-3}$	0.6

Tabella 1: CV con DA ed AA sui sensori Ep modificati (valori espressi in mA/ μ M).

4.10.1 Ossido di grafene

Il sensore Ep/GO è stato ottenuto tramite immersione in una soluzione 4 mg/ml di GO disciolto in acqua. Le immersioni sono state effettuate 3 volte, a distanza di 10 minuti, per essere sicuri di ottenere uno strato sufficientemente stabile sulla superficie dell'elettrodo. Si è proceduto alla sola iniezione, in PBS, di AA 1 mM e DA 100 μ M. Rispetto alle CV eseguite sui sensori Ep, senza alcuna modifica superficiale, risulta che la corrente relativa all'ossidazione della DA è nettamente aumentata (fig. 40: A), passando da $5.9 E^{-6}$ mA/ μ M dell'Ep a $1.95 E^{-5}$ mA. Ciò è verosimilmente dovuto alla maggior area disponibile sulla superficie del sensore Ep/GO ed al maggior numero di gruppi funzionali presenti su di esso. Dopo la deposizione di Au sul sensore Ep/GO (fig. 40: B), si è proceduto alla valutazione della sua efficacia tramite CV e si è ottenuto un aumento della corrente relativa all'ossidazione dell'AA da $1.51 E^{-6}$ mA/ μ M determinato su Ep/GO a $2.36 E^{-6}$ mA/ μ M su Ep/GO/Au. Sullo stesso sensore Ep/GO è stato alternativamente depositato il Pt. La CV relativa al sensore Ep/GO/Pt (fig. 40: C) non ha dato risultati soddisfacenti in termini di sensibilità verso la DA rispetto ad Ep/GO ($7.86 E^{-6}$ mA/ μ M rispetto a $1.95 E^{-6}$ mA/ μ M su Ep/GO), e non si denota nessuna differenza per quanto riguarda l'AA. Una serie di CV sono state svolte anche in presenza di IL sulla superficie del sensore Ep/GO (fig. 40: D), le quali hanno evidenziato un aumento della sensibilità del sensore per

l'AA (da $1.51 \text{ E}^{-6} \text{ mA}/\mu\text{M}$ dell'Ep/GO a $3.12 \text{ E}^{-6} \text{ mA}/\mu\text{M}$) ma anche della DA (da $1.95 \text{ E}^{-5} \text{ mA}/\mu\text{M}$ dell'Ep/GO a $2.32 \text{ E}^{-5} \text{ mA}/\mu\text{M}$ nell'Ep/GO/IL).

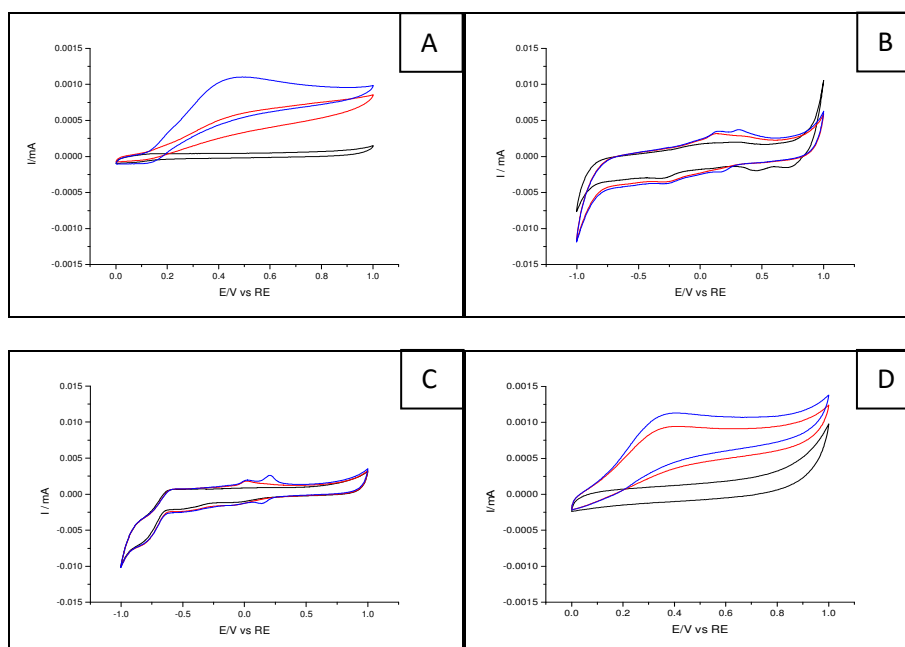


Figura 40: CV con AA e DA. A: Ep/GO; B: Ep/GO/Au; C: Ep/GO/Pt; D: Ep/GO/IL. Le linee nere rappresentano la linea di base, la linea rossa l'AA 1mM e la linea blu la DA 100 μ M.

I sensori che hanno dato i risultati più promettenti in CV (Ep/GO ed Ep/GO/Au), sono stati successivamente caratterizzati mediante CA a 3 livelli. Per quanto riguarda la DA, si è proceduto alla registrazione della linea di base e delle correnti effettive risultanti dopo aggiunta di 5 concentrazioni di DA (da 20 a 100 μM) e si è ottenuta una corrente relativa all'ossidazione della DA pari a $1.99 \text{ E}^{-6} \text{ mA}/\mu\text{M}$ ($r^2 = 0.94$). Nel caso dell'AA, l'esperimento è il medesimo con concentrazioni di AA da 100 a 500 μM e la corrente risultante è pari a $3.87 \text{ E}^{-5} \text{ mA}/\mu\text{M}$ ($r^2 = 0.96$). Nell'esperimento finale, mostrato in figura 41, si è proceduto alla registrazione della linea di base, dell'AA 500 μM e delle 5 concentrazioni di DA, e la corrente relativa alla DA in presenza di AA è uguale a $2.08 \text{ E}^{-6} \text{ mA}/\mu\text{M}$ ($r^2 = 0.98$). Ciò indica in questo caso che la presenza di AA in soluzione non interferisce con la rilevazione della DA.

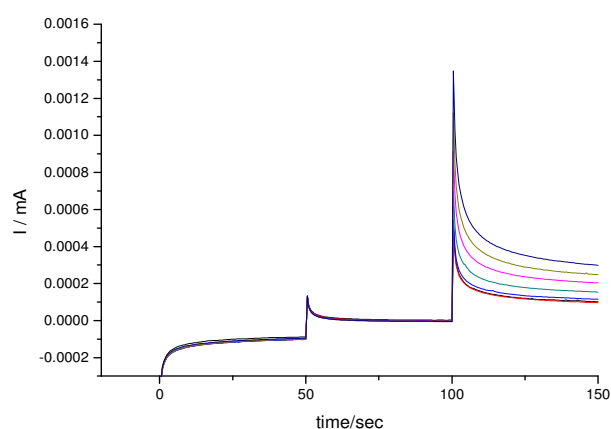


Figura 41: CA a 3 livelli su Ep/GO. AA 500 μM + DA (da 20 μM a 100 μM).

Lo stesso protocollo è stato eseguito sul sensore Ep/GO/Au (fig. 42). Nell'esperimento di quantificazione della DA in presenza di AA, le differenze di corrente legate alla catecolammina sono risultate non significativamente elevate rispetto al salto registrato in seguito all'aggiunta di AA. Ciò indica che la combinazione tra questa tipologia di sensore e la specifica tecnica elettrochimica applicata non sono efficaci per la discriminazione di DA in presenza di alte concentrazioni di AA. A seguito di questa considerazione gli esperimenti successivi non hanno incluso lo studio del gruppo di sensori Ep/GO/Au.

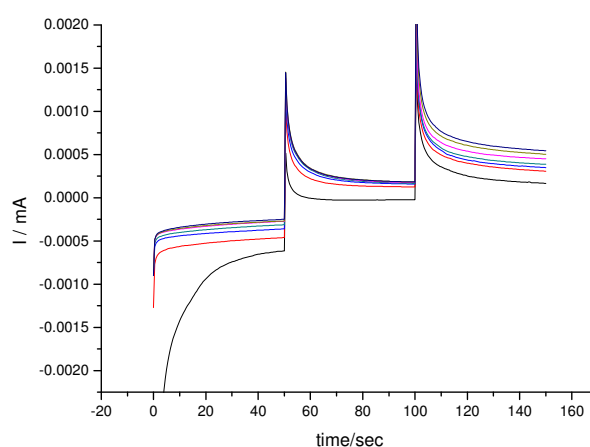


Figura 42: CA a 3 livelli su Ep/GO/Au. AA 500 μ M + DA (da 20 μ M a 100 μ M).

La caratterizzazione dei sensori Ep/GO è continuata mediante l'utilizzo della CPA utilizzando 3 diversi potenziali: +350 mV, +400 mV e +500 mV vs Ag/AgCl. La CPA è stata eseguita registrando 50 secondi di linea di base e aggiungendo le molecole ogni 50 secondi. A seguito della stabilizzazione dei sensori in PBS, si è proceduto con l'aggiunta di 5 concentrazioni di DA (da 100 a 500 μ M) (fig. 43: A); dopo il lavaggio dei sensori ed una rapida stabilizzazione in una nuova soluzione di PBS, sono state aggiunte 5 concentrazioni di AA (da 200 a 1000 μ M) (fig. 43: B). In un ultimo esperimento, 5 iniezioni di DA (da 100 a 500 μ M) sono state effettuate in presenza di AA 1000 μ M (fig. 43: C). Come si evince dalla tabella 2, l'applicazione del potenziale più alto è risultato in una sensibilità migliore nei confronti della DA e nel dimezzamento della corrente relativa all'ossidazione dell'AA, infatti è possibile vedere come la

corrente relativa all'AA sia molto inferiore rispetto a quella della DA (fig. 43: B vs A).

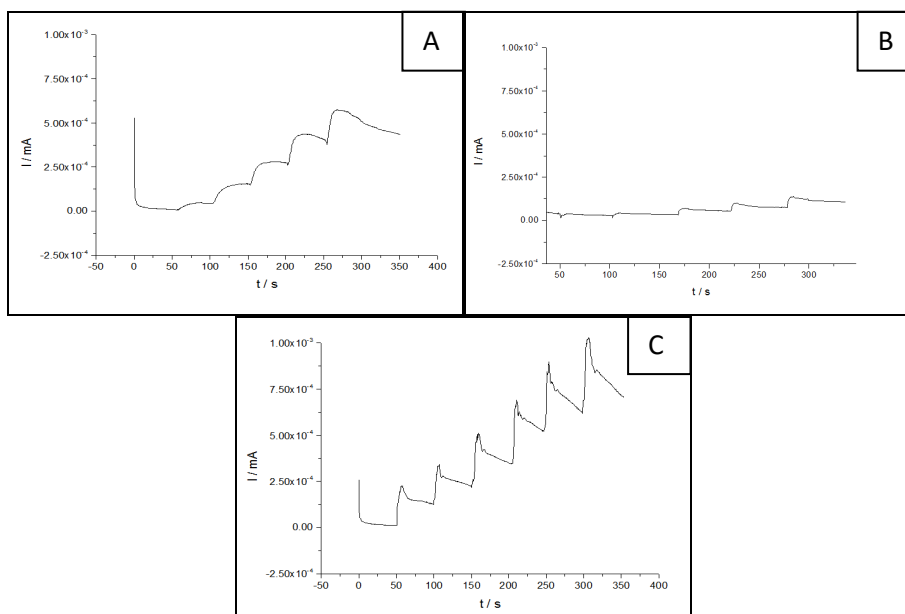


Figura 43: CPA a +500 mV. A: DA; B: AA; C: AA + DA.

	350 mV	400 mV	500 mV
DA	$Y = -3.06 E^{-5} + 5.22 E^{-7} x$	$Y = -3.13 E^{-5} + 5.23 E^{-7} x$	$Y = -3.34 E^{-5} + 1 E^{-6} x$
AA	$Y = -1.17 E^{-5} + 8.24 E^{-8} x$	$Y = -1.22 E^{-5} + 8.26 E^{-8} x$	$Y = -1.2 E^{-5} + 4.5 E^{-8} x$
DA-AA	$Y = -1.64 E^{-5} + 5.01 E^{-7} x$	$Y = -1.69 E^{-5} + 5.01 E^{-7} x$	$Y = -4.3 E^{-6} + 1.2 E^{-6} x$

Tabella 2: CPA su Ep/GO (valori espressi in $\mu\text{A}/\mu\text{M}$).

Essendo risultato il sensore Ep/GO molto promettente, si è proceduto a testare lo stesso con altre due tecniche pulsate: la DPV e la SWV.

La DPV è stata eseguita in due differenti condizioni: la prima con una variazione di potenziale pari a 10 mV ed ampiezza di modulazione uguale a 50 mV; mentre la seconda condizione presenta una variazione di potenziale di 5 mV ed un'ampiezza di modulazione pari a 10 mV.

Sono stati svolti due differenti esperimenti. Nel primo caso sono state aggiunte in PBS 6 concentrazioni di DA, in un intervallo compreso tra 100 e 600 μM , ed è stato calcolato lo slope relativo all'ossidazione della DA. In questa stessa

soluzione, contenente DA 600 μM , è stato aggiunto AA 1 mM, in modo tale da verificare una eventuale variazione della curva. Nel secondo esperimento sono state aggiunte 6 concentrazioni di AA, comprese tra 200 e 1200 μM , e calcolata la corrente risultante. In questa soluzione è stato aggiunto successivamente DA 100 μM , ottenendo in questo caso una variazione della curva, più visibile nella figura 44 (B2).

In base all'analisi eseguita sui risultati, il secondo setup sperimentale è sicuramente migliore in termini di sensibilità alla DA e moderata insensibilità all'AA (fig. 44).

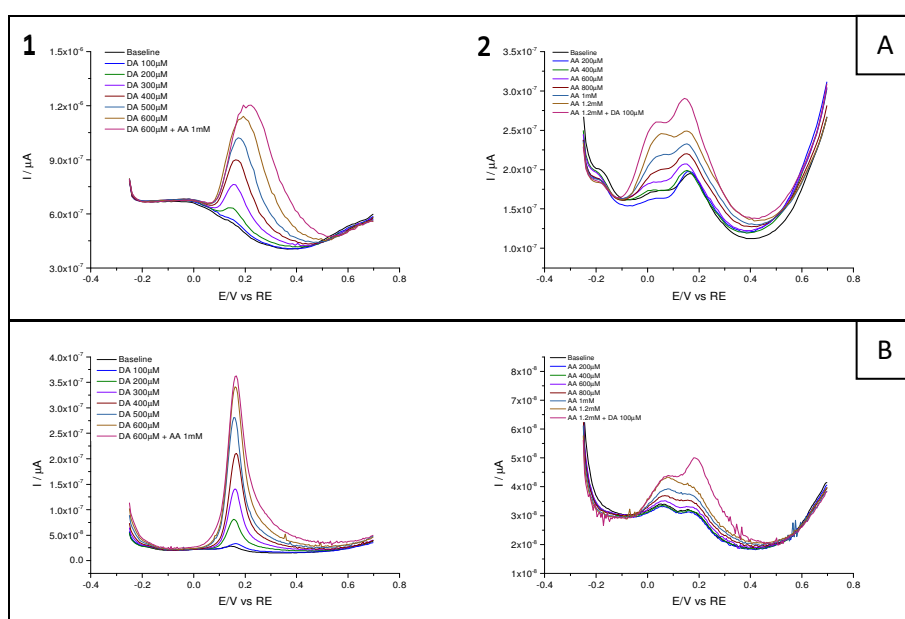


Figura 44: DPV. A: 1^a condizione (1: DA + AA; 2: AA + DA). B: 2^a condizione (1: DA + AA; 2: AA + DA).

È possibile vedere infatti nella tabella 3 come il valore di DA sia molto alto rispetto al valore dell'AA che risulta abbastanza poco rilevabile tramite DPV.

	2 ^a CONDIZIONE
DA	$y = -7.7 E^{-5} + 2.4 E^{-6} x$
AA	$y = -1.3 E^{-6} + 5.2 E^{-9} x$

Tabella 3: Analisi dati DPV (valori espressi in $\mu\text{A}/\mu\text{M}$).

L'esperimento di aggiunta di 5 concentrazioni di DA, da 100 a 500 μM , in presenza di AA 1 mM (fig. 45) è stato effettuato solo con i parametri relativi alla 2^a condizione ottenendo un valore di $y = -5.7 E^{-5} + 2.9 E^{-6} x$ per quanto riguarda la lettura della DA in presenza di AA 1 mM, risultato molto vicino al valore ottenuto per quanto riguarda la DPV con DA ($y = -7.7 E^{-5} + 2.4 E^{-6} x$).

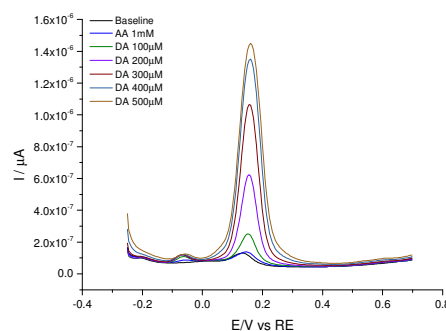


Figura 45: DPV 2^a condizione: AA 1mM + DA (da 100 μM a 500 μM).

Visti i risultati positivi ottenuti in DPV (2^o setup sperimentale), gli stessi parametri sono stati utilizzati per eseguire la SWV con una frequenza di 25 Hz. Sono state aggiunte in PBS 6 concentrazioni di DA, da 100 a 600 μM , ed è stata calcolata la corrente relativa all'ossidazione della DA. Nella stessa soluzione, contenente DA 600 μM , è stato aggiunto AA 1 mM, in modo tale da verificare una eventuale variazione della curva, la quale non si è verificata (fig. 46: A). In un nuovo PBS, sono state aggiunte 5 concentrazioni di AA, comprese tra 200 e 1000 μM , e calcolata la corrente relativa. Successivamente è stata aggiunta DA 100 μM , ottenendo una variazione della curva molto evidente a +200 mV (fig. 46: B). Tramite l'analisi dei dati è stato ottenuto un valore relativo di $y = -1.96 E^{-4} + 3.68 E^{-6} x$ per quanto riguarda la DA, e di $y = -2 E^{-6} + 2.3 E^{-8} x$ per l'AA (valori espressi in $\mu\text{A}/\mu\text{M}$).

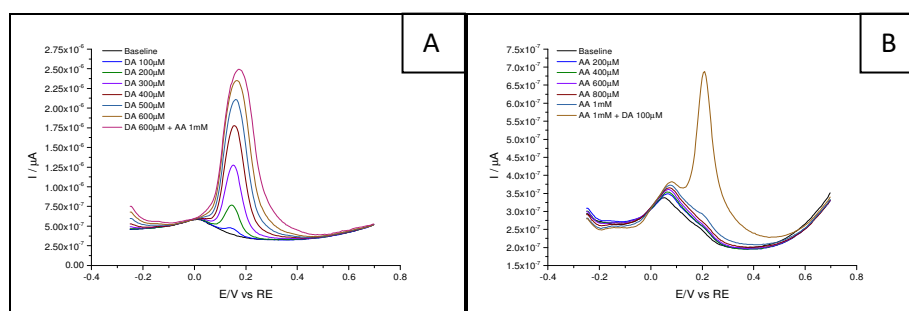


Figura 46: SWV 2^a condizione. A: DA + AA; B: AA + DA.

Al fine di studiare l'andamento della DA in presenza di AA, è stato eseguito un esperimento successivo, che prevede l'aggiunta graduale di 3 concentrazioni di AA pari a 250, 500 e 1000 μM , e 5 concentrazioni di DA (da 100 a 500 μM). Come si evince dalla figura 47, non è visibile nessuna variazione della curva durante aggiunta di AA, mentre sono visibili i picchi relativi alla DA a +200 mV. In base all'analisi dei dati si evince che la corrente relativa all'ossidazione della DA in presenza di AA è pari a $y = -8 E^{-5} + 4 E^{-6} x$, valore molto vicino a quello relativo alla sola DA presente in soluzione ($y = -1.96 E^{-4} + 3.68 E^{-6} x$).

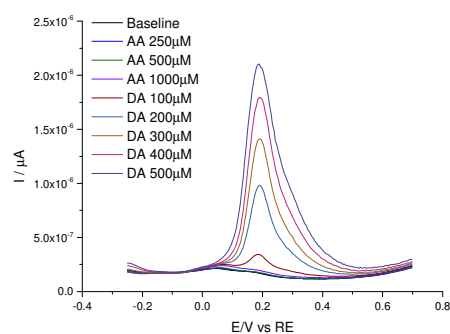


Figura 47: SWV 2^a condizione. AA + DA.

Essendo stato ritenuto l'Ep/GO un ottimo candidato come materiale in grado di discriminare la DA in presenza di elevate concentrazioni di AA, sono state eseguite delle foto al SEM delle superfici dell'Ep senza nessuna modifica superficiale e dello stesso dopo immersione in GO.

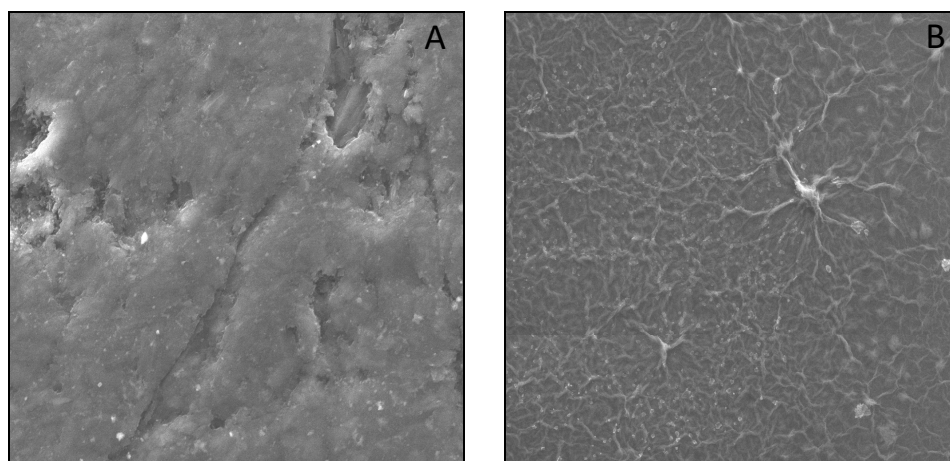


Figura 48: Immagini al SEM. A: sensore Ep; B: sensore Ep/GO.

È possibile vedere come la superficie del sensore Ep (fig. 48: A) sia irregolare. Essendo fabbricato a mano e riutilizzabile dopo lucidatura, la sua superficie non è uniforme, ma presenta aree in cui è presente la grafite ed aree in cui è maggiormente presente la resina epossidica, che rende quell'area non conduttiva, come già mostrato in letteratura (*Ilinoiu EC et al. 2013*). Nel caso del sensore Ep/GO (fig. 48: B), è possibile apprezzare come il GO formi una rete tridimensionale su tutta la superficie del sensore, andando ad aumentarne sensibilmente l'area attiva e conferendogli nuove proprietà elettrocatalitiche che consentono un'ottima discriminazione tra DA ed AA.

4.10.2 Nanoparticelle di grafene

Le GNANO sono state precedentemente disciolte in DMF (4mg/ml), e sonicate. Si è proceduto all'immersione del sensore Ep nella soluzione di GNANO, come precedentemente descritto.

Sono state eseguite le CV su Ep/GNANO (fig. 49) e su Ep/GNANO/Au (fig. 50), ma anche in questo caso si sono ottenuti valori di intensità di corrente troppo alti per quanto riguarda l'AA (tab. 1).

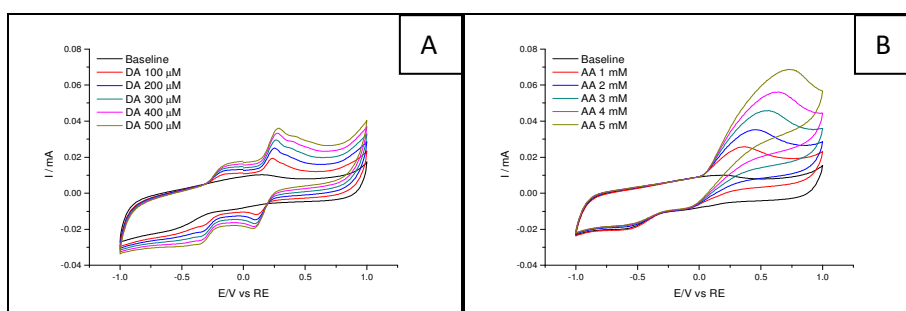


Figura 49: CV su Ep/GNANO. A: DA; B: AA.

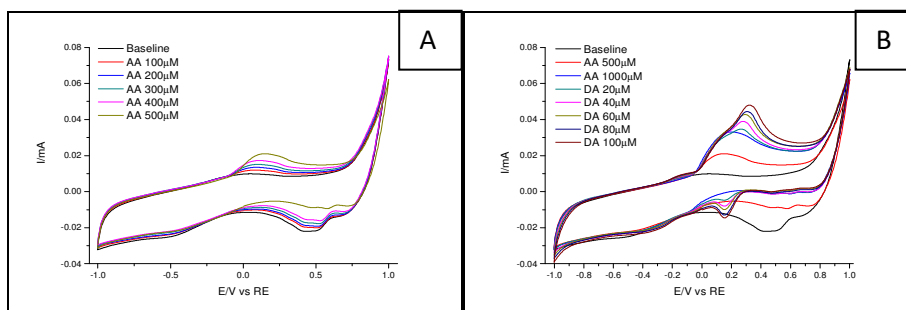


Figura 50: CV su Ep/GO/Au. A: AA; B: AA + DA.

Il sensore è stato caratterizzato mediante CA a 3 livelli (+150 mV, 0 mV e +300 mV), ma il salto che si verifica dopo aggiunta di AA è troppo elevato e non consono al nostro scopo (fig. 51). Per questo motivo non si è proseguito nel testare il sensore Ep/GNANO con le altre metodiche elettrochimiche.

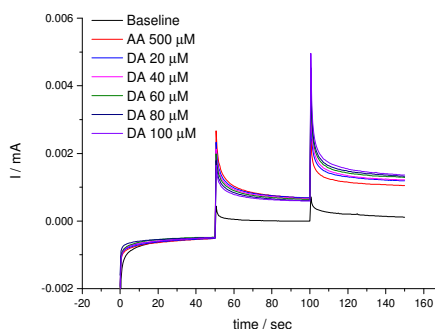


Figura 51: CA a 3 livelli. AA + DA.

4.10.3 Grafene ridotto

Il sensore Ep è stato immerso in una soluzione di GRO per 3 volte ogni 10 minuti. Una volta pronto il sensore Ep/GRO, sono state eseguite delle CV che mostrano come la corrente relativa all'AA sia troppo alta rispetto a quella della DA (fig. 52).

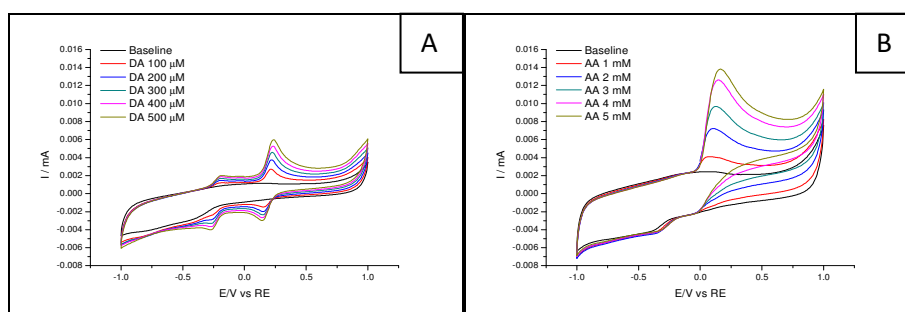


Figura 52: CV su Ep/GRO. A: DA; B: AA.

Dopo elettrodeposizione di particelle di Au sulla superficie dell' Ep/RGO, le CV non hanno mostrato nessun miglioramento del sistema (tab. 1).

Si è proceduto alla caratterizzazione del sensore Ep/GRO mediante CA a due livelli (0 mV e +300 mV), ma l'aggiunta di AA 500 μM ha generato una corrente relativa troppo alta (fig. 53).

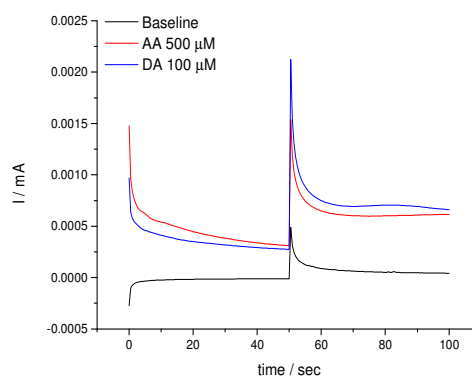


Figura 53: CA a 2 livelli su Ep/GRO. AA + DA.

4.10.4 Fullerene C60

In seguito alla preparazione del sensore Ep/FC60, è stata eseguita una CV (fig. 54: A), in cui sono risultati due distinti picchi di ossidazione per DA (+200 mV) e per AA (0 mV). Dopo elettrodeposizione di particelle d'Au, questa differenza non è presente (fig. 54: B). La corrente rilevata per le singole molecole è risultata comunque inferiore a quella determinata sul sensore Ep/GO (tab. 1).

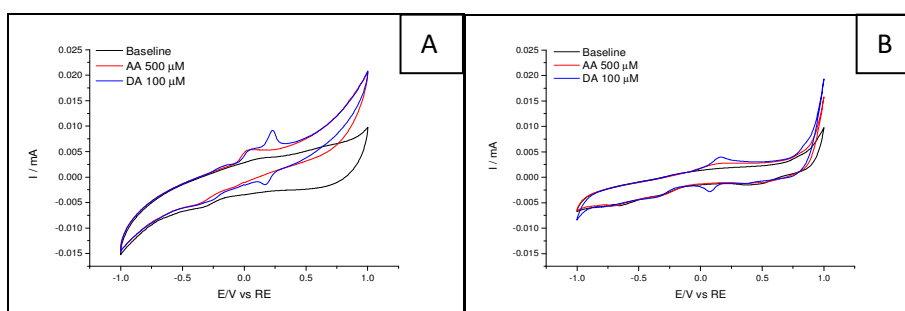


Figura 54: CV. A: Ep/FC60; B: Ep/FC60/Au.

Si è proceduto alla caratterizzazione di Ep/FC60 mediante CA a 3 livelli (-150 mV, 0 mV e +300 mV). È possibile vedere nella figura 55 come l'AA sia troppo reattivo sul sensore Ep/FC60. Per questo motivo anche questa tipologia di sensore non è stata testata con altre metodiche.

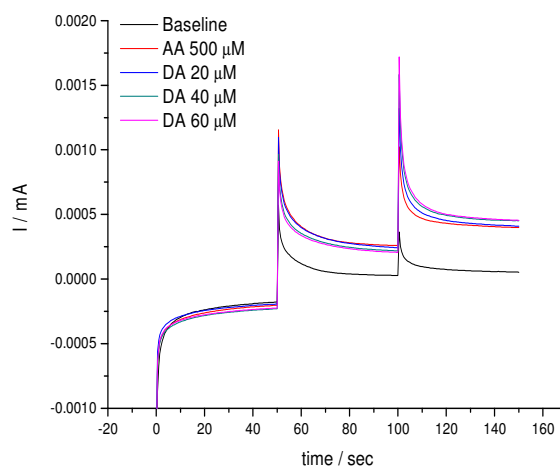


Figura 55: CA a 3 livelli su Ep/FC60. AA + DA.

4.10.5 Carbonanotubi a singola parete

Sono state eseguite le CV sul sensore Ep/SWCNTs (fig. 56) e sul sensore Ep/SWCNTs/Au (fig. 57). Sono chiaramente visibili i 4 picchi (due di ossidazione e due di riduzione) relativi alla DA (A), ma non risultano altrettanto evidenti in presenza di AA 1mM (B). Come si evince dai grafici (fig. 56 e 57) un vantaggio evidente della immersione dei sensori in SWCNTs è stato l'aumento dell'area funzionale del sensore atta all'ossidazione della DA, ma sfortunatamente anche dell'AA.

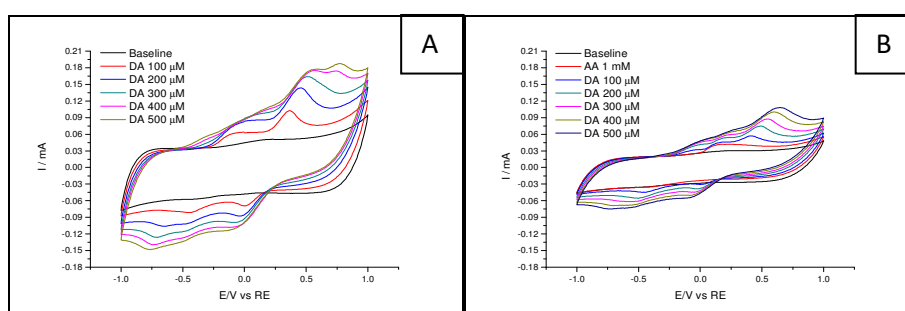


Figura 56: CV su Ep/SWCNTs. A: DA; B: AA + DA.

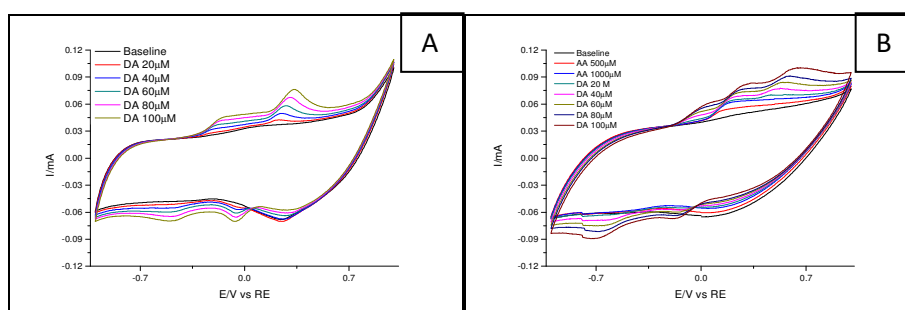


Figura 57: CV su Ep/SWCNTs/Au. A: DA; B: AA + DA.

Nella figura 58 sono riportati i grafici relativi alla CA a 2 livelli (+150 mV e +400 mV) eseguiti sul sensore Ep/SWCNTs. Nel primo esperimento (A) sono state aggiunte in PBS, 5 concentrazioni di DA, comprese tra 20 e 100 μM , ed è stata calcolata la corrente relativa alla ossidazione della catecolammina. Nel secondo esperimento (B), dopo pulizia del sensore e cambio del PBS, sono state aggiunte 5 concentrazioni di AA, comprese tra 100 e 500 μM , ed in seguito ai dati ottenuti, è stata calcolata la corrente relativa all'ossidazione dell'AA. In un ultimo esperimento (C), sono state iniettate in maniera alternata AA e DA, in modo da calcolare la corrente di AA in presenza di DA e di DA in presenza di AA.

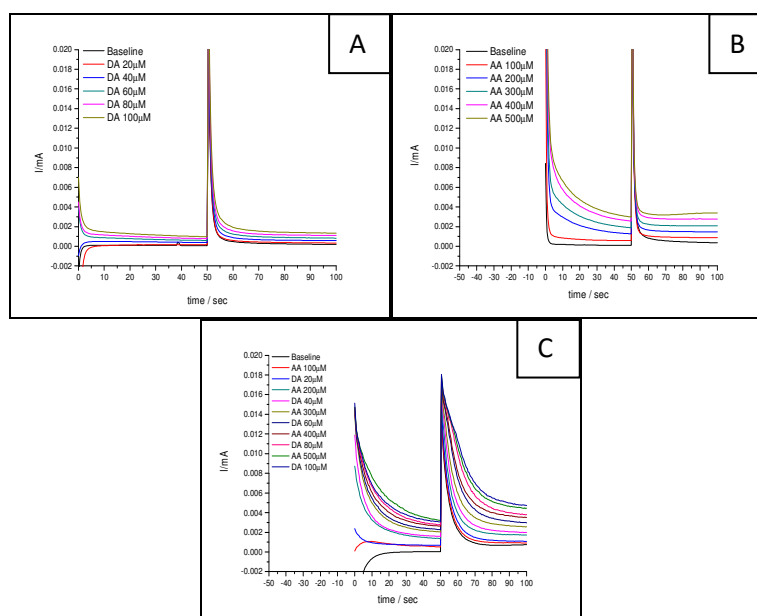


Figura 58: CA a 2 livelli su Ep/SWCNTs. A: DA; B: AA; C: AA + DA.

I valori ottenuti mediante CA a 2 livelli su Ep/SWCNTs sono mostrati in tabella 4.

DA	150 mV	9.239 E^{-6}
	400 mV	1.176 E^{-5}
DA - AA	150 mV	8.22 E^{-6}
	400 mV	1.433 E^{-5}
AA	150 mV	5.949 E^{-6}
	400 mV	6.149 E^{-6}
AA - DA	150 mV	4.90 E^{-6}
	400 mV	5.43 E^{-6}

Tabella 4: CA a 2 livelli su Ep/SWCNTs (valori espressi in mA/ μ M).

Il sensore Ep/SWCNTs è stato caratterizzato inoltre mediante CA a 3 livelli (+150 mV, 400 mV e +650 mV) con aggiunte di 5 concentrazioni di AA (fig. 59: A) e, in seguito a pulizia del sensore e cambio del PBS, aggiunte alternate di AA e DA (fig. 59: B) in modo da calcolare la corrente relativa di AA in presenza di DA e di DA in presenza di AA.

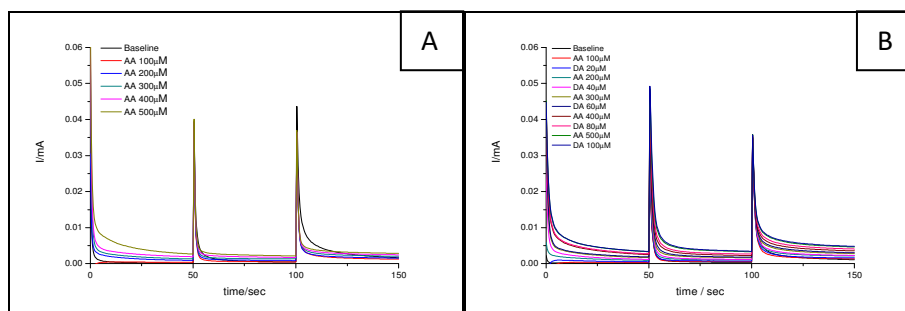


Figura 59: CA a 3 livelli. A: AA; B: AA + DA.

I risultati ottenuti mediante CA a 3 livelli su Ep/SWCNTs sono riportati nella tabella 5.

	150 mV	400 mV	650 mV
AA	5.03 E^{-6}	3.66 E^{-6}	2.89 E^{-6}
AA-DA	4.68 E^{-6}	4.076 E^{-6}	4.825 E^{-6}
DA-AA	1 E^{-5}	1.07 E^{-5}	1.38 E^{-5}

Tabella 5: CA a 3 livelli su Ep/SWCNTs (valori espressi in mA/μM).

Lo stesso sensore Ep/SWCNTs è stato inoltre caratterizzato mediante CA a 3 livelli (+150 mV, 0 mV, +300 mV) dopo elettrodeposizione di Au, ma i risultati non sono stati soddisfacenti, in quanto il sensore si è dimostrato troppo sensibile all'AA (fig. 60).

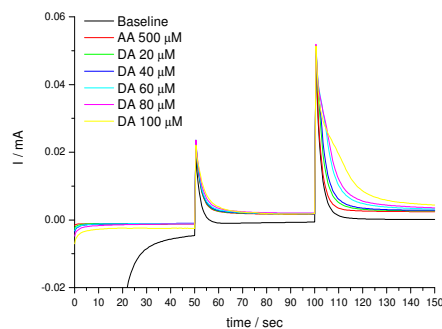


Figura 60: CA a 3 livelli su Ep/SWCNTs/Au.

4.10.6 Carbonanofibre

Sono state eseguite delle CV sia sul sensore contenente 50 % di CNF e 50 % di resina epossidica, che sul sensore CNF_MOF_C300, contenente 25 % di CNF, 25 % di C300 e 50 % di epossidica. Data la maggior area dei sensori, le correnti risultanti sono molto alte e i picchi relativi a DA ed AA sono poco definiti (fig. 61).

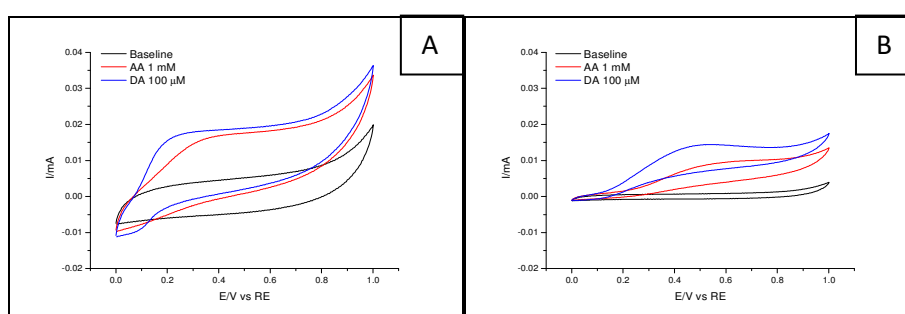


Figura 61: CV con AA 1 mM + DA 100 μM. A: CNF; B: CNF_MOF_C300.

4.11 Scelta della combinazione ideale tra materiale del trasduttore e polimero

Tutti gli esperimenti precedentemente mostrati sono stati necessari al fine di trovare la migliore combinazione tra materiale del sensore e polimero per la lettura di HP e DA al fine di studiare l'autossidazione della DA mediata da HP. In base ai risultati ottenuti è stato scelto il sensore Pt polimerizzato con *o*-PD per la rilevazione di HP, in quanto il Pt è sensibile all'HP ed il pPD risulta permeabile a questa molecola, mentre otteniamo una schermatura del polimero che supera il 99.5 % verso DA ed AA. Per quanto riguarda la rilevazione della DA, il sensore scelto è stato quello Ep (che possiede la proprietà intrinseca di non leggere HP) polimerizzato con pDA, in quanto abbastanza permeabile alla DA e con una buona schermatura nei confronti dell'AA. È possibile vedere una rappresentazione schematica dei due sensori del sistema sviluppato in figura 62.

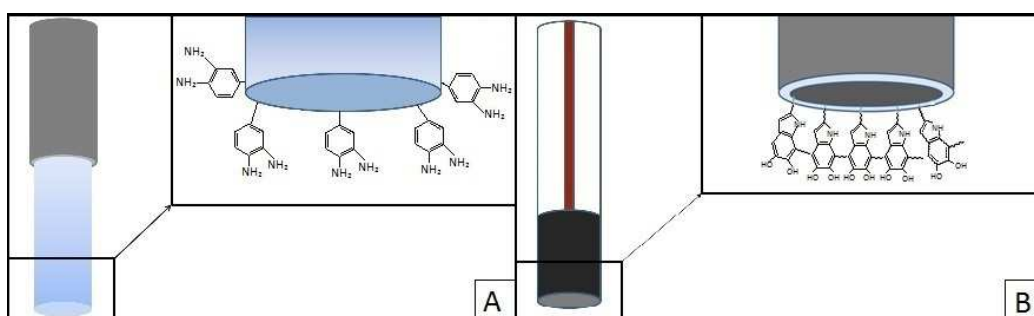


Figura 62: Sensori ideali per lo studio dell'autossidazione della DA mediata da HP. A: Pt/pPD; B: Ep/pDA.

4.12 Studio dell'autossidazione della dopamina mediata da perossido d'idrogeno

Per lo studio delle variazioni di DA in presenza di HP si è proceduto alla calibrazione di sensori Pt/pPD e sensori Ep/pDA immersi nella stessa soluzione a pH 7.4. Nella cella elettrochimica è stata inizialmente aggiunta DA 100 μM e, successivamente, 3 concentrazioni di HP: 50 μM , 100 μM e 150 μM , ad intervalli di pochi minuti, per dare tempo alle molecole di giungere ed ossidare sulla superficie dei sensori. Come si evince dal grafico (fig. 63), sul sensore Ep/pDA vi è un primo salto dovuto all'aggiunta di DA (freccia rossa), ma la corrente non aumenta in seguito alle aggiunte di HP (freccie nere), in quanto quest'ultimo non è ossidato sulla superficie del sensore Ep/pDA. Sono chiaramente visibili i 3 salti relativi alle 3 aggiunte di HP sul sensore Pt/pPD.

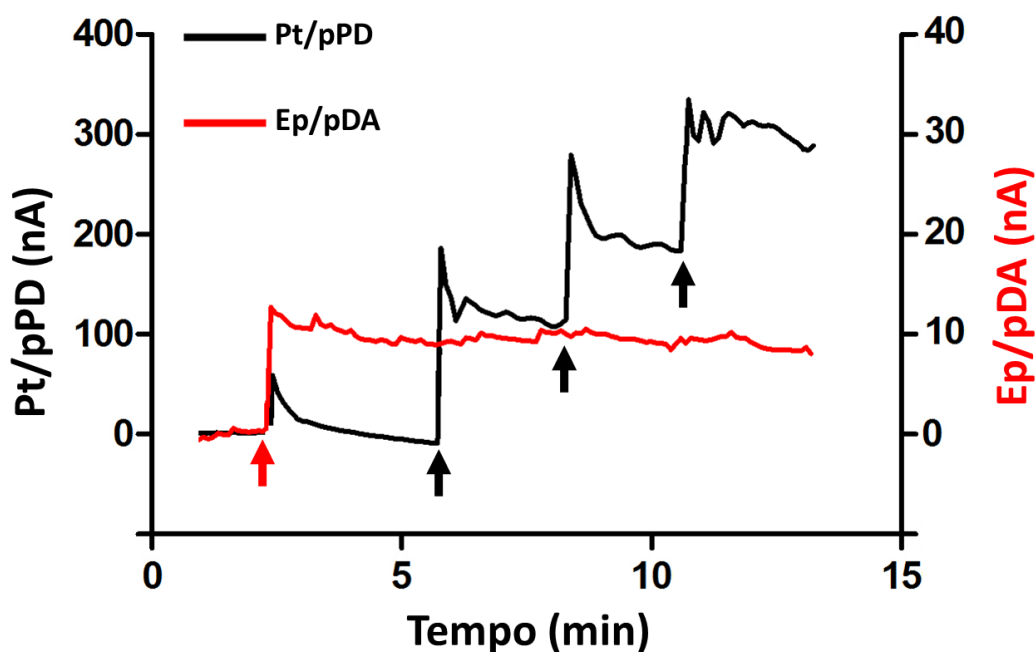


Figura 63: Grafico rappresentativo dell'esposizione dei sensori Pt/pPD e Ep/pDA alla DA (freccia rossa) e a tre successive aggiunte di HP (freccie nere).

Nella figura 64 è rappresentata la corrente risultante dall'ossidazione della sola DA (100 μM) dopo 60 minuti (fig. 64, colonna bianca) di monitoraggio continuo da parte del sensore Ep/pDA. In un secondo gruppo di esperimenti, all'aggiunta di DA sono susseguite 3 successive iniezioni di HP (50, 100 e 150 μM ; fig. 64, colonna grigio-chiara) che hanno evidenziato un'accelerazione nella autoossidazione della DA dopo un'ora di osservazione. Tale risultato evidenzia come la DA venga significativamente ossidata (**= $p<0.01$) ad opera dell'HP già in soluzione (reazione omogenea) prima che raggiunga la superficie del sensore. In una terza serie di esperimenti, i sensori Ep/pDA sono stati esposti a DA 100 μM e AA 1 mM e quindi si è proceduto alle 3 successive iniezioni di HP ed alla registrazione delle correnti di ossidazione della DA. Come si evince dalla figura 64 (fig. 64, colonna grigio-scura), l'AA ha solo parzialmente protetto la DA dall'autoossidazione che è stata significativamente superiore rispetto alla ossidazione in assenza di HP (*= $p<0.05$). L'AA ha comunque offerto una relativa protezione rispetto all'auto-ossidazione della DA in presenza di HP (#= $p<0.05$).

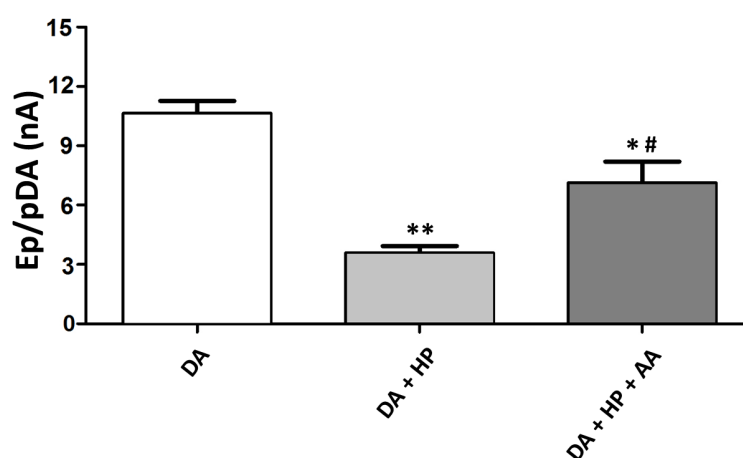


Figura 64: Correnti registrate dal sensore Ep/pDA 60 minuti dopo l'esposizione dello stesso alla sola DA ed alle miscele binaria DA + HP e ternaria DA + HP + AA. **= $p<0.01$ vs DA; *= $p<0.05$ vs DA; #= $p<0.05$ vs DA + HP.

Per quel che riguarda le correnti di HP registrate dal sensore Pt/pPD, si può notare come anch'esse risentano delle reazioni omogenee intercorse tra HP e DA (figura 65). Dopo un'ora di interazione tra DA e HP (fig. 65, colonna grigio-chiara), infatti, si è osservata una significativa riduzione della concentrazione di HP in soluzione (**= $p < 0.01$) rispetto alla concentrazione della sola HP a 60 minuti (fig. 65, colonna bianca). L'aggiunta di AA (fig. 65, colonna grigio-scura) ha ulteriormente favorito la riduzione delle concentrazioni di HP (*= $p < 0.05$ vs HP) anche rispetto alla miscela DA + HP (#= $p < 0.05$ vs HP + DA).

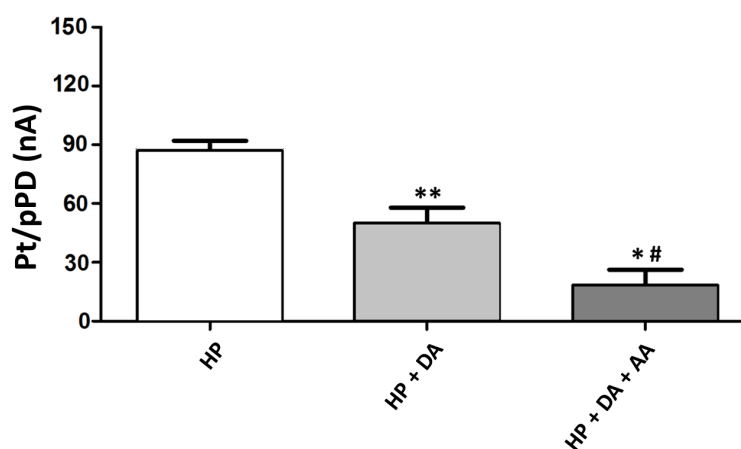


Figura 65: Correnti registrate dal sensore Pt/pPD 60 minuti dopo l'esposizione dello stesso alla sola HP ed alle miscele binaria HP + DA e ternaria HP + DA + AA. **= $P < 0.01$ vs HP; *= $P < 0.05$ vs HP; #= $P < 0.05$ vs HP + DA.

Tali risultati, presi nel loro insieme, dimostrano che l'autossidazione della DA viene promossa da HP e contrastata dall'AA, il quale possiede una vera e propria azione antiossidante. Sia DA che HP vanno incontro ad autossidazione spontanea e le loro concentrazioni a 60 minuti si riducono rispettivamente del 16 e del 18 %. Tale autossidazione "spontanea" va posta in relazione con l'ossigeno disciolto nel PBS e con i metalli in tracce presenti nella soluzione stessa. Anche l'AA si auto-ossida nelle stesse condizioni con picchi che superano il 20 % a 60 minuti.

Questi ultimi risultati preliminari sono attualmente oggetto di studi in presenza ed assenza di ossigeno in soluzione. Per lo scopo della presente tesi, l'esperimento comparativo, i cui risultati sono stati sintetizzati nel presente paragrafo, è stato ritenuto sufficiente a dimostrare le qualità dei sensori

selezionati per lo studio del fenomeno auto-ossidativo della DA in presenza di HP (ed il ruolo protettivo di un antiossidante quale l'AA). Nella stessa direzione volge lo studio assolutamente preliminare inerente il consumo di AA in presenza di DA e HP realizzato ad opera di un biosensore sottrattivo in carbonio basato sull'enzima tirosinasi, immune all'HP e capace di rilevare AA in presenza di DA.

Per quel che concerne la discriminazione tra AA e DA in presenza di HP, i sensori Ep/GO sono risultati un'ottima alternativa al disegno Ep/pDA ed il loro utilizzo ha sostanzialmente convalidato i risultati ottenuti con i sensori Ep/pDA (dati non mostrati) .

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Come descritto precedentemente, lo studio inerente le alterazioni nella concentrazione di DA sta alla base della comprensione dell'insorgenza di determinate patologie, quali il morbo di Parkinson. Partendo dalla conoscenza di tali fenomeni, è possibile intervenire anticipatamente su di esso o ammortizzare l'insorgenza di determinati sintomi.

Il sistema progettato, sviluppato e caratterizzato in questo lavoro, si propone come un modello di studio *in vitro* del fenomeno dell'autossidazione della DA mediata da HP. I risultati ottenuti mostrano come sia possibile apprezzare l'ossidazione della DA in tempo reale, sfruttando le proprietà catalitiche intrinseche ai materiali utilizzati per la costruzione dei sensori e le proprietà schermanti ottenute tramite l'utilizzo di specifici polimeri.

I motivi che ci hanno portato ad un approfondimento della ricerca in questa direzione sono due:

1 – Il pull di DA, già profondamente ridotto durante la patologia del Parkinson, viene ulteriormente impoverita dall'HP, che si determina durante i fenomeni di ossidazione a livello cerebrale nel corso della degenerazione dei neuroni dopaminergici.

2 – L'autossidazione stessa della DA genera un ciclo di formazione di altri ROS ed un incremento dei danni effettivi alle strutture cellulari interessate durante il decorso del Parkinson.

Grazie all'utilizzo di due diversi sensori amperometrici, a base di platino e carbonio, è stato possibile ottenere una discriminazione immediata di DA ed HP, data dalle proprietà del C nei confronti di HP, il quale non viene ossidato sulla superficie dell'elettrodo Ep.

Tramite la polimerizzazione di DA e di *o*-PD, sono state migliorate le prestazioni dei sensori in presenza di AA, che rappresenta la principale sostanza interferente presente nei liquidi cerebrali, ma anche di altre molecole interferenti quali UA, DOPAC e NE, anch'essi presenti nei liquidi extracellulari cerebrali.

Il polimero di DA sulla superficie del sensore Ep ha permesso di ottenere una schermatura del 98,6 % nei confronti dell'AA, mentre il sensore risulta totalmente impermeabile all'HP e sufficientemente permeabile alla DA.

Per ovviare alla parziale schermatura del pDA nei confronti della DA, sono stati eseguiti numerosi esperimenti presso il laboratorio di elettrochimica e materiali di Timisoara, atti a trovare un materiale migliore dell'Ep nei confronti della discriminazione della DA da AA, senza dover ricorrere all'utilizzo di polimeri. I

risultati migliori sono stati ottenuti sul sensore Ep dopo immersione in GO. Mediante DPV si è ottenuto un valore di DA pari a $y = -7.7 E^{-5} + 2.4 E^{-6} x$ $\mu A/\mu M$ mentre sullo stesso sensore la sensibilità all'AA è ridotta a $y = -1.3 E^{-6} + 5.2 E^{-9} x$ $\mu A/\mu M$. Lo studio atto a valutare la corrente relativa a DA in presenza di AA, ha mostrato come l'AA non interferisca con la sua lettura; il valore ottenuto per DA in presenza di AA è stato infatti $y = -5.7 E^{-5} + 2.9 E^{-6} x$ $\mu A/\mu M$.

Anche mediante SWV, sono stati ottenuti risultati soddisfacenti. Il valore di DA è stato pari a $y = -1.95 E^{-4} + 3.68 E^{-6} x$, l'AA $y = -2 E^{-6} + 2.3 E^{-8} x$ e la DA in presenza di AA $y = -8 E^{-5} + 4 E^{-6} x$ (valori espressi in $\mu A/\mu M$).

Per quanto riguarda l'o-PD, esso è stato polimerizzato sulla superficie dei sensori Pt, in modo da ottenere una schermatura da AA e soprattutto da DA, al fine di misurare solo le correnti relative all'HP. L'elaborazione statistica ha evidenziato come circa il 70 % della DA presente in soluzione venga ossidata dall'HP.

Il modello di studio presentato in questa tesi presenta vantaggi quali la relativa economicità dei sensori e materiali utilizzati, e la possibilità di un monitoraggio dell'autossidazione della DA in tempo reale.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Adhikari B, Majumdar S. Polymers in sensor applications. *Progress in Polymer Science*. 29(7): 699-766. 2004.
2. Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med. Okayama*. 58(5): 221-33. 2004.
3. Azamian BR, Davis JJ, Coleman KS, Bagshaw CB, Green MLH. Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *Journal Of The American Chemical Society*. 124(43): 12664-12665. 2002.
4. Bahrami S, Abbasi AR, Roushani M, Derikvand Z, Azadbakht A. An electrochemical dopamine aptasensor incorporating silver nanoparticle, functionalized carbon nanotubes and grapheme oxide for signal amplification. *Talanta*. 1(159): 307-16. 2016.
5. Barberis A, Spissu Y, Bazzu G, Fadda A, Azara E, Sanna D, Schirra M, Serra PA. Development and characterization of an ascorbate oxidase-based sensor-biosensor system for telemetric detection of AA and antioxidant capacity in fresh orange juice. *Anal Chem*. 218: 479-486. 2014.
6. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*, second ed., Wiley, New York. Chapter 7. 2001
7. Biaggioni I, Robertson D. Adrenoceptor Agonists & Sympathomimetic Drugs (Chapter 9). In: *Basic and Clinical Pharmacology*. 12e. B Katzung, SB Masters AJ Trevor (Editors); McGraw-Hill. 2012.
8. Borland LM, Michael AC. *An Introduction to Electrochemical Methods in Neuroscience*. Electrochemical Methods for Neuroscience. Chapter 1. 2007.
9. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. 128(3): 617-630. 1972.

10. Britto PJ, Santhanam KSV, Ajayan PM. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 41: 121-125. 1996.
11. Broderick PA, Pacia SV, Doyle WK, Devinsky O. Monoamine neurotransmitters in resected hippocampal subparcellations from neocortical and mesial temporal lobe epilepsy patients: In situ microvoltammetric studies. *Brain Research*. 878(1-2): 48-63. 2000.
12. Cardona F, Pérez-Tur J. Other proteins involved in Parkinson's disease and related disorders. *Curr Protein Pept Sci*. 17: 999. 2016.
13. Clark LC, Lyons C. Studies of a glassy carbon electrode for brain polarography with observations of the effects of carbonic anhydrase inhibition. *Ala J Med Sci*. 2(4): 353-9. 1965.
14. Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions*. 72(1-2): 1-56. 1989.
15. Conti JC, Strobe E, Adams RN, Marsden CA. Voltammetry in brain tissue: chronic recording of stimulated dopamine and 5-hydroxytryptamine release. *Life Sci*. 23(27-28): 2705-15. 1978.
16. Cottis RA. "The Interpretation of Electrochemical Noise Data". *Corrosion*. 27(3): 265-285. 2001.
17. Cummins AJ, Clark JK. Effect of various types of hemolytic agents in the combined determination of oxygen and carbon dioxide in blood. *J Lab Clin Med*. 35(1): 164-6. 1950.
18. Danner EW, Kan Y, Hammer MU, Israelachvili JN, Waite JH. Adhesion of mussel foot protein Mefp-5 to mica: an underwater superglue. *Biochemistry*. 51(33): 6511-8. 2012.
19. Deng Y, Hu Q, Yuan Q, Wu Y, Ling Y, Tang H. One-pot synthesis of molecular bottle-brush functionalized single-walled carbon nanotubes with superior dispersibility in water. *Macromol Rapid Commun*. 35(1): 97-102. 2014.

20. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*. 3(4): 461-491. 2013.
21. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Rodney S. The chemistry of graphene oxide. *Ruoff. Chem. Soc. Rev.* 39: 228–240. 2010.
22. Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, Lotharius J, Lin TT, O'Malley KL. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Rel Disord.* 7: 243–246. 2001.
23. Ensafi AA, Taei M, Khayamian T. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid by Differential Pulse Voltammetry using Tiron Modified Glassy Carbon Electrode. *Ali International Journal of Electrochemical Science.* 5(1): 116-130. 2010.
24. Farina M, Avila DS, da Rocha JBT, Aschner M. Metals, Oxidative Stress and Neurodegeneration: A focus on Iron, Manganese and Mercury. *Neurochemistry international.* 62(5):575-594. 2013.
25. Franco R, Casadó-Anguera V, Muñoz A, Petrovic M, Navarro G, Moreno E, Lanciego JL, Labandeira-García JL, Cortés A, Casadó V. Hints on the Lateralization of Dopamine Binding to D1 Receptors in Rat Striatum. *Mol Neurobiol.* 53(8):5436-45. 2016.
26. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O, Van Veldhoven PP. Aging, Age-Related Diseases and Peroxisomes. *Subcellular Biochemistry.* 69: 45-65. 2013.
27. Gałdzicki Z, Miekisz S. Momentum balance equation for nonelectrolytes in models of coupling between chemical reaction and diffusion in membranes. *Gen Physiol Biophys.* 3(2): 147-62. 1984.
28. Ganzinger U, Schiel H, Georgopoulos A, Gumhold G. The utility of diffusion chambers as models for the description of drug disposition. *J Antimicrob Chemother.* 18(1): 93-102. 1986.
29. Gao F, Cai X, Wang X, Wang Q. Highly sensitive and selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at graphene

- oxide modified electrode. *Sensors and Actuators B Chemical*. 186: 380-387. 2013.
30. Gao F, Yuan R, Chai Y, Chen S, Cao S, Tang M. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on nano-Au/Thi/poly (p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70(3): 407-413. 2007.
 31. Gao Z, Huang H. Simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid at an ultrathin film modified gold electrode. *Chem. Commun*. 19: 2107-2018. 1998.
 32. Gasnier B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie*. 82(4): 327-337. 2000.
 33. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 19(9): 1807-19. 2007.
 34. Gonon FG, Buda M, Cespuglio R, Jouvét M, Pujol J.-F. In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anesthetized rats: DA or DOPAC. *Nature*. 286: 902-904. 1980.
 35. Gutowski M, Kowalczy S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta ABP*. 60(1): 1-16. 2013.
 36. Hall SB, Khudaish EA, Hart AL. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism. *Electrochimica Acta*. 43(5-6): 579-588.. 1998.
 37. Hall TR, Chadwick A. Dopaminergic inhibition of prolactin release from pituitary glands of the domestic fowl incubated in vitro. *J Endocrinol*. 103(1):63-9. 1984
 38. Halliday G, Reyes S, Double K. Substantia Nigra, Ventral Tegmental Area, and Retrorubral Fields, In *The Human Nervous System*. Academic Press. Chapter 13: 439-455. 2012.
 39. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 97(6): 1634-1658. 2006.

40. Hare DJ, Grubman A, Ryan TM, Lothian A, Liddell JR, Grimm R, Matsuda T, Doble PA, Cherny RA, Bush AI, White AR, Masters CL, Roberts BR. *Metallomics*. 5(12): 1656-62. 2013.
41. Hubbard AT, Stickney JL, Soriaga MP, Chia VKF, Rosasco SD, Schardt BC, Solomun T, Song D, White JH, Wieckowski A. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* 168(1984): 43-66
42. Ilinoiu EC, Manea F, Serra PA and Pode R. Simultaneous/Selective Detection of Dopamine and Ascorbic Acid at Synthetic Zeolite-Modified/Graphite-Epoxy Composite Macro/Quasi-Microelectrodes. *Sensors*. 13(6): 7296-7307. 2013.
43. Iqbal K, Khan A, Khattak MMAK. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3(1): 5-13. 2004.
44. Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*. 35(11): 1503-1519. 1996.
45. Jackowska K, Krysinski P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *Anal Bioanal Chem*. 405: 3753–3771. 2013.
46. Jacobs CB, Peairsc MJ, Venton BJ. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta*. 662(2): 105-127. 2010.
47. Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*. 21(8):677-92. 2007.
48. Jenner P. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2003.
49. Justice Jr JB, Michael AC, Neill DB. Amines and Their Metabolites. Volume 2 of the series Neuromethods. In *Vivo Voltammetry*. pp 197-266. 1985.

50. Kaminska I, Das MR, Coffinier Y, Niedziolka-Jonsson J, Sobczak J, Woisel P, Lyskawa J, Opallo M, Boukherroub R, Szunerits S. Reduction and Functionalization of Graphene Oxide Sheets Using Biomimetic Dopamine Derivatives in One Step. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 4: 1016–1020. 2012.
51. Kang SM, Park S, Kim D, Park SY, Ruoff RS, Lee H. Simultaneous Reduction and Surface Functionalization of Graphene Oxide by Mussel-Inspired Chemistry. *Advanced Functional Materials*. 21(1): 108–112. 2011.
52. Killoran SJ, O'Neill RD. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochimica Acta*. 53(24): 7303–7312. 2008.
53. Kissinger PT, Hart JB, Adams RN. Voltammetry in brain tissue—a new neurophysiological measurement. *Brain Res*. 55(1): 209–13. 1973.
54. Koh B¹, Park JB, Hou X, Cheng W. Comparative dispersion studies of single-walled carbon nanotubes in aqueous solution. *J Phys Chem B*. 115(11): 2627–33. 2011.
55. Konno T, Siuda J, Wszolek ZK. Genetics of Parkinson's disease: a review of SNCA and LRRK2. *Wiad Lek*. 69(3 Pt 1): 328–32. 2016.
56. Koo JW, Mazei-Robison MS, Chaudhury D, Juarez B, LaPlant Q, Ferguson D, Feng J, Sun H, Scobie KN, Damez-Werno D, Crumiller M, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Mouzon E, Dietz DM, Lobo MK, Neve RL, Russo SJ, Han MH, Nestler EJ. BDNF is a negative modulator of morphine action. *Science*. 338(6103): 124–8. 2012.
57. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C₆₀ Buckminsterfullerene. *Nature*. 318: 162–163. 1985.
58. Lane RF, Hubbard AT. Differential Double Pulse Voltammetry at Chemically Modified Platinum Electrodes for in vivo Determination of Catecholamines. *Analytical Chemistry*. 48(9): 1287–1292. 1976.

59. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*. 318: 426–430. 2007.
60. Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death. Cell Death and Disease*. 14(4): 478-500. 2009.
61. Li D, Muller MB, Gilje S, Kaner RB, Wallace GG. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature nano*. 3: 101-105. 2008.
62. Lim CS, Chua CK, Pumera M. Detection of biomarkers with graphene nanoplatelets and nanoribbons. *Analyst*. 139: 1072-1080. 2014.
63. Liu X, Xie L, Li H. Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide and Au nanoparticles entrapped in chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for determination of dopamine and uric acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 682: 158-163. 2012.
64. Liu Y, Chipot C, Shao X, Cai W. Solubilizing carbon nanotubes through noncovalent functionalization. Insight from the reversible wrapping of alginic acid around a single-walled carbon nanotube. *J Phys Chem B*. 114(17): 5783-9. 2010.
65. Lohr KM, Masoud ST, Salahpour A, Miller GW. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease. *Eur J Neurosci*. 45(1): 20-33. 2016.
66. Manea F. Electrochemical Techniques for Characterization and Detection Application of Nanostructured Carbon Composite, Modern Electrochemical Methods in Nano, Surface and Corrosion Science. 2014.
67. Mao H, Liang J, Ji C, Zhang H, Pei Q, Zhang Y, Zhang Y, Hisaeda Y, Song XM. Poly(zwitterionic liquids) functionalized polypyrrole/graphene oxide nanosheets for electrochemically

- detecting dopamine at low concentration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 65: 143-50. 2016.
68. Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine Derived 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde: The Role of Aldehyde Dehydrogenase. *Pharmacological reviews.* 59(2). 2007.
69. Markaverich BM, Crowley J, Rodriquez M, Shoulars K, Thompson T. Tetrahydrofurandiol stimulation of phospholipase A2, lipoxygenase, and cyclooxygenase gene expression and MCF-7 human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect.* 115(12): 1727-31. 2007.
70. Martinez Joaristi A, Juan-Alcañiz J, Serra-Crespo P, Kapteijn F, Gascon J. Electrochemical synthesis of some archetypical Zn²⁺, Cu²⁺, and Al³⁺ metal organic frameworks. *Crystal Growth & Design.* 12(7): 3489-3498. 2012.
71. Mastore M, Kohler L, Nappi AJ. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. *The Febs journal.* 272(10): 2407–2415. 2005.
72. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling.* 11: 34. 2013.
73. Migheli R, Puggioni G, Dedola S, Rocchitta G, Calia G, Bazzu G, Esposito G, Lowry JP, O'Neill RD, Desole MS, Miele E, Serra PA. Novel integrated microdialysis-amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: design, construction, and validation. *Anal Biochem.* 380(2): 323-30. 2008.
74. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 8(1): 95-108. 1990.
75. Mirceski, V, Komorsky-Lovric S, Lovric M. Square-wave voltammetry: theory and application. *Springer Science & Business Media.* 2007.

76. Montastruc F, Moulis F, Araujo M, Chebane L, Rascol O, Montastruc JL. Ergot and non-ergot dopamine agonists and heart failure in patients with Parkinson's disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 73(1): 99–103. 2017.
77. Monti P, Calia G, Marceddu S, Dettori MA, Fabbri D, Jaoua S, O'Neill RD, Migheli Q, Delogu G, Serra PA. Low electro-synthesis potentials improve permselectivity of polymerized natural phenols in biosensor applications. *Talanta*. 162: 151–158. 2017.
78. Mrowczynski R, Turcu R, Leostean C, Scheidt HA, Liebscher J. New versatile polydopamine coated functionalized magnetic nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* 138: 295–302. 2013.
79. Muszynski R, Seger B, Kamat PV. Decorating graphene sheets with gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*. 112: 5263–5266. 2008.
80. Nishijima H, Tomiyama M. What Mechanisms Are Responsible for the Reuptake of Levodopa-Derived Dopamine in Parkinsonian Striatum? *Frontiers in Neuroscience*. 10: 575. 2016.
81. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, et al. Meta-Analysis of Early Nonmotor Features and Risk Factors for Parkinson Disease. *Annals of Neurology*. 72(6): 893-901. 2012.
82. O'Brien KB, Killoran SJ, O'Neill RD, Lowry JP. Development and characterization in vitro of a catalase-based biosensor for hydrogen peroxide monitoring. *Biosens Bioelectron*. 22(12): 2994-3000. 2007.
83. Oczkowska A, Kozubski W, Lianeri M, Dorszewska J. Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinson's Disease. *Curr Genomics*. 14(8): 502–517. 2013.
84. Olijslagers J, Werkman T, McCreary A, Kruse C, Wadman W. Modulation of Midbrain Dopamine Neurotransmission by Serotonin, a Versatile Interaction Between Neurotransmitters and Significance for Antipsychotic Drug Action. *Current Neuropharmacology*. 4(1): 59-68. 2006.

85. O'Neill RD, Grünewald RA, Fillenz M, Albery WJ. Linear sweep voltammetry with carbon paste electrodes in the rat striatum. *Neuroscience*. 7(8): 1945-54. 1982.
86. Ozansoy M, Basak AN. The central theme of Parkinson's disease: α -synuclein. *Mol. Neurobiol.* 47: 460–465. 2012.
87. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 14(2): 223-236. 2002.
88. Pihel K, Walker QD, Wightman RM. Overoxidized Polypyrrole-Coated Carbon Fiber Microelectrodes for Dopamine Measurements with Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Anal. Chem.* 68: 2084-2089. 1996.
89. Pumera M. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry. *Chem. Soc. Rev.* 39: 4146–4157. 2010.
90. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. *The Biogenic Amines. Neuroscience.* 2001.
91. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International.* 2014.
92. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1863(12): 2977-2992. 2016.
93. Rice ME, Nicholson C. Measurement of nanomolar dopamine diffusion using low-noise perfluorinated ionomer coated carbon fiber microelectrodes and high-speed cyclic voltammetry. *Anal Chem.* 61(17): 1805-10. 1989.
94. Rodeberg NT, Sandberg SG, Johnson JA, Phillips PE, Wightman RM. Hitchhiker's Guide to Voltammetry: Acute and Chronic Electrodes for in vivo Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *ACS Chem Neurosci.* 2017.
95. Rodthongkum N, Ruecha N, Rangkupan R, Vachet RW, Chailapakul O. Graphene-loaded nanofiber-modified electrodes for the ultrasensitive determination of dopamine. *Analytica Chimica Acta.* 804: 84-91. 2013.

96. Rothwell SA, Kinsella ME, Zain ZM, Serra PA, Rocchitta G, Lowry JP, O'Neill RD. Contributions by a novel edge effect to the permselectivity of an electrosynthesized polymer for microbiosensor applications. *Anal Chem.* 81(10):3911-8. 2009.
97. Sämann J, Hegermann J, von Gromoff E, Eimer S, Baumeister R, Schmidt E. *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 284(24): 16482-91. 2009.
98. Sarvajeet SG, Narendra T. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 48(12): 909-930. 2010.
99. Schaschke C. A Dictionary of Chemical Engineering. 2014.
100. Schönfuss D, Reum T, Olshausen P, Fischer T, Morgenstern R. Modelling constant potential amperometry for investigations of dopaminergic neurotransmission kinetics in vivo. *J Neurosci Methods.* 15;112(2): 163-72. 2001.
101. Solovieva EY, Chipova DT. From the conception of «oxidizing stress» to the conception of «cell signaling modulation». *Zh Nevrol Psikiatr Im S. S. Korsakova.* 115(8): 105-11. 2015.
102. Soto-Otero R, Méndez-Álvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL. Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants. *Journal of neurochemistry.* 74(4): 1605–1612. 2000.
103. Stocchi F, Torti M, Fossati C. Advances in dopamine receptor agonists for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 17(14): 1889-902. 2016.
104. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127: 397–408. 2006.

105. Swaddle TW. Chapter 15. Oxidation and Reduction in Solution, In *Inorganic Chemistry*, Academic Press, San Diego. pp 285-326. 1997.
106. Tanji K, Kunimatsu T, Vu TH, Bonilla E. Neuropathological features of mitochondrial disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 12: 429-439. 2001.
107. Taylor IM, Robbins EM, Catt KA, Cody PA, Happe CL, Cui XT. Enhanced dopamine detection sensitivity by PEDOT/graphene oxide coating on in vivo carbon fiber electrodes. *Biosens Bioelectron.* 89(Pt 1): 400-410. 2017.
108. Threlfell S, Cragg SJ. Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry to Investigate Somatodendritic Dopamine Release. Midbrain Dopamine Neurons Release Dopamine from Their Somatodendrites. Chapter 8. *Electrochemical Methods for Neuroscience.* 2007.
109. Troster AI. Neuropsychology of deep brain stimulation in neurology and psychiatry. *Front Biosci.* 14: 1857-79. 2009
110. Tse DC, McCreery RL, Adams RN. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J Med Chem.* 19(1): 37-40. 1976.
111. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology.* 552(2): 335-344. 2003.
112. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology.* 7(1):65-74. 2009.
113. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1): 44-84. 2007.
114. Walcarius A, Etienne M, Herzog G, Urbanova V, Vilà N. Chapter Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors. Part of the series Nanostructure Science and Technology. *Electrode Materials (Bulk Materials and Modification).* pp 403-495. 2014.

115. Wang D, Xu F, Hu J, Lin M. Phytic acid/graphene oxide nanocomposites modified electrode for electrochemical sensing of dopamine. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 1(71): 1086-1089. 2017.
116. Wiedemann DJ, Basse-Tomusk A, Wilson RL, Rebec GV, Wightman RM. Interference by DOPAC and ascorbate during attempts to measure drug-induced changes in neostriatal dopamine with Nafion-coated, carbon-fiber electrodes. *J Neurosci Methods.* 35(1): 9-18. 1990.
117. Yang X, Xu Y. Mutations in the ATP13A2 gene and Parkinsonism: a preliminary review. *Biomed Res Int.* 2014: 1-9. 2014.
118. Zhu M, Huang X, Li J, Shen H. Peroxidase-based spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid, norepinephrine, epinephrine, dopamine and levodopa. *Analytica Chimica Acta.* 357: 261-267. 1997.
119. Zhu Y, Wang B, Tao K, Yang H, Wang Y, Zhou T, Yang Y, Yuan L, Liu X, Duan Y. Iron accumulation and microglia activation contribute to substantia nigra hyperechogenicity in the 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 1-7. 2017
120. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. LRRK2 Affects Vesicle Trafficking, Neurotransmitter Extracellular Level and Membrane Receptor Localization. *Neuron.* 44: 601–607. 2004.
121. Zuman Petr. Principles of Applications of Polarography and Voltammetry in the Analysis of Drugs. *FABAD J. Pharm. Sci.* 31: 97-115. 2006.